



Universidad de Sonora  
División de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Investigación en Física

---

Trabajo de Tesis en opción al grado de  
Doctor en Ciencias (Física)

**Física-química en la síntesis de nanopartículas de  
plata con PEG y su efecto en la amplificación de la  
señal Raman de eritrocitos vivos**

Presentado por

M.C. Noralvis Fleitas Salazar

Directores de tesis:

Dr. Raúl Riera Aroche y Dr. Martín R. Pedroza Montero

Asesora:

Dra. Erika Silva Campa

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



Universidad de Sonora  
División de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Investigación en Física

---

Trabajo de Tesis en opción al grado de  
Doctor en Ciencias (Física)

## **Física-química en la síntesis de nanopartículas de plata con PEG y su efecto en la amplificación de la señal Raman de eritrocitos vivos**

Presentado por

M.C. Noralvis Fleitas Salazar

Directores de tesis:

Dr. Raúl Riera Aroche y Dr. Martín R. Pedroza Montero

Asesora:

Dra. Erika Silva Campa

A mis padres y a mi hermano.

A Seidy.

En este largo camino del saber, quisiera agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a mi formación profesional y académica, así como el apoyo financiero que ha permitido la culminación de este trabajo de Doctorado en Ciencias (Física).

Quiero agradecer en primer lugar, al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONACyT) de México por contar con un programa de becas para estudios de posgrado que incluye a extranjeros, fomentando así el intercambio cultural y científico y favoreciendo el desarrollo profesional de personas de otros países. Gracias al CONACyT por esta oportunidad que ha hecho posible la realización de este trabajo de tesis.

También quiero agradecer al Departamento de Investigación en Física de la Universidad de Sonora. A los doctores que se han desempeñado como coordinadores del posgrado en Ciencias (Física) durante estos 4 años, les agradezco su apoyo en los trámites para ingresar al doctorado, en la compra de recursos necesarios para el trabajo de investigación y para la participación en eventos. A las secretarías del DIFUS, en especial a Sandra, Fernanda, Martha y Lupita les agradezco la orientación, apoyo y su amable atención durante todo este tiempo.

Agradezco de manera muy especial a mi director de tesis, el Dr. Raúl Riera, por todo lo aprendido durante estos cuatro años en el doctorado en Física, por ser mi guía en el estudio de los fenómenos físicos involucrados en la síntesis de nanopartículas metálicas y sus propiedades físico químicas, por contribuir a mi formación profesional y académica, por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva.

Agradezco a mi co-director de tesis, el Dr. Martín R. Pedroza, por aceptarme en su grupo de trabajo y despertar en mí el interés por el mundo de la nanotecnología, por su orientación y apoyo que han contribuido a mi formación como investigador en física, la realización de los experimentos y la participación en eventos científicos.

También quiero agradecer a mi asesora de tesis, la Dra. Erika Silva Campa, porque siempre ha estado al tanto de mi avance en el trabajo, apoyándome con los medios y recursos necesarios para llevar a cabo los experimentos, por la revisión de los

trabajos presentados en eventos y otros documentos académicos, por brindarme su apoyo y amistad durante estos años.

A los doctores que forman el grupo del Dr. Pedroza les agradezco su disposición a ayudarme durante el trabajo de tesis, por crear un ambiente laboral ameno que favorece el intercambio científico. A la Dra. Karla Santacruz y a la Dra. Aracely Angulo les agradezco su valioso apoyo en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión para la caracterización de las nanopartículas de plata en la Universidad de Texas y el IPICYT.

Agradezco a los miembros del comité de seguimiento: el Dr. Marcelino Barboza, el Dr. Rodrigo Meléndrez, el Dr. Martín Pedroza y el Dr. Raúl Riera por el rigor de las evaluaciones y los consejos durante las sesiones de seminarios que han contribuido a mi formación académica y profesional.

Agradezco de antemano a los miembros del jurado de tesis por la revisión del documento de tesis y las correcciones que contribuirán a mejorar la calidad del mismo.

Agradezco a los responsables y miembros de los diferentes laboratorios que nos han facilitado el uso de sus equipos e instalaciones:

- Laboratorio del Dr. Carlos Velázquez para los estudios en células: a la maestra Lucila, la Dra. Paola, a los estudiantes de doctorado: el M.C. Efraín Alday y M.C. Daniel.
- Laboratorios de Nanotecnología: Al Dr. Enrique Álvarez por permitir el uso de los equipos y la disponibilidad de las fuentes de láser necesarias para las mediciones de espectros Raman, al Dr. Roberto Carrillo y al MC. Jaime Ibarra por el apoyo y capacitación en el uso de programas y el intercambio sobre los principios físicos del funcionamiento de dichos equipos.
- Laboratorio de la Dra Ana Ledesma y el laboratorio de estado sólido para las mediciones de espectros en el rango UV-visible: Dr. Raúl Aceves, Dr. Thomas Piters y Dr. Alain Pérez.

- Laboratorios de la Dra Judith Tanori: al Dr. Eduardo Larios por su apoyo en la preparación de muestras y obtención de imágenes TEM. A la Dra Judith Tanori por facilitar el uso de sus instalaciones para experimentos de síntesis de nanopartículas en atmósfera de nitrógeno.

Quisiera agradecer de manera muy especial a la Dra. Judith Tanori por todo el tiempo dedicado a la caracterización de nanopartículas de plata, por todo lo que me ha enseñado.

Quisiera agradecer a los maestros del posgrado en Física que han contribuido a mi formación académica: Dr. Rodrigo Meléndrez, Dr. Felipe Ramos, Dr. Germán Campoy, Dr. Jorge A. Gaspar y Dr. Efraín Urrutia.

Por mi formación profesional también quisiera agradecer al grupo de antivirales dengue del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) (La Habana, Cuba), donde me formé como investigador científico, aprendí a diseñar experimentos y la disciplina de trabajar de manera independiente y organizada dentro de un grupo multidisciplinario. En especial, agradezco a la Dra. Vivian Huerta Galindo por ser mi guía y ejemplo en el camino de la investigación científica.

También quisiera agradecer aquellos que nos recibieron con cariño y con su amistad, nos ayudaron a sentirnos como en casa. Agradezco a la comunidad cubana de Hermosillo, en especial a Maura y Lázaro, Esther, Valarie y Marcelino, Celia y Riera. A los amigos mexicanos que nos recibieron con mucho cariño y nos han brindado su amistad, en especial: Anahí, Oso, Lirio y Selene.

A los amigos de siempre y a mi familia, que a pesar de la distancia no he dejado de sentir su amistad y cariño. Por todo aquello que no puede expresarse en palabras, les agradezco a mis padres, a mi hermano y a Seidy, a quienes dedico esta tesis.

---



La micro-espectroscopía Raman permite el estudio "no invasivo" de procesos biológicos que provocan cambios en la intensidad y/o posición de picos en el espectro Raman de una célula. La sensibilidad de la técnica mejora notablemente cuando se analizan moléculas muy cercanas a la superficie de nanopartículas (NPs) de plata (menos de 20 nm). Este fenómeno se conoce como SERS (siglas del inglés: Surface-Enhanced Raman Scattering). En este trabajo, evaluamos el efecto de NPs de plata, sintetizadas por dos métodos diferentes, en la amplificación de la señal Raman de eritrocitos vivos. El espectro Raman de la hemoglobina (Hb) está muy bien caracterizado, dado que esta es la proteína mayoritaria en la composición de los eritrocitos, estas células constituyen un modelo adecuado para el estudio del efecto de amplificación de la señal Raman por NPs de plata.

Las moléculas de poli-etilenglicol (PEG) le confieren a las NPs metálicas biocompatibilidad y estabilidad, características necesarias para sus aplicaciones biológicas. Este polímero es muy empleado como agente reductor y estabilizante en la síntesis de NPs de plata (NPs AgPEG). En algunas ocasiones, el procedimiento utilizado se lleva a cabo en atmósfera oxidante y a elevadas temperaturas (mayores de 70°C), sin considerar la susceptibilidad del PEG a la degradación térmica oxidativa. En la síntesis de NPs de plata con PEG en condiciones favorables a dicho proceso de degradación ( $O_2$  / 70°C), los grupos de Luo (Luo *et al.*, 2005) y Nam (Nam *et al.*, 2011) observaron que la actividad reductora del PEG mejora al incrementar la temperatura o emplear un PEG de mayor peso molecular. Sin embargo, estas observaciones no pueden ser explicadas en base a los mecanismos de reducción de iones  $Ag^+$  encontrados en la literatura, los cuales solo involucran a los grupos terminales de las moléculas PEG en la reducción de iones plata. Por otro lado, encontramos que algunos procedimientos publicados para la síntesis de NPs AgPEG son difíciles de reproducir. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en este trabajo estudiamos la influencia de diferentes factores como: la temperatura, la presencia de oxígeno y la concentración del precursor de plata, en la síntesis de NPs AgPEG. Nuestros resultados aportan evidencia experimental que involucra a la degradación térmica oxidativa del PEG en

un nuevo mecanismo que proponemos para explicar la potenciación de la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  y estabilización de NPs AgPEG.

Adicionalmente, el estudio anterior permitió establecer condiciones de síntesis reproducibles para la obtención de NPs AgPEG estables en el coloide por al menos dos años. Dicha estabilidad facilita la comparación entre estudios realizados en diferentes momentos y con diferentes células. De manera similar, la reproducibilidad de este método de síntesis y la estabilidad de las NPs que se obtienen, permitiría comparar los resultados obtenidos por distintos grupos de trabajo. Otra ventaja del uso del PEG como agente reductor y estabilizante en la síntesis de NPs AgPEG es que no resulta dañino al medio ambiente (método verde) a diferencia de otros agentes reductores empleados con el mismo fin.

En nuestros experimentos, también sintetizamos NPAs empleando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante. Este tipo de NPAs son muy empleadas en estudios SERS y aunque no son estables a largo plazo, el método de síntesis es fácil de reproducir. De esta manera, obtuvimos NPs de plata por dos métodos diferentes (NPs AgPEG y NPAs), obteniendo en ambos casos NPs de plata esféricas, cubiertas por distintos agentes estabilizantes y con tamaños promedios entre 20 y 25 nm aproximadamente.

Las NPs AgPEG y NPAs se evaluaron como amplificadores de la señal Raman de glóbulos rojos (GR) vivos, obteniendo incrementos entre 100-10 000 en diferentes picos del espectro Raman. La intensidad de la señal Raman de GR incubados con las NPAs fue mayor que en aquellos incubados con las NPs AgPEG. En el espectro de GR control, están presentes algunos picos de oxi-Hb ausentes en el espectro de GR incubados con NPs de plata. Las moléculas de desoxi-Hb tienen mayor afinidad de unión a la membrana del GR, por lo cual están más cercanas a NPs que se unen a la membrana del eritrocito que las moléculas de oxi-Hb. Por esta razón, la ausencia de picos de oxi-Hb en los espectros Raman de GRs incubados con NPs de plata sugiere una ubicación extracelular de dichas NPs. En este punto de la exposición de nuestros resultados, discutimos aspectos relacionados con los mecanismos que contribuyen a la amplificación de la señal Raman de los GRs vivos, así como perspectivas para la aplicación de estas NPs.

Raman micro-spectroscopy allows non-invasive studies of biological processes that induce variations of intensity and/or position of peaks on cell Raman spectra. The weak Raman signal of molecules can be enhanced by metal nanoparticles (NPs) for molecules located near to nanoparticle surface (around 20 nm and less). Raman spectrum of Hemoglobin (Hb) has been very well characterized by other authors. For this reason, red blood cells (RBC), whose main component is Hemoglobin, are a suitable model to study the effect of silver NPs on Raman signals of Hb. In this work, we synthesized and characterized two different colloids of silver NPs for Raman studies.

Polyethylene glycol (PEG) molecules confer biocompatibility and stability to metal NPs, very important properties for biological applications. PEG is used frequently as a reducer and stabilizing agent in the synthesis of silver NPs (NPs AgPEG). Sometimes, the procedure is accomplished in the presence of oxygen and at temperatures over 70°C, without consider PEG susceptibility to thermal oxidative degradation (TOD). Using these conditions ( $O_2 / 70^\circ C$ ), Luo et al (2005) and Nam et al (2011) observed that PEG reducing activity improves with the increment of temperature or with the use of a higher molecular weight PEG. However, these observations cannot be explained by the mechanisms reported until now for the reduction of  $Ag^+$  that only involve PEG terminal groups on the reduction. On the other hand, we found that some of the procedures reported for NPs AgPEG synthesis are difficult to reproduce.

In this work, we study the influence of different factors, such as temperature, presence of oxygen and silver precursor concentration, in the synthesis of NPs AgPEG. Our results give experimental evidences that shows the involvement of TOD of PEG in a new mechanism that can explain the effect of PEG in the reduction and stabilization of NPs AgPEG.

Additionally, our experiments allowed to find reproducible conditions for the synthesis of NPs AgPEG that were stable in dispersion for at least two years. The stability of the NPs makes easier the comparison between studies achieved at different moments, with different cells and by different laboratories. Another advantage of using PEG as the reducing and stabilizing agent in the synthesis of

NPs AgPEG is the green character of this method that is not harmful to the environment.

We also obtained AgNPs by using  $\text{NaBH}_4$  as the reducing agent and sodium citrate as the stabilizing agent. These AgNPs are very used in SERS studies due to the reproducibility of the synthesis method, although the nanoparticles are not long-term stables. The two kinds of nanoparticles obtained by us (NPs AgPEG and AgNPs) are spherical, in sizes between 20-50 nm and their surfaces are covered with different stabilizing agents.

Both NPs were evaluated as Raman signal amplifiers in experiments with RBC, producing increments in the intensity of Raman peaks around 100-10 000. The intensity of Raman peaks was higher in RBC incubated with AgNPs than in NPs AgPEG. Analyzing the differences between the spectra of RBC control condition and RBC incubated with silver NPs, we conclude that oxi-Hb contributes peaks only to RBC control condition. Deoxy-Hb molecules have better affinity for RBC membrane, what locates them nearest to the silver NPs that can be joining the external face of the cellular membrane. That is why, the absence of oxi-Hb peaks in Raman spectra of RBC incubated with NPs suggests an extracellular position for both kind of silver NPs used. At this point of our results, we discuss aspects related to the mechanisms that contributes to Raman signal amplification in RBC and possible applications of our silver NPs.

En la **Introducción** hacemos referencia al área de la física donde se inserta el presente trabajo así como la importancia y repercusión del mismo. Además, planteamos las hipótesis que queremos comprobar en nuestro estudio y los objetivos trazados para demostrar si se cumplen o no dichas hipótesis.

En el **Capítulo 1**, mostraremos el marco teórico que facilita la comprensión de los procesos que se describen en nuestro estudio. En el acápite 1.1, se definen los conceptos de nanopartícula y plasmón de superficie, se explican los mecanismos de nucleación y crecimiento en la síntesis de NPs metálicas, enfocándonos en las NPs de plata. También describiremos el papel del poli-etilenglicol (PEG) como agente reductor y estabilizante en la síntesis de NPs de plata. Finalmente, describimos cómo se emplean los modos de interacción de la luz con la materia en las técnicas empleadas para la caracterización de NPs metálicas, así como el fundamento teórico de dichas técnicas. En el acápite 1.2 se describen las interacciones entre las radiaciones electromagnéticas y las moléculas. Las diferentes regiones del espectro electromagnético se definen y nos enfocamos en las radiaciones "no ionizantes" que permiten estudiar procesos de absorción y dispersión inelástica por métodos de espectroscopía, que brindan información de la estructura química de la molécula. Por último, en el acápite 1.3 se explica el efecto de la interacción de la luz con moléculas que se encuentran en la superficie de NPs metálicas con propiedades plasmónicas, en el contexto de dispersiones inelásticas (Raman).

En el **Capítulo 2**, se estudia el efecto de la temperatura en la síntesis de NPs de plata empleando PEG como agente reductor y estabilizante (NPs AgPEG). Se describe la metodología que seguimos para evaluar el posible efecto de la degradación térmica oxidativa del PEG en esta síntesis. Aquí brindamos evidencia experimental que sugiere la existencia de un nuevo (no descrito anteriormente) mecanismo de reducción de los iones plata para síntesis realizadas en condiciones favorables a la degradación térmica oxidativa del PEG. Además, se establecen las condiciones para la síntesis reproducible de NPs AgPEG estables en el tiempo.

En el **Capítulo 3**, se establecen las condiciones que permitieron evaluar el efecto de NPs de plata en la señal Raman de glóbulos rojos vivos. Se discuten las diferencias observadas entre el espectro Raman de eritrocitos vivos, en presencia o no de NPs de plata.

Al final del documento, se muestran las **Conclusiones generales de la tesis** así como las **Referencias**.

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: Estado del Arte .....	6
1.1 Interacción de la luz con la materia.....	6
1.1.1 Radiaciones electromagnéticas .....	7
1.1.2 Absorción.....	9
1.1.3 Dispersión Rayleigh .....	10
1.1.4 Dispersión Raman.....	11
1.1.5 Técnicas de caracterización de materiales .....	17
1.2 Nanopartículas metálicas.....	27
1.2.1 Definición y propiedades .....	27
1.2.2 Mecanismos de formación de nanopartículas.....	33
1.2.3 Síntesis de nanopartículas de plata .....	43
1.3 Molécula de hemoglobina.....	51
1.3.2 Espectro de absorción de la hemoglobina.....	52
1.3.3 Espectro Raman de la hemoglobina .....	53
1.4 Efecto de la interacción de la luz con moléculas ubicadas en la vecindad de NPs metálicas.....	56
1.4.1 Conceptos generales del efecto SERS.....	56
1.4.2 Mecanismos de SERS .....	57
1.4.3 Ensayos SERS en glóbulos rojos.....	58
CAPÍTULO 2: Efecto de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata con polietilenglicol.....	60
2.1 Metodología.....	60
2.1.1 Síntesis de AgNPs a 60°C en aire (O <sub>2</sub> ) (R1-R3).....	61
2.1.2 Síntesis de AgNPs a 100°C en aire (O <sub>2</sub> ) (R4-R6).....	61
2.1.3 Síntesis de AgNPs a 100°C en N <sub>2</sub> (R7-R8).....	61
2.1.4 Caracterización de NPs de plata .....	62
2.2 Resultados y Discusión.....	62
2.2.1 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 60°C .....	62
2.2.2 Posibles mecanismos de crecimiento de NPs AgPEG. ....	65
2.2.3 Análisis estequiométrico de las síntesis a 60°C.....	66
2.2.4 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 100°C en aire (O <sub>2</sub> ).....	70
2.2.5 Efecto de la temperatura en la síntesis de AgPEG NPs en aire (O <sub>2</sub> ).....	71
2.2.6 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 100°C en N <sub>2</sub> .....	76

2.2.7 Reproducibilidad de las reacciones R1 y R5 .....	81
2.2.8 Estabilidad en el tiempo de NPs R1 y R5-AgPEG.....	82
2.3 Conclusiones del capítulo 2 .....	84
<b>CAPÍTULO 3: Efecto de las nanopartículas de plata en la señal Raman de eritrocitos vivos.</b> .....	85
3.1 Metodología.....	85
3.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata con NaBH <sub>4</sub> (NPAGs).....	85
3.1.2 Estabilidad de NPs de plata en presencia de sales .....	85
3.1.3 Ensayo de hemólisis .....	86
3.1.4 Obtención de hemoglobina libre.....	86
3.1.5 Experimentos Raman .....	86
3.2 Resultados y Discusión.....	87
3.2.1 Estabilidad de las NPs de plata en presencia de sales.....	88
3.2.2 Efecto de sales y NPs de plata en el espectro de absorción de Hb .....	90
3.2.3 Efecto de NPs de plata en la viabilidad de los eritrocitos.....	91
3.2.4 Efecto de NPs de plata en el espectro Raman de GR vivos .....	92
3.3 Conclusiones del capítulo 3 .....	103
<b>CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS</b> .....	104
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	106
<b>REFERENCIAS</b> .....	107

## INTRODUCCIÓN

Las propiedades ópticas de las NPs de metales nobles como la plata y el oro, son ampliamente aplicadas en biomedicina, en particular, en técnicas de detección de moléculas y diagnóstico. Por ejemplo, muchas pruebas diagnóstico como las de detección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y del embarazo, emplean NPs de oro conjugadas a anticuerpos o antígenos para revelar el resultado sin necesidad de ningún equipo. En estos, la especificidad de unión con moléculas en la muestra, está dada por la interacción antígeno-anticuerpo, mientras que la presencia de NPs de oro, permite visualizar el resultado. Por otro lado, las NPs de plata pueden emplearse en la amplificación de la señal Raman de moléculas muy cercanas a su superficie. Las aplicaciones antes mencionadas se fundamentan en los fenómenos de absorción y dispersión (elástica) de la luz por NPs metálicas, no presentes en el bulto, es decir, en partículas de mayor volumen del mismo material. Asumiendo NPs metálicas de forma esférica, cuando su diámetro ( $d$ ) es menor que la longitud de onda ( $\lambda$ ) del fotón en el rango visible del espectro electromagnético (400-700 nm), se producen fenómenos de dispersión elástica (Rayleigh o Mie). Esta relación entre el tamaño de la NP y la longitud de onda de la luz visible ( $d < \lambda$ ), explica por qué los fenómenos de dispersión mencionados no se observan en el bulto.

La absorción de fotones por NPs metálicas, se produce cuando la frecuencia de los mismos coincide con la frecuencia del plasmón de la NP metálica. En estas condiciones tiene lugar la resonancia del plasmón de la NP, que consiste en la oscilación coherente y colectiva de los electrones de la banda de conducción a través de la NP. Este efecto también se conoce como resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR: *siglas del inglés Localized Surface Plasmon Resonance*). La LSPR produce un incremento de la intensidad del campo eléctrico en las vecindades de la NP metálica, que es uno de los mecanismos que media la amplificación de la señal Raman de moléculas adsorbidas a la superficie de la NP metálica (efecto SERS). La dispersión Raman es una dispersión inelástica de la radiación electromagnética que tiene lugar cuando un fotón absorbe o cede energía



a una molécula durante la interacción, provocando un cambio en el estado vibracional de la misma. De esta forma, el espectro Raman brinda información sobre los enlaces químicos presentes en la molécula. Un factor limitante en la aplicación de la micro-espectroscopía Raman es su baja sensibilidad, ya que solo 1 de cada  $10^7$  fotones se dispersa inelásticamente. Sin embargo, cuando una molécula se adsorbe sobre la superficie de NPs metálicas con propiedades plasmónicas, puede producirse el efecto SERS, amplificando la intensidad de la señal Raman (en el orden de  $10^3$ - $10^{14}$ ) (Stevenson *et al.*, 2012; Sapsford *et al.*, 2013). En esta aplicación se emplean con frecuencia las NPs de plata, debido a que estas exhiben una banda de absorción del plasmón muy intensa y estrecha en el espectro UV-visible.

En este trabajo, nos propusimos evaluar el efecto de distintas NPs de plata en el espectro de dispersión Raman de eritrocitos vivos, para lo cual fue necesario primeramente sintetizar dichas NPs. Teniendo en cuenta que el PEG le confiere a las NPs metálicas biocompatibilidad y estabilidad, propiedades favorables para los ensayos en células, obtuvimos NPs de plata empleando PEG200 como agente reductor y estabilizante (NPs AgPEG). En cambio, una de las NPs de plata más empleadas en estudios SERS, son aquellas que se obtienen con el  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y el citrato de sodio como agente estabilizante (NPAGs), por lo que también sintetizamos estas NPs. Actualmente, la obtención de un coloide NPs de plata monodispersas y estables a largo plazo continua siendo un reto (Stevenson *et al.*, 2012). Uno de los factores que afecta la estabilidad coloidal de las NPs de plata es que son susceptibles a la oxidación. El procedimiento para la obtención de las NPAGs descrito en la literatura fue fácil de reproducir, pero las NPAGs obtenidas no son estables a largo plazo. En cambio, para la síntesis de NPs AgPEG con PEG200 fue necesario establecer las condiciones óptimas de reacción, pues no fue posible reproducir la síntesis descrita por Stiuftuc y colaboradores (Stiuftuc *et al.*, 2013).

El PEG es muy empleado como agente reductor y estabilizante en la síntesis de NPs AgPEG. Sin embargo, algunos autores llevan a cabo esta reacción en atmósfera oxidante y a elevadas temperaturas (mayor de  $70^\circ\text{C}$ ), sin considerar la susceptibilidad de este polímero a la degradación térmica oxidativa (DTO). Varios

autores realizan la síntesis de NPs de plata en atmósfera no oxidante ( $N_2$  o Ar) para evitar su oxidación antes de ser estabilizadas. En estas condiciones, si se emplea PEG, la síntesis no se vería afectada por la DTO del PEG aunque se empleen altas temperaturas. Este proceso de degradación ocurre a temperaturas mayores de  $70^\circ C$  y en presencia de  $O_2$ . Los grupos de Luo (Luo *et al.*, 2005) y Nam (Nam *et al.*, 2011) obtuvieron NPs AgPEG en condiciones favorables a la DTO del PEG. Estos grupos observaron que la actividad reductora del PEG mejora al incrementar la temperatura o emplear un PEG de mayor peso molecular. Sin embargo, los mecanismos de reducción de iones  $Ag^+$  a partir de los grupos terminales de moléculas orgánicas que aparecen en la literatura (Fievet, Lagier y Figlarz, 1989; Luo, Zhao y Pendry, 2014; Gomes *et al.*, 2015), no explican estas observaciones. En este estudio, nos propusimos evaluar si la síntesis de NPs AgPEG empleando PEG200 como agente reductor y estabilizante, se afecta en condiciones que favorecen la DTO del PEG. Con este fin, evaluamos en dicha síntesis la influencia de diferentes factores tales como la temperatura de reacción, la presencia de oxígeno y la concentración del precursor de plata. En base a los resultados obtenidos de este estudio, proponemos un mecanismo de reducción de iones plata donde también participan los grupos oxi-etilenos internos en la estructura del PEG, así como otros compuestos intermediarios y algunos productos de la DTO del PEG. Además, establecimos condiciones de síntesis reproducibles para la obtención de NPs AgPEG estables en el coloide por al menos dos años.

Las NPAs y NPs AgPEG sintetizadas se caracterizaron y luego evaluamos su efecto en el espectro Raman de eritrocitos vivos. Nuestros resultados evidencian la utilidad de estas NPs en la amplificación de la señal Raman de células vivas. Aquí se discuten aspectos relacionados con los mecanismos que contribuyen a la amplificación de la señal Raman de los GRs vivos así como perspectivas para la aplicación de estas NPs.

A continuación, mostramos el objetivo general de nuestro trabajo, los objetivos particulares que permitieron cumplimentar dicho objetivo, así como las hipótesis que queremos probar en nuestro estudio.

**Objetivo general del trabajo:**

Evaluar el efecto de algunas variables físico-químicas en la síntesis de nanopartículas de plata con PEG para obtener de manera reproducible NPs AgPEG estables que resulten útiles para aplicaciones biológicas.

**Objetivos particulares:**

1. Obtener un coloide estable de NPs de plata empleando PEG200 como agente reductor y estabilizante (NPs AgPEG).
  - 1.1. Evaluar el efecto de la concentración de  $\text{AgNO}_3$  (0.1-1.0 mM) en la síntesis de NPs AgPEG a diferentes temperaturas (60°C o 100°C) en presencia de oxígeno.
  - 1.2. Realizar la síntesis de NPs AgPEG empleando diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  (0.1-0.5 mM) a 100°C en atmósfera de  $\text{N}_2$ .
  - 1.3. Proponer mecanismos de reducción que expliquen el comportamiento de las síntesis de NPs AgPEG dependiente de la temperatura y de la presencia de oxígeno.
2. Obtener un coloide de NPs de plata empleando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante (NPAs).
3. Caracterizar las NPAs y las NPs AgPEG mediante técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS, siglas del inglés: *Dynamic Light Scattering*), microscopía electrónica de transmisión (TEM, siglas del inglés: *Transmission Electron Microscopy*) y espectroscopía de absorción en el rango ultravioleta-visible (UV/vis).
4. Evaluar la estabilidad de las NPAs y las NPs AgPEG en presencia de sales.
5. Evaluar el efecto de las NPAs y las NPs AgPEG en la viabilidad de los eritrocitos vivos.
6. Comparar el efecto de las NPAs y las NPs AgPEG en la señal Raman de eritrocitos vivos.

***Hipótesis:***

*Variables físico-químicas como la temperatura de reacción y la presencia de oxígeno, son determinantes en la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> necesaria para producir NPs AgPEG estables de manera reproducible. Estas nanopartículas pueden emplearse para la amplificación de la señal Raman de eritrocitos vivos.*

## **CAPÍTULO 1: Estado del Arte**

La física del estado sólido estudia las propiedades estructurales, mecánicas, termodinámicas, eléctricas, magnéticas y ópticas de sólidos poli-cristalinos y no cristalinos. En esta investigación, estudiamos diferentes variables físico-químicas durante la síntesis de NPs de plata que determinan la estabilidad y propiedades ópticas de estas NPs. Los fundamentos físico-teóricos esenciales involucrados en este trabajo están relacionados con las propiedades de la plata como cuerpo sólido cristalino en su condición de nanopartícula. El efecto de tamaño cuántico, le confiere propiedades ópticas a las NPs de plata que favorecen su aplicación en la amplificación de la señal Raman de moléculas como la hemoglobina.

Los átomos de cada elemento químico se caracterizan por el número de protones presentes en el núcleo. En cada átomo, el número de protones es igual al número de electrones lo que hace que sea eléctricamente neutro. Los protones y neutrones en un átomo se ubican en el núcleo mientras que los electrones se distribuyen alrededor del núcleo en los distintos niveles de energía ubicándose en los orbitales atómicos (obedeciendo el principio de exclusión de Pauli). Los electrones que se encuentran en la capa de valencia, el nivel de mayor energía (ocupado), se conocen como electrones de valencia. En cambio, los electrones que ocupan los niveles de menor energía (que el nivel de valencia), se denominan electrones internos. Estos electrones se encuentran más cercanos al núcleo y son fuertemente retenidos en el átomo. En cambio, los electrones de valencia participan en la formación de enlaces químicos con otros átomos. La mayoría de los átomos tienden a formar enlaces químicos para ganar estabilidad, formando moléculas. Las características de los átomos determinan el tipo de enlace químico que los une, y esto a su vez influye en las propiedades físicas y químicas de las moléculas que forman.

### **1.1 Interacción de la luz con la materia**

Los distintos modos de interacción de las radiaciones electromagnéticas (EM) con la materia, dependen de la energía de la radiación y la composición del material.

Esto último determina las diferencias entre las propiedades ópticas de las NPs metálicas y las de moléculas formadas por enlaces covalentes. En este capítulo, abordaremos diferentes aspectos relacionados con la interacción de NPs de plata **(1.2)** y moléculas covalentes **(1.3)** con la radiación electromagnética “no ionizante” para finalmente entender el efecto combinado de la dispersión Raman de moléculas en presencia de NPs metálicas **(1.4)**.

### **1.1.1 Radiaciones electromagnéticas**

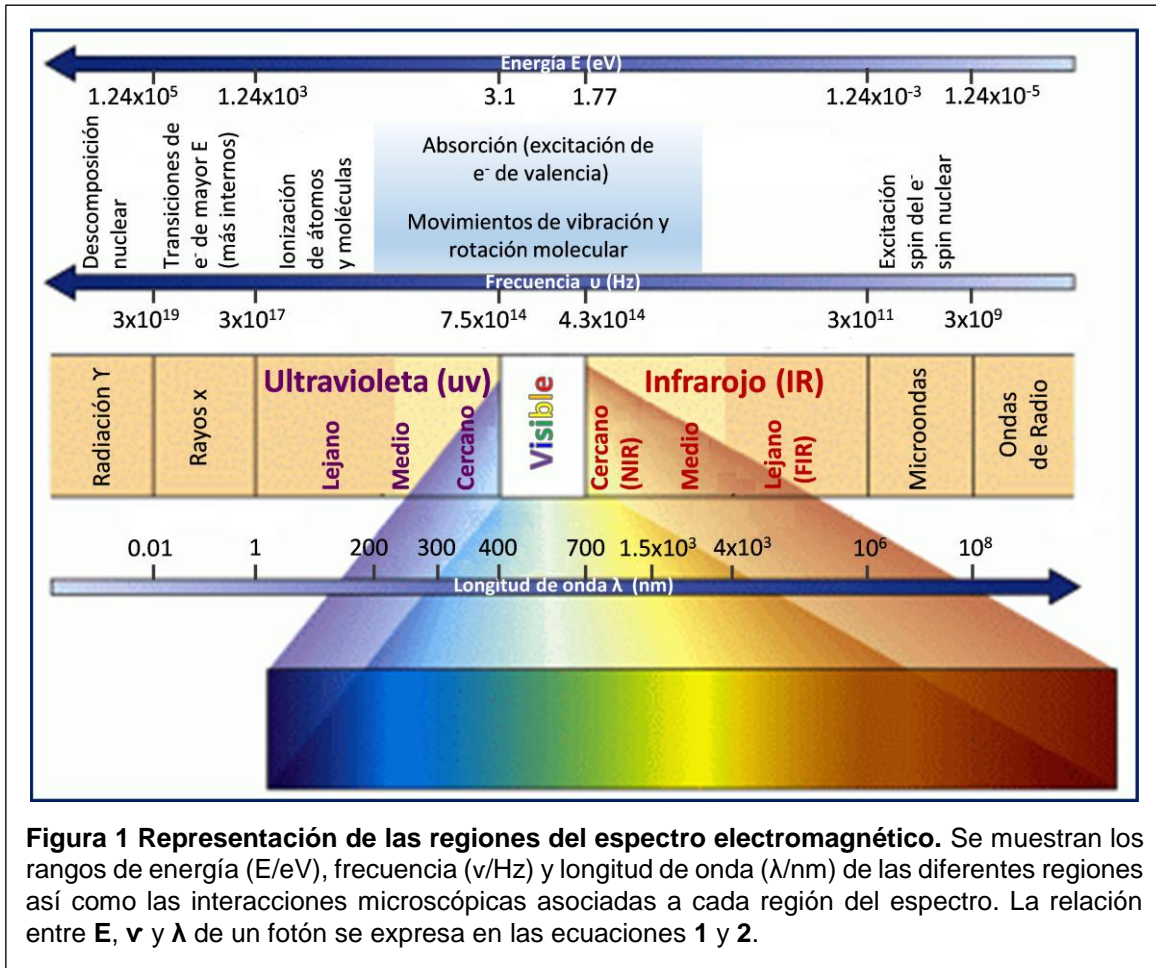
Las radiaciones electromagnéticas (EM) se propagan en el espacio como ondas EM transversales con una velocidad **c** en el vacío (ver ecuación 1). Las mismas, se dividen comúnmente en 7 regiones espectrales (ver **Figura 1**). Los límites entre estas regiones se fijaron por convenio y no por una clara discontinuidad de los fenómenos físicos involucrados. La forma en que se genera la radiación EM, su detección y forma de interacción con la materia dependen de su frecuencia ( $\nu$ ).

$$(1) \quad c = \nu \lambda \cong 3 \times 10^8 \frac{m}{s} \quad (\text{velocidad de la luz en el vacío})$$

En 1900, el físico alemán Max Planck postuló que la energía de la radiación EM puede ser emitida o absorbida por la materia sólo en pequeñas unidades discretas llamadas cuantos (fotones) (ver ecuación 2). Cada tipo de radiación EM tiene las energías cuánticas (E) apropiadas para la excitación de ciertos tipos de procesos físicos (ver **Figura 1**). (García-Solé, Bausá y Jaque, 2005).

$$(2) \quad E_{(\text{fotón})} = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

En la ecuación 2, h es la constante de Planck y su valor es  $h = 6.62 \times 10^{-34}$  Js. Como muestra esta ecuación, mientras menor es la longitud de onda (mayor frecuencia), mayor es la energía de la radiación.



**Figura 1 Representación de las regiones del espectro electromagnético.** Se muestran los rangos de energía (E/eV), frecuencia ( $\nu$ /Hz) y longitud de onda ( $\lambda$ /nm) de las diferentes regiones así como las interacciones microscópicas asociadas a cada región del espectro. La relación entre E,  $\nu$  y  $\lambda$  de un fotón se expresa en las ecuaciones 1 y 2.

La energía necesaria para arrancar un electrón del orbital atómico o molecular más externo, se denomina energía de ionización. Los fotones con energía mayor que la energía de ionización de una molécula podrían inducir su ionización (pérdida de electrones). En cambio, los fotones con energía "no ionizante" (menor a la energía de ionización) permiten estudiar diferentes procesos sin afectar la integridad de las moléculas.

**Los procesos que se describen en este trabajo están relacionados con el empleo de radiaciones electromagnéticas NO IONIZANTES.**

Como se observa en la **Figura 1**, las radiaciones EMs en el rango ultravioleta-infrarrojo (UV-IR) (200-3000 nm), pueden activar los modos de vibración en las moléculas o provocar la excitación de los electrones de valencia en átomos y moléculas. La transición de los electrones de valencia entre los diferentes niveles de energía está en el rango de 1 - 6 eV mientras que la activación de los modos de vibración de los enlaces covalentes en las moléculas requieren menor energía (García-Solé, Bausá y Jaque, 2005). Entre los fenómenos que se estudian en el rango UV-IR, se encuentra los eventos de absorción y dispersión de la luz por moléculas que describiremos a continuación. Estos procesos se estudian por métodos espectroscópicos que, a diferencia de otras técnicas experimentales, proporcionan información directa de los niveles de energía cuantificados de una molécula, los cuales están íntimamente ligados a la estructura química (Horch, Hildebrandt y Zebger, 2015).

### **1.1.2 Absorción**

Como mencionamos anteriormente, los distintos modos de interacción de las radiaciones EM con la materia, no dependen solo de la energía de la radiación, sino también de la composición del material.

#### **1.1.2.1 Absorción en el UV/vis**

Una muestra que contiene NPs metálicas puede absorber la energía de los fotones con una frecuencia igual a la frecuencia del plasmón de dichas NPs (se define y describe en la sección **1.2.1**).

En cambio, en el caso de las moléculas, cuando la energía del fotón incidente coincide con la diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado excitado de la molécula, se produce la absorción del fotón. La energía del fotón incidente se transfiere a la molécula y esta pasa al estado excitado. Esta energía puede disiparse en forma de calor y/o de radiación EM en el rango visible (ejemplo: fluorescencia (ver **Figura 2A**)).

Como se observa en la **Figura 1**, las radiaciones en el rango UV/vis tienen la energía adecuada para provocar la excitación de diferentes moléculas. En espectroscopía



de absorción en el UV/vis, la absorción de fotones por una muestra se detecta por la atenuación del haz transmitido con respecto al haz incidente (ver **Figura 5**). Esta técnica se describe en detalle en la sección **1.1.2.1**). Los espectros de absorción UV/vis para algunas NPs metálicas y molécula de hemoglobina se muestran en las secciones **1.2.1** y **1.3.1**, respectivamente.

### **1.1.2.2 Absorción en el IR**

Otra técnica muy empleada para el estudio de los modos de vibración en una molécula es la espectroscopia de absorción en el IR. En la sección **1.1.5.4** se describen las características generales de los modos de vibración de las moléculas "activos en el IR". En esta técnica, se hace incidir sobre la muestra un amplio rango de radiaciones EM con frecuencias en el IR. La absorción del fotón se produce cuando su frecuencia coincide con la frecuencia de un modo de vibración de la molécula, de esta manera la molécula pasa a un estado de vibración de mayor energía. Esto se detecta de manera similar a la espectroscopia de absorción en el UV/vis antes descrita. (Smith y Dent, 2005)

Para la detección de los modos vibracionales de una molécula se emplean dos técnicas complementarias: la espectroscopia de absorción en el IR y la espectroscopía de dispersión Raman (sección **1.1.4**).

### **1.1.3 Dispersión Rayleigh**

La dispersión elástica es la forma de dispersión más intensa donde la  $\lambda$  del fotón dispersado es igual a la  $\lambda$  del fotón incidente. Dependiendo de la relación entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda de la radiación incidente, la dispersión elástica puede describirse por las teorías de Rayleigh o Mie (ver **Figura 6B** y sección **1.1.5.2**).

La dispersión Rayleigh consiste en la dispersión elástica de la luz causada por moléculas y partículas con diámetro menor a  $\frac{\lambda}{10}$ . En este rango de tamaños, el haz de fotones puede considerarse como la propagación de un dipolo oscilante que es mucho más grande que la molécula. De esta forma, el fotón incidente puede causar una distorsión de la nube de electrones de la molécula provocando su polarización.

Como consecuencia, la molécula pasa a un estado de mayor energía que comúnmente se denomina estado virtual (ver **Figura 2A**). Este estado de energía de la molécula se caracteriza por una geometría de los electrones con respecto al núcleo diferente de la presente en el estado basal y en el excitado. El estado virtual es inestable y al relajarse la molécula, la energía se libera rápidamente en forma de dispersión de la radiación. En 1871, Lord Rayleigh determinó que la intensidad de la luz dispersada ( $I_d$ ) por dispersores dipolares mucho más pequeños que la longitud de onda (ver ecuación **3**) depende de la polarizabilidad de la molécula ( $\alpha$ ), la distancia de la fuente al dispersor ( $R$ ), la cantidad de dispersores (partículas) ( $N$ ), el ángulo de dispersión ( $\theta$ ) y la intensidad de la radiación incidente ( $I_0$ ) y su longitud de onda ( $\lambda$ ).

$$(3) \quad I_d = I_0 \frac{8\pi^4 N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta)$$

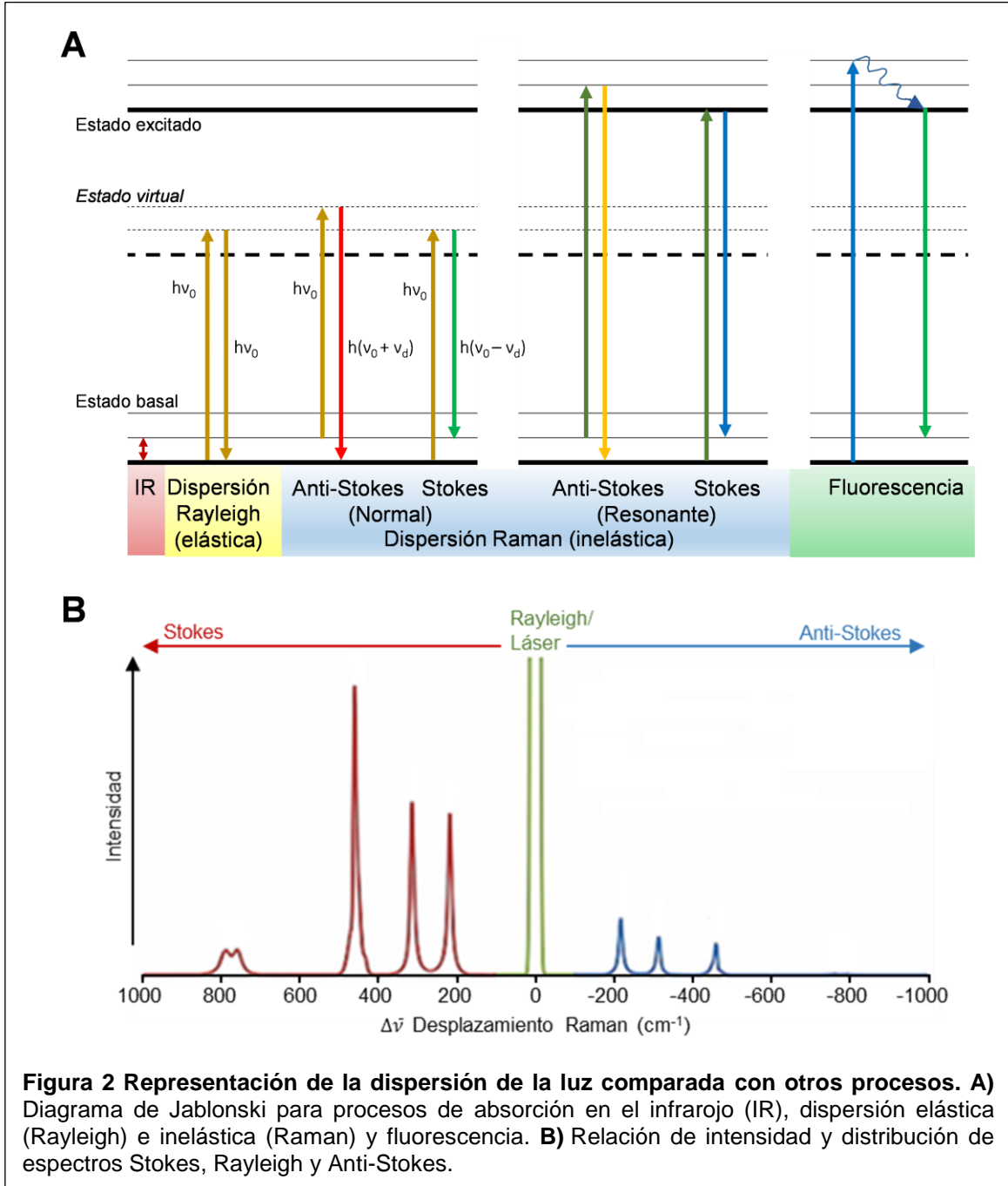
Como se observa en la ecuación **3**, la intensidad de la dispersión ( $I_d$ ) es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda:  $I \propto \frac{1}{\lambda^4}$ . Lo anterior implica que la intensidad de dispersión es mayor para fotones de menor longitud de onda.

#### 1.1.4 Dispersión Raman

De todos los fotones dispersados, un número limitado de fotones ( $1:10^7$ ) (ver ecuaciones **5b-d**) intercambian energía con la molécula, alterando el estado vibracional de la misma. Este proceso de dispersión inelástica se conoce como dispersión Raman, pues este fenómeno fue descubierto el físico Chandrasekhara Venkata Raman en 1928 (Hanlon *et al.*, 2000).

La diferencia de energía entre el fotón incidente y el dispersado ( $h(\nu_0 - \nu_d)$  en la **Figura 2A**) corresponde a la energía vibracional de un enlace molecular específico ( $hf$ ). De esta forma, el espectro de dispersión Raman brinda información sobre la energía de los enlaces presentes en la muestra y por tanto permite la identificación de moléculas y el estudio de procesos celulares que involucran un cambio importante en la composición o distribución molecular de la muestra. El desarrollo tecnológico ha facilitado el estudio "no invasivo" de las células por micro-

espectroscopía Raman. Debido a su baja sensibilidad, en esta técnica se requieren concentraciones de moléculas entre  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M para su detección (Brazhe *et al.*, 2009).



Dependiendo de si el fotón gana o pierde energía en su interacción con la molécula, la dispersión Raman se clasifica en Stokes o Anti-Stokes (ver **Figura 2B**). En la

dispersión Stokes, el fotón incidente le transfiere energía a una molécula que se encuentre en el estado fundamental o algún estado vibracional de baja energía. Como resultado, la molécula pasa a un estado vibracional de mayor energía y el fotón dispersado tiene menor energía (mayor  $\lambda$ ) que el fotón incidente. En cambio, en la dispersión Anti-Stokes, una molécula que se encuentra en un estado vibracional de mayor energía (debido a perturbaciones térmicas o interacciones previas con un fotón) le cede energía al fotón. De esta forma, la molécula pasa a un estado vibracional de menor energía y el fotón dispersado tiene mayor energía (menor  $\lambda$ ) que el fotón incidente.

La forma correcta de expresar la dispersión Raman es como un desplazamiento en energía: variación del número de onda ( $\Delta\bar{\nu}$ ) entre el fotón incidente y el fotón dispersado ( $\text{cm}^{-1}$ ) (ver **Figura 2B**). El número de onda ( $\bar{\nu}$ ) es el recíproco de la longitud de onda ( $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$ ).

A temperaturas alrededor de 25°C, la mayor parte de las moléculas están en el estado fundamental, por lo cual, a menos que se establezcan condiciones experimentales especiales, los eventos de dispersión Stokes predominan sobre la dispersión Anti Stokes (ver **Figura 2B**). Así, en microespectroscopía Raman, comúnmente medimos la dispersión Stokes.

La medición del espectro anti-Stokes podría favorecer el análisis de muestras donde la señal Stokes se ve enmascarada por la fluorescencia. Existen herramientas experimentales que amplifican la señal anti-Stokes. Una forma de evitar la fluorescencia de la muestra para la medición del espectro Raman Stokes, es el empleo de un láser con energía menor (mayor  $\lambda$ ) que la requerida para la excitación de electrones en la muestra (salto del electrón del estado basal al estado excitado).

#### **1.1.4.1 Modos vibracionales de una molécula (Modos activos en Raman)**

La energía de una molécula, mientras no se altere su estado electrónico (ejemplo: por la absorción de un fotón que provoque el salto de un electrón al estado excitado), puede dividirse en diferentes "grados de libertad". Estos representan los posibles movimientos de traslación y rotación en la molécula, que se conocen como modos

normales de vibración. En una molécula con  $n$  átomos, deben aparecer  $3n-6$  bandas de tensión y flexión ( $3n-5$  cuando la molécula es lineal). Esto significa que una molécula di-atómica tendrá solo un modo de vibración. (Smith y Dent, 2005)

Si asumimos que un enlace químico se comporta como un oscilador armónico, podríamos emplear la ecuación de Hooke:  $F=-kx$ , donde  $k$  es la constante de fuerza del enlace y  $x$  el desplazamiento del estado de equilibrio. En una molécula di-atómica, la frecuencia ( $f$ ) del modo de vibración depende de  $k$  y la masa reducida de los dos átomos ( $\mu$ ), como se muestra en la ecuación 4.

$$(4) \text{ a) } f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{b) } \frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad (m_1 \text{ y } m_2: \text{ masas de átomo 1 y 2})$$

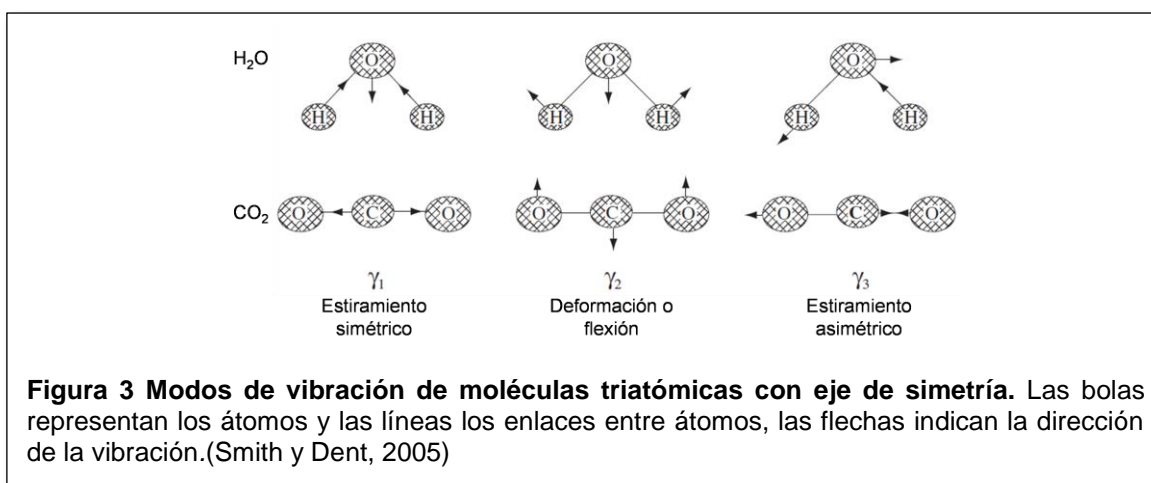
En moléculas de tres o más átomos, otro factor que determina la frecuencia de vibración es el ángulo entre los enlaces que contribuyen al modo de vibración. Mientras más fuerte es el enlace, y más pequeños los átomos involucrados, mayor será la frecuencia de la vibración y viceversa. Mientras mayor es  $f$ , mayor es la energía que el fotón incidente cede (o recibe) a (de) dicho modo de vibración, por lo que será mayor el desplazamiento Raman, es decir, es mayor la diferencia de energía ( $h(\nu_0 \pm \nu_d)$ ) entre el fotón incidente y el fotón dispersado (ver **Figura 2A**).

#### **Modos de vibración en moléculas sencillas**

En el H<sub>2</sub>O (no lineal) tendremos 3 modos de vibración (ver **Figura 3**) mientras que en el CO<sub>2</sub> (lineal), tendremos 4 modos normales de vibración. Sin embargo, el CO<sub>2</sub> presenta dos modos vibracionales de deformación con frecuencias muy similares observándose un único modo vibracional de deformación que es una combinación de ambos. Por esta razón, en el CO<sub>2</sub> se observan 3 modos vibracionales de frecuencias diferentes (ver **Figura 3**).

Estos modos vibracionales pueden estudiarse por micro-espectroscopía Raman y espectroscopía infrarroja (IR). En moléculas con un eje de simetría, las vibraciones activas en Raman serán inactivas en el infrarojo y viceversa. El modo vibracional activo en Raman es aquel que provoca cambios en la polarización de la molécula. En cambio, la absorción en el infrarojo depende de cambios en el momento dipolo permanente de la molécula. En H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>, los estiramientos simétricos provocan

un mayor cambio en la polarización de la molécula con poco o ningún cambio en el momento dipolar (señal Raman fuerte y señal de absorción IR débil o ausente). Los modos de deformación causan un cambio en el momento dipolo de la molécula pero poco cambio en la polarización (absorción IR fuerte y señal Raman débil o ausente). (Smith y Dent, 2005)



### Asignación de modos de vibración en moléculas complejas

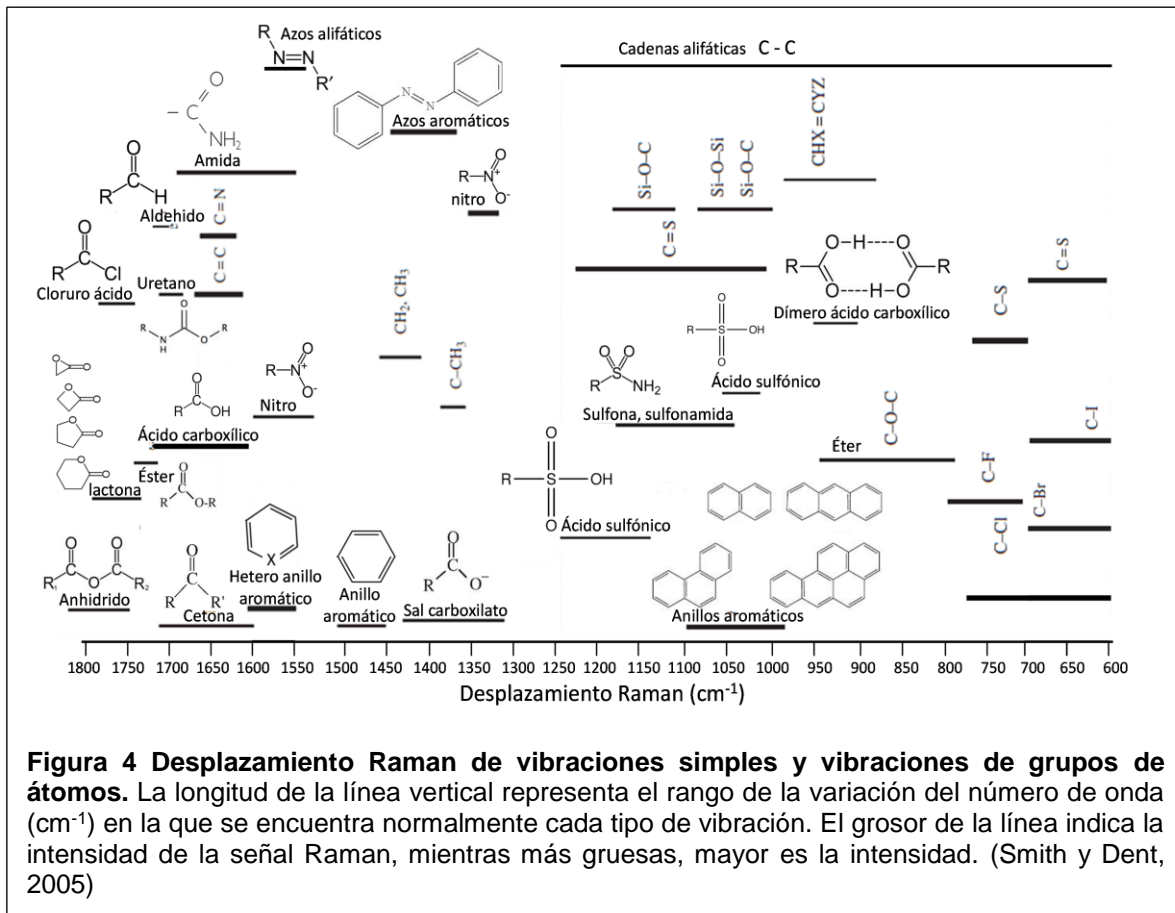
En moléculas formadas por muchos átomos, se puede tener una idea de los modos de vibración a partir de cálculos teóricos. El enfoque habitual para describir las vibraciones es dividir los desplazamientos en determinados rasgos característicos que pueden estar presentes en varias moléculas. En el espectro experimental se localizan los picos de los modos de vibración calculados teóricamente y estos pueden coincidir. Esto se conoce como asignación de la vibración y es una manera de describirla. Aunque dicha asignación no es precisa en todos los casos, en muchas moléculas se describen razonablemente la asignación de las bandas comunes. (Smith y Dent, 2005)

Para la asignación de vibraciones a picos espectrales es necesario tener en cuenta que:

- Dos o más enlaces cercanos en una molécula con energías similares, pueden interactuar. En este caso, lo que se observa en el espectro es la vibración del grupo de átomos unidos por estos enlaces.

- Cuando hay una gran diferencia de energía entre las vibraciones de diferentes enlaces, o los átomos están bien separados en la molécula, los enlaces pueden tratarse independientemente.

En absorción infrarroja o dispersión Raman, es posible asignar rangos de energía para frecuencias características de los grupos más comunes. Las intensidades relativas de los picos específicos ayudan a confirmar que la asignación de la vibración es la correcta. Por ejemplo, el grupo carbonilo ( $>C=O$ ) es asimétrico e iónico, tiene un momento dipolar que cambia con el modo de estiramiento. Este grupo tiene fuertes bandas (a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) en el espectro infrarrojo, pero débiles en el espectro Raman. Grupos simétricos como los enlaces insaturados ( $-C=C-$ ) y enlaces disulfuro ( $-S-S-$ ) absorben débilmente en el infrarrojo, pero son fuertes dispersores Raman. Los modos de estiramiento para estas vibraciones son a  $1640\text{ cm}^{-1}$  y a  $500\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. La combinación del conocimiento de la energía aproximada y la intensidad relativa de las vibraciones características, son la base del modo de asignación utilizado por la mayoría de espectroscopistas (ver **Figura 4**). (Smith y Dent, 2005)



**Figura 4 Desplazamiento Raman de vibraciones simples y vibraciones de grupos de átomos.** La longitud de la línea vertical representa el rango de la variación del número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) en la que se encuentra normalmente cada tipo de vibración. El grosor de la línea indica la intensidad de la señal Raman, mientras más gruesas, mayor es la intensidad. (Smith y Dent, 2005)

### 1.1.5 Técnicas de caracterización de materiales

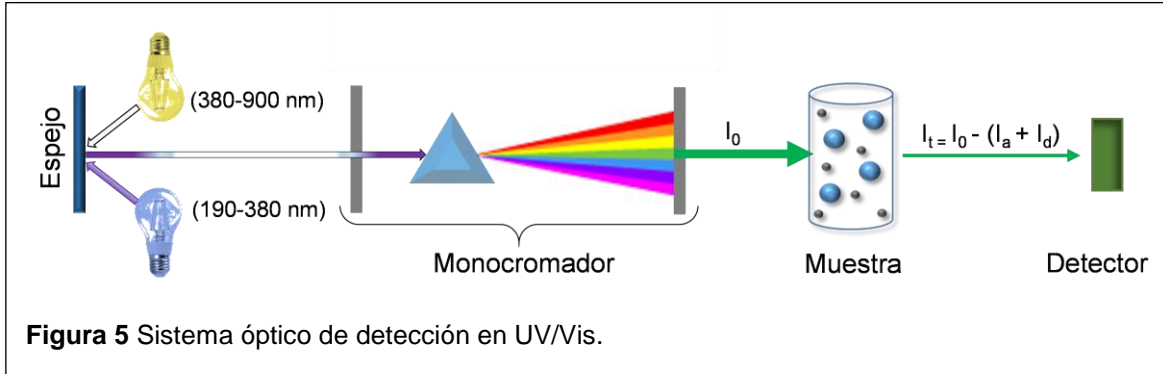
A continuación se describen los principios físicos de las técnicas que se emplearon en este estudio para la caracterización de las NPs de plata y las moléculas de hemoglobina de los eritrocitos. Este conocimiento favorece la obtención de resultados precisos y una correcta interpretación de los mismos.

#### 1.1.5.1 Espectroscopia de absorción UV/vis

La **Figura 5** muestra una representación esquemática de los principales elementos del espectrofotómetro UV/vis y la forma espectral de la luz después de pasar a través de cada elemento. El espectrofotómetro UV/vis está equipado con dos lámparas (fuentes de radiaciones EM) que permiten abarcar el rango de longitudes de ondas en el rango UV/vis (200-800). Generalmente, se emplean una lámpara de deuterio para el rango UV y una lámpara de tungsteno para el visible. El camino



óptico del haz de luz se traza con la ayuda de espejos dicróicos. Al pasar el haz de luz por el monocromador, se separan los fotones por su frecuencia y se selecciona la frecuencia que incide sobre la muestra en cada momento.



Cuando un haz de fotones incide sobre una muestra, pueden tener lugar diferentes eventos, de manera no excluyente. La probabilidad de que ocurra un evento depende, en parte, de la composición del material así como de la frecuencia ( $\nu$ ) y longitud de onda ( $\lambda$ ) de la radiación (ver **Figura 5**). Cuando un haz de luz monocromática (de una sola frecuencia) atraviesa la muestra (transmisión) su intensidad se atenúa ( $I_t < I_0$ ). La intensidad del haz transmitido ( $I_t$ ) es menor que la del haz incidente ( $I_0$ ) pues parte de los fotones son reflejados ( $I_r$ ), dispersados ( $I_d$ ) o absorbidos ( $I_a$ ) (ver ecuación **5a** y la **Figura 5**).

La mayor contribución a la atenuación de la intensidad de haz transmitido se debe a los eventos de absorción ( $I_a$ ), ya que los eventos de dispersión son menos frecuentes (ver ecuación **5b-d**).

$$(5) \quad \mathbf{a)} \quad I_t = I_0 - (I_r + I_d + I_a) \quad \mathbf{b)} \quad I_d = 10^{-5} I_0$$

$$\mathbf{c)} \quad I_{d(\text{Raman})} = 10^{-2} I_d \quad \mathbf{d)} \quad I_{d(\text{Raman})} = 10^{-7} I_0$$

Al final del camino óptico se ubica un detector para medir la intensidad de cada haz monocromático después de atravesar la muestra. En el rango UV/Vis generalmente se emplea un fotomultiplicador como detector.

### Ley de Lambert-Beer

La sección transversal ( $\sigma$ ) es el área efectiva de un átomo o molécula que controla la probabilidad de que ocurran eventos de dispersión y absorción de la luz ( $\sigma = \sigma_{\text{absorción}} + \sigma_{\text{dispersión}}$ ).

Cuando un haz de luz incide sobre una cubeta de área **A** y espesor **dx**, que contiene una solución de moléculas a una concentración **C**, el número de moléculas iluminadas por la luz es **CAdx**. Luego, si cada molécula tiene un área transversal  $\sigma$ , que determina la probabilidad de absorber y/o dispersar la luz, entonces la fracción de área (A) donde la luz se absorbe debido a cada molécula está dada por  $\sigma/A$  y la probabilidad de que la luz se absorba o se disperse por unidad de área es ( $\sigma C dx$ ), lo cual determina la atenuación de la intensidad de la luz ( $\frac{dI_x}{I_x}$ ), como se expresa en la ecuación **6a**. Integrando a ambos lados de la ecuación **6a** (como se muestra a continuación), obtenemos la ecuación **6c**.

$$(6) \ a) \ \frac{dI_x}{I_x} = -\sigma C dx$$

$$b) \ \int_{I_0}^{I_t} \frac{dI_x}{I_x} = - \int_0^x \sigma C dx \rightarrow \ln(I_t) - \ln(I_0) = \ln\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = -\sigma C x \rightarrow \frac{I_t}{I_0} = e^{-\sigma C x}$$

$$c) \ I_t = I_0 e^{-\sigma C x} = I_0 e^{-\mu x}$$

La ecuación **6c** se conoce como la ley de Lambert-Beer, donde  $I_0$  es la intensidad de la luz que llega al material (intensidad incidente menos las pérdidas por reflexión en la superficie),  $I_t$  la intensidad del haz transmitido,  $x$  la trayectoria lineal que recorre la luz y  $\mu = \sigma C$  es el coeficiente de atenuación lineal y se expresa en ( $\text{cm}^{-1}$ ).

**Ley de Lambert Beer:** La intensidad de la luz al atravesar un material se atenúa exponencialmente en relación con:

- ✓ La cantidad de material absorbente y dispersor presente en el tramo que recorre la luz (concentración: C).
- ✓ La distancia que la luz recorre a través de la muestra (longitud de la trayectoria óptica: x).
- ✓ La probabilidad de que el fotón de una longitud de onda particular sea absorbido o dispersado por el material (sección transversal:  $\sigma$ ).

En espectroscopia UV/Vis, la absorbancia (A) se define como:

$$(7) \ A = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)}\right) = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I_0(\lambda)e^{-\mu x}}\right) = \log e^{\mu x} = \mu x \log(e) = 0.4343 \mu x$$

El coeficiente de extinción ( $\epsilon$ :) es  $\epsilon = 0.4343\sigma$ , por lo cual, de manera similar a " $\sigma$ " describe la capacidad de una partícula de absorber y dispersar la luz. Luego relacionando:  $\epsilon = 0.4343\sigma$ ,  $\mu = \sigma C$  y  $A = 0.4343 \mu x$  como se muestra a continuación y despejando A, obtenemos: la ecuación **8**, que es la forma más conocida de la ley de Lambert-Beer, empleada para determinar la concentración de una muestra a partir de la absorbancia:

$$\epsilon = 0.4343\sigma = 0.4343 \frac{\mu}{C} = \frac{A}{Cx}$$

$$(8) A = \epsilon Cx$$

Comúnmente, los resultados de las medidas de espectrofotometría UV/Vis se muestran en gráficos de absorción en función de  $\lambda$ . No obstante, como la atenuación de la intensidad detectada en el haz transmitido depende de fenómenos de absorción y dispersión, es más preciso expresar los gráficos como extinción en función de la  $\lambda$ . En muestras donde el tamaño de las partículas es menor que  $\lambda/10$ , se puede despreciar la contribución de la dispersión a la atenuación de la intensidad de la luz. En estas condiciones, el coeficiente de atenuación lineal  $\mu$  es igual al coeficiente de absorción lineal  $\alpha$  y es válido graficar absorción en función de la  $\lambda$ . (Ye-Wan *et al.*, 2010)

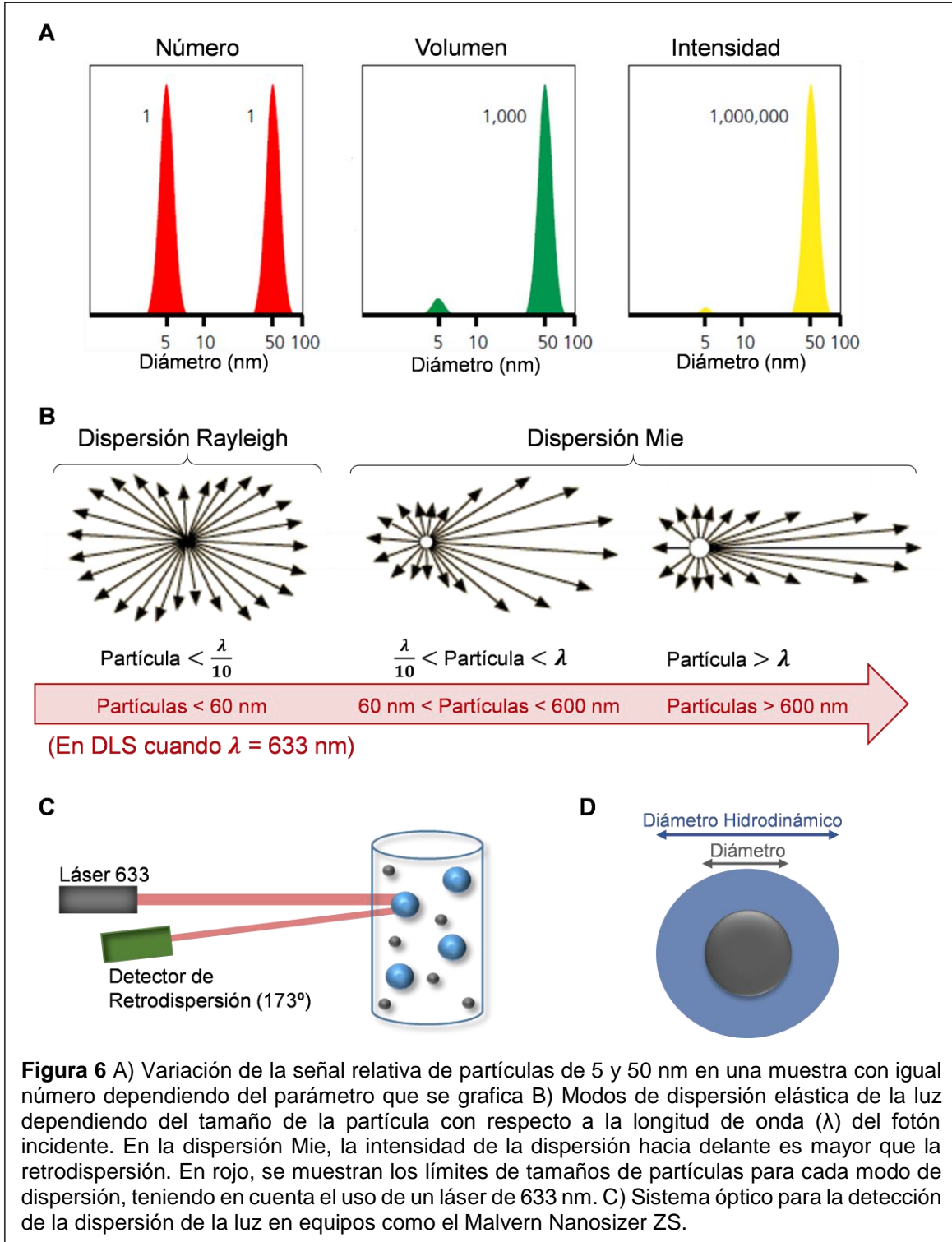
### 1.1.5.2 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Cuando la radiación EM interactúa con la materia, una parte de los fotones se dispersa en todas las direcciones de manera elástica o inelástica (ver **Figura 5** y ecuaciones **5a-d**). Los procesos de dispersión de fotones compiten con los procesos de absorción anteriormente descritos, los cuales dependen de las propiedades de la muestra. Por esta razón, antes de caracterizar un coloide de NPs metálicas por DLS, se debe conocer el espectro de absorción del mismo. Cuando la longitud de onda del láser implementado en el equipo DLS se encuentra en el rango de absorción de la muestra, los fenómenos de absorción afectarían la detección de fotones dispersados que permiten determinar el tamaño de la NP. Este es un aspecto importante a tener en cuenta cuando queremos caracterizar una muestra por DLS.

Las partículas en una solución no están estáticas, sino que presentan un movimiento Browniano (movimiento al azar). Por ello, la medición en tiempo real de la dispersión de la luz por las partículas en solución resulta en una dispersión dinámica. La velocidad de difusión de una partícula en el medio depende de su tamaño, la temperatura (T) y la viscosidad del medio ( $\eta$ ) de la manera que se expresa en la relación de Stokes-Einstein (ver ecuación **9(9)**), donde k es la constante de Boltzmann ( $k= 1.381 \times 10^{-23} \text{J/K}$ ).

$$(9) D = \frac{k T}{3\pi\eta(DH_p)}$$

En la técnica de DLS se utiliza el fenómeno de dispersión elástica de la luz para determinar el coeficiente de difusión (D) de las partículas en una suspensión. En cada medición, se introducen los valores de T y  $\eta$  (tipo de solvente). Con los datos anteriores, el programa calcula el diámetro hidrodinámico de las partículas (DH) basado en la equivalencia con una partícula esférica con igual coeficiente de difusión. Cabe señalar que el DH es mayor que el diámetro real de la partícula (ver **Figura 6D**), pues las partículas en solución presentan una capa de solvatación. La presencia de moléculas orgánicas como el PEG en la superficie de NPs esféricas también contribuye a incrementar el DH.



**Figura 6** A) Variación de la señal relativa de partículas de 5 y 50 nm en una muestra con igual número dependiendo del parámetro que se grafica B) Modos de dispersión elástica de la luz dependiendo del tamaño de la partícula con respecto a la longitud de onda ( $\lambda$ ) del fotón incidente. En la dispersión Mie, la intensidad de la dispersión hacia delante es mayor que la retrodispersión. En rojo, se muestran los límites de tamaños de partículas para cada modo de dispersión, teniendo en cuenta el uso de un láser de 633 nm. C) Sistema óptico para la detección de la dispersión de la luz en equipos como el Malvern Nanosizer ZS.

En esta técnica, es importante tener en cuenta como varía la señal relativa de poblaciones de partículas con diferentes tamaños en la muestra. La intensidad de la dispersión es  $I_d \propto (DH)^6$ , por esta razón, en el análisis de una muestra con igual

número de partículas de 5 y 50 nm, en los gráficos de intensidad en función de DH, la señal de las partículas de 50 nm es mucho mayor que la de 5 nm (ver **Figura 6A**). En ocasiones, esto conlleva a que la presencia de NPs pequeñas quede enmascarada por las partículas más grandes. En los gráficos de volumen (V) en función del DH, la diferencia de señal entre los picos es menor, pues  $V = \frac{4}{3\pi} \left(\frac{DH_p}{2}\right)^3$ . Esta técnica da información sobre el tamaño de las poblaciones presentes y no se debe confundir la diferencia de intensidad de los picos que representan poblaciones de diferentes tamaños con la concentración relativa de cada población de partículas en la muestra.

Al emplear un láser de 633 nm, se asegura tener dispersión Rayleigh en partículas menores de 60 nm (ver **Figura 6B**). La tecnología de retro-dispersión (ver **Figura 6C**) no invasiva ofrece una mayor sensibilidad y permite el análisis de un mayor rango de concentración y tamaño. Al medir la señal de dispersión en un ángulo de 173°, se reduce la dependencia de la intensidad de dispersión para partículas mayores de 60 nm (ver **Figura 6B**). Esto favorece la exactitud de los cálculos involucrados para determinar el tamaño de las partículas.

### 1.1.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La TEM es una de las técnicas más precisas para determinar forma y tamaño de NPs. A diferencia de las técnicas anteriores (espectroscopia de absorción UV/Vis y DLS), la TEM analiza las NPs en una muestra seca. Un aspecto a tener en cuenta es que en ocasiones, en las imágenes TEM se pueden observar agregados que no están presentes en la suspensión coloidal. Esto se debe a que durante la preparación de la muestra pueden ocurrir procesos de agregación de las NPs metálicas.

En las imágenes TEM de alta resolución se puede observar la estructura cristalina del material. El procesamiento de dichas imágenes (empleando programas como Gatan) permite medir las distancias interplanares que son características de la estructura cristalina de cada material. La estructura cristalina de NPs metálicas se

puede confirmar por la técnica de difracción de rayos X (XRD, siglas del inglés: *X-ray diffraction*), la cual requiere de grandes cantidades de la muestra de NPs seca.

En TEM se analiza un volumen muy pequeño de muestra (menos de 10  $\mu\text{L}$ ), por lo cual es difícil obtener resultados estadísticamente concluyentes (Lim *et al.*, 2013). Teniendo esto en cuenta, para realizar un buen análisis de la distribución de tamaño de las NPs presentes en un coloide, se requiere que la muestra tomada sea representativa del coloide y medir más de 300 NPs en las imágenes TEM.

### **Fundamento teórico del TEM**

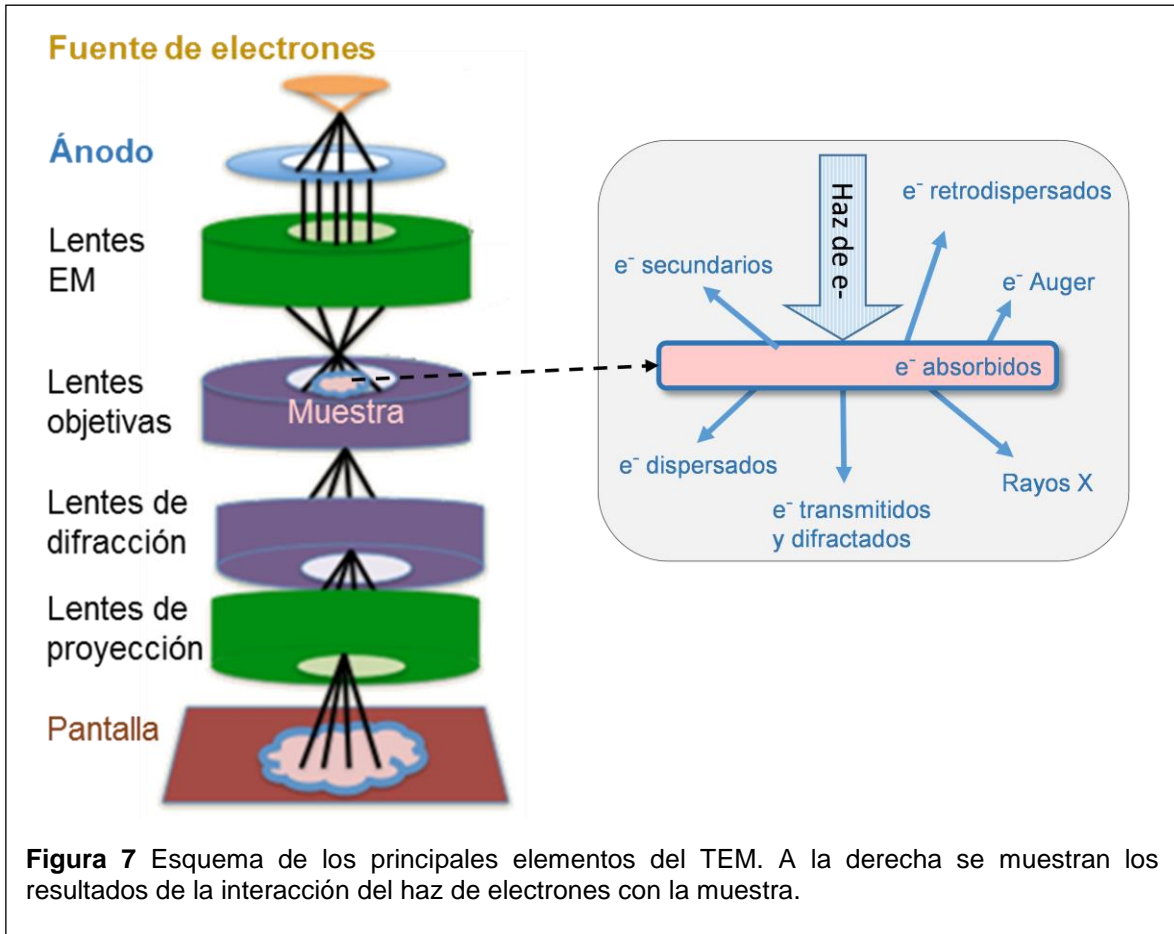
En 1924, el físico francés Louis De Broglie sugirió que una partícula libre (ej. electrón) con masa en reposo  $m$ , que se mueve con una velocidad  $v$  no relativista, debe tener una longitud de onda  $\lambda$  relacionada con su cantidad de movimiento ( $p = mv$ ) como se expresa en la ecuación **10**. (Hugh D. *et al.*, 2009)

$$(10) \quad \lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv}$$

Tres años más tarde (1927), un experimento realizado por Clinton Davisson y Lester Germer confirma la hipótesis de De Broglie calculando la  $\lambda$  del electrón en función del momento  $p$  (ver ecuación **10**). De esta ecuación es evidente que mientras mayor sea la velocidad de la partícula, menor es su longitud de onda.

En el microscopio electrónico de transmisión, se generan electrones en la fuente (ver **Figura 7**), los cuales son atraídos por el ánodo y acelerados por una diferencia de potencial. La velocidad de los electrones se controla por el voltaje (diferencia de potencial). La ecuación **11** muestra la relación entre el voltaje y la longitud de onda del electrón. Mientras mayor es el voltaje, mayor es la velocidad de los electrones y menor su longitud de onda. Esto es lo que permite alcanzar la resolución atómica ( $1\text{\AA}$ ) en este sistema.

$$(11) \quad \lambda = \frac{h}{\sqrt{2meV}}$$



En el TEM se emplean lentes electromagnéticas (EM) para enfocar el haz de electrones sobre la muestra. Al incidir el haz de electrones en la muestra, se generan distintos procesos como se muestra en el recuadro a la derecha en la **Figura 7**. Los electrones transmitidos pasan por lentes objetivas y finalmente forman una imagen de la muestra en la pantalla fluorescente.

### Generación de rayos X

En el microscopio electrónico de transmisión, cuando los electrones acelerados por la diferencia de potencial impactan en la muestra, pueden provocar la pérdida de electrones en las capas internas de los átomos que la conforman. Como resultado, se produce una transición de un electrón de las capas más externas hacia una capa más interna para ocupar la posición del electrón perdido. Cuando este electrón pasa a un estado de menor energía, se forma un fotón (rayos X) con una  $\lambda$  que se corresponde con la diferencia de energía entre los dos niveles. Como cada elemento

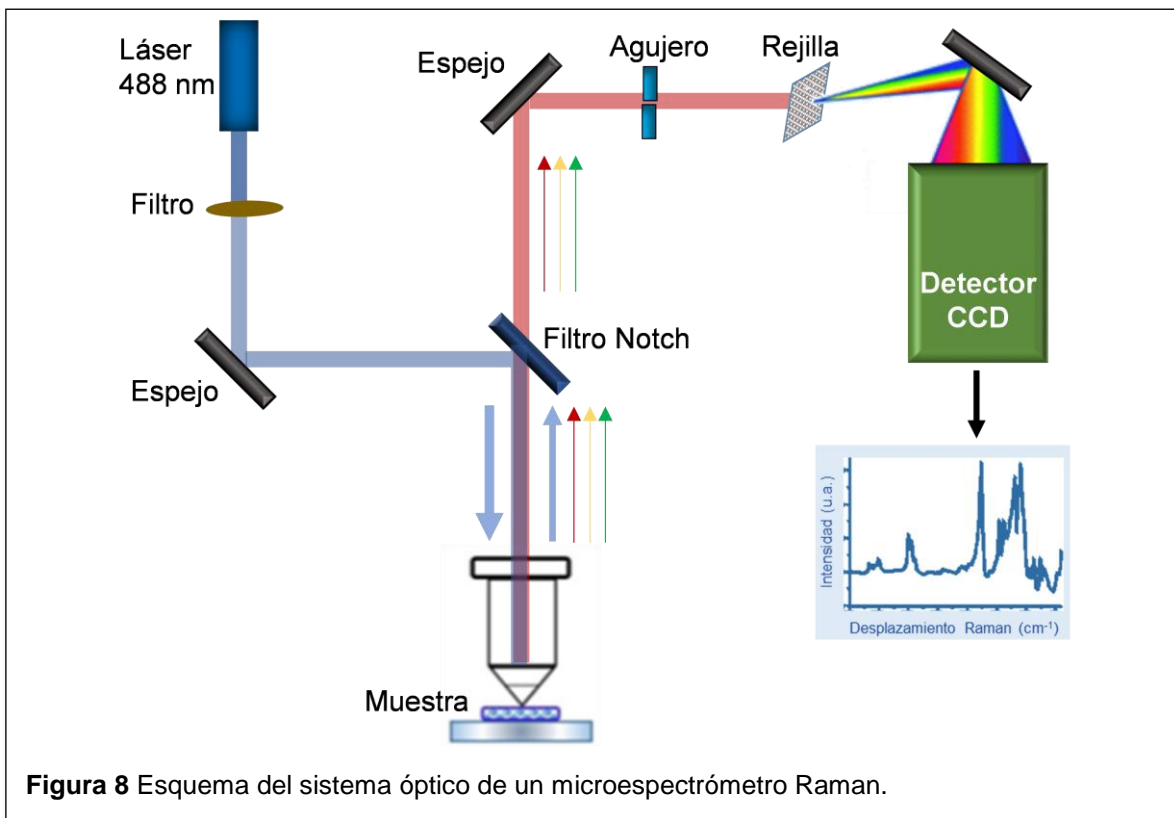


tiene una distribución única de sus niveles de energía, los rayos X son característicos de cada elemento, por lo que brindan información sobre la composición del material.

Por lo general, el microscopio electrónico de transmisión tiene acoplada una unidad de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS, siglas del inglés: *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) que permite determinar la composición de la muestra por la detección de los rayos X.

#### 1.1.5.4 Micro-espectroscopía Raman

En el micro-espectroscopio Raman, el sistema de excitación y colección de la señal Raman se encuentra acoplado a un microscopio óptico, lo cual permite el análisis de un volumen muy pequeño de la muestra (ver **Figura 8**).



En este equipo se emplea un láser de excitación (monocromático) cuya intensidad se puede atenuar mediante filtros. Como se muestra en el esquema de la **Figura 8**, el camino óptico del láser se traza con la ayuda de espejos. El láser se enfoca en la

muestra mediante un objetivo y por esta misma vía se colecta la señal de dispersión Raman. Para evitar que la señal de dispersión Rayleigh interfiera con la señal de dispersión Raman que es más débil (ver ecuaciones **5a-d**), los espectroscopios Raman disponen de un filtro "Notch" o espejo dicróico que bloquea, por reflexión, el paso de la señal de dispersión Rayleigh al monocromador. Luego, la señal pasa por una rejilla de difracción que separa las diferentes longitudes de onda de los fotones dispersados inelásticamente, los cuales son detectados por una cámara CCD.

Para incrementar la intensidad de la señal Raman que se colecta en este sistema, en nuestros experimentos se emplearon obleas de silicio pulidos, que funcionan como un espejo. En estas obleas el pico intenso y estrecho de la señal Raman del silicio cristalino a  $520\text{ cm}^{-1}$  se puede emplear para calibrar el equipo. Sin embargo, el óxido de silicio que se forma sobre la oblea de silicio tiene un pico de menor intensidad y ancho entre  $900$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  que interfiere con el espectro Raman de las células, el cual generalmente se colecta entre  $600$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$ .

## **1.2 Nanopartículas metálicas**

### **1.2.1 Definición y propiedades**

En un átomo, los electrones se mueven en orbitales atómicos que se ubican en determinados "niveles de energía". En un metal, los átomos se encuentran formando una red cristalina y los electrones pueden encontrarse en "bandas" que representan la superposición de niveles de energía atómicos del mismo tipo muy cercanos entre sí. En este sentido, se definen dos bandas importantes que ayudan a clasificar un material en términos de su capacidad para conducir la corriente eléctrica: la banda de valencia y la banda de conducción. En un metal, siempre habrá electrones en la banda de conducción. Estos electrones, pueden moverse en el metal y conducen la corriente eléctrica (aunque con determinada resistencia debido a interacciones electrón-fonón).

Al comparar una partícula que presenta propiedades de bulto, con una nanopartícula ( $<100\text{ nm}$ ), se observa que la densidad electrónica de estados "casi-

continuos" en la banda de conducción cambia drásticamente y se produce un desdoblamiento de la banda en sub-bandas de mayor energía.

Una nanopartícula se define como un material con dimensiones menores de 100 nm en al menos una de sus dimensiones, cuyas propiedades físico-químicas cambian con respecto a las de partículas del mismo material pero de un mayor volumen (propiedades de bulto) (Sapsford *et al.*, 2013). Este trabajo se enfoca en las NPs metálicas, por lo que a continuación describiremos brevemente algunas de las bases físicas que dan origen al surgimiento de las propiedades ópticas características de estas NPs.

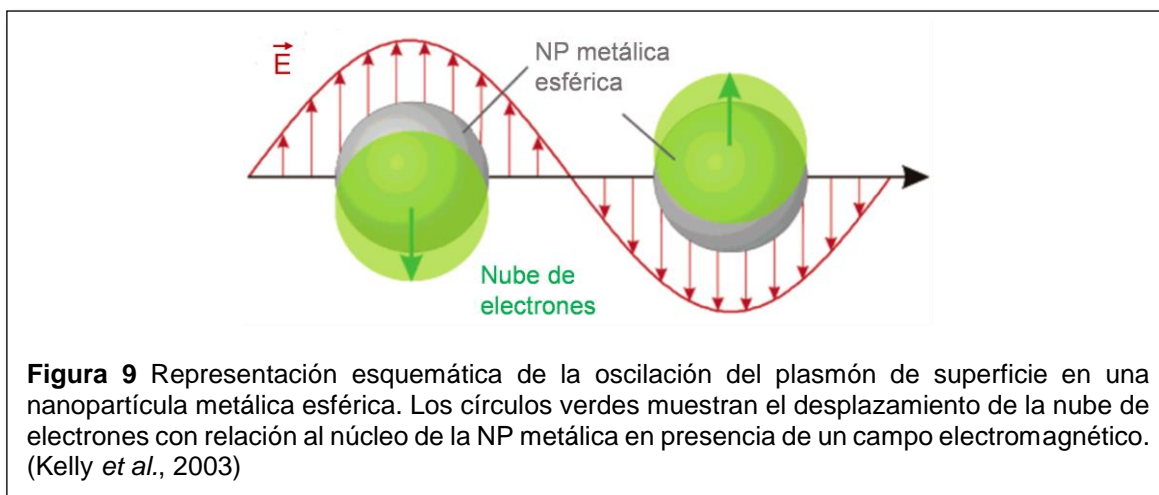
Cuando en un metal el movimiento de los electrones de conducción se encuentra restringido a una región muy pequeña del espacio (del orden de los nanómetros), se dice que los electrones están confinados. En una NP metálica, la oscilación de los electrones de conducción se encuentra restringida (confinada) a un volumen muy pequeño. Como consecuencia del confinamiento electrónico, en las NPs se manifiestan propiedades ópticas, electrónicas, electromagnéticas, magnéticas y eléctricas, diferentes a las partículas de mayor tamaño (mayores que 1  $\mu\text{m}$ ) del mismo material (bulto).

Las propiedades ópticas de las NPs metálicas varían con la forma y el tamaño de las mismas, ya que dependen de la frecuencia de plasmón de estas NPs (que se describirá en los próximos párrafos). Esta dependencia de las propiedades físicas de las NPs con su tamaño es lo que se conoce como efecto de tamaño cuántico.

#### **1.2.1.1 Plasmón de nanopartícula y su resonancia (LSPR)**

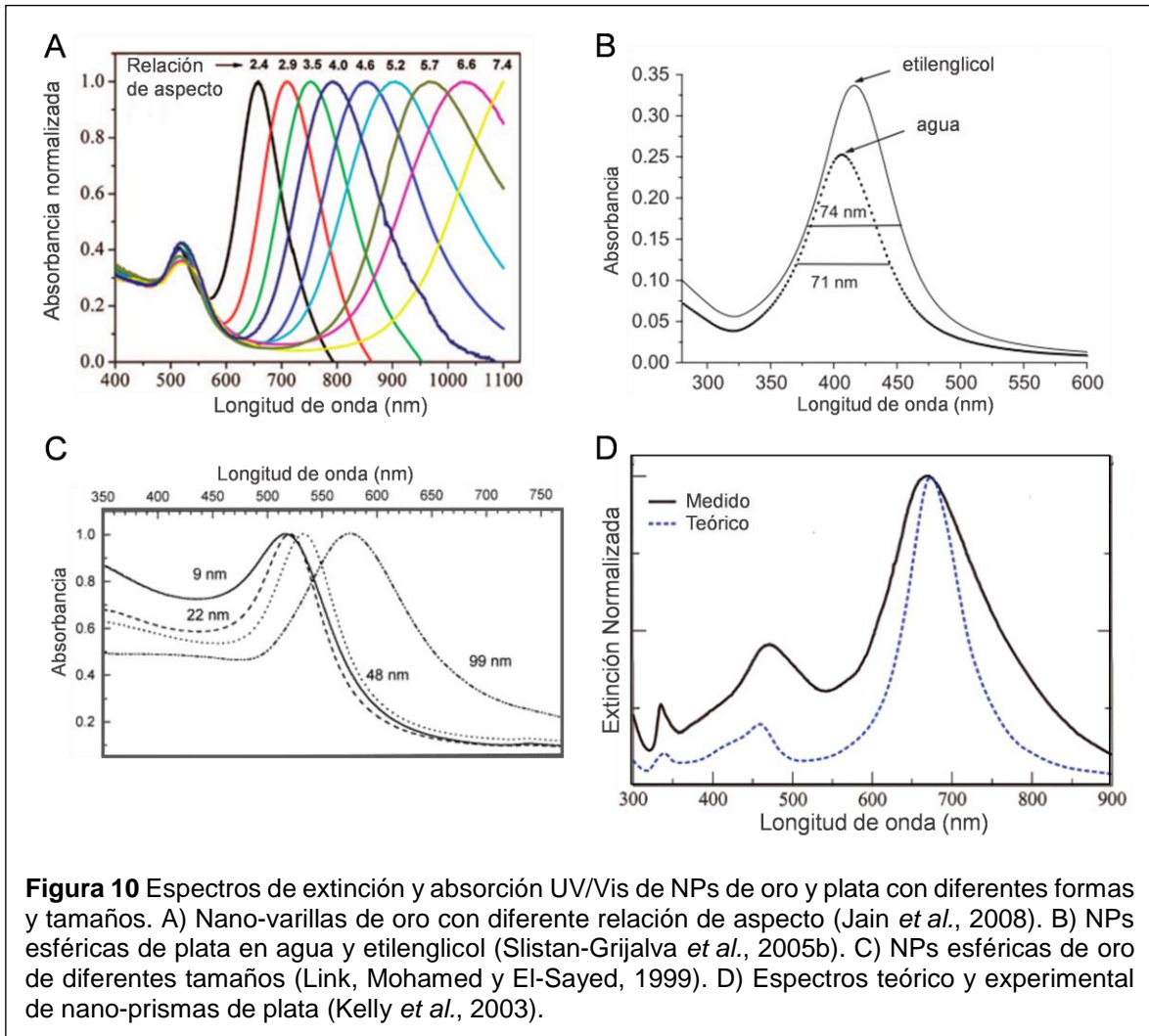
Las dimensiones de una NP son mucho menores que la longitud de onda ( $\lambda$ ) de una radiación en el rango visible del espectro EM. Por esta razón, cuando incide una radiación EM en una NP de plata esférica, con diámetro (d) tal que  $d < \lambda/10$ , los electrones de conducción de la NP se mueven de manera coherente y colectiva en la dirección (pero en sentido contrario) del campo eléctrico, mientras que los "iones positivos" (formados por los núcleos y los electrones internos) permanecen relativamente inmóviles. Durante la oscilación del plasmón, se produce un desplazamiento de las cargas negativas (de la nube de electrones de conducción)

hacia un extremo de la NP, predominando una densidad de carga positiva (iones positivos) en el extremo contrario de la misma. Esta distribución de cargas es solo "transitoria" ya que las fuerzas de Coulomb (fuerzas de atracción entre las cargas opuestas) provocan el movimiento de la nube de electrones en sentido contrario (ver **Figura 9**). De esta manera, se produce una oscilación del plasmón de la NP con una frecuencia que depende de la densidad de electrones, la masa efectiva de los electrones, la forma y el tamaño de la distribución de carga. Si la frecuencia de la radiación EM incidente es diferente de la frecuencia del plasmón de la NP, se producen mayormente eventos de dispersión de la radiación EM. En cambio, cuando la frecuencia de la radiación EM es igual a la frecuencia del plasmón, la NP absorbe la radiación EM y se produce una oscilación coherente y colectiva de los electrones de conducción con igual frecuencia pero con una amplitud máxima (ver **Figura 9**). Este fenómeno es conocido como resonancia del plasmón de superficie localizada (LSPR, siglas del inglés: *Localized Surface Plasmon Resonance*). (Kelly *et al.*, 2003)



La excitación del plasmón en las NPs metálicas se produce por la absorción selectiva de fotones. La longitud de onda que produce la LSPR depende del tamaño, la forma y la composición de las NPs metálicas presentes en el coloide, de efectos de acoplamiento de plasmones (en el caso de conjuntos de NPs) y de las propiedades dieléctricas del medio donde se encuentran dispersas dichas NPs (ver **Figura 10**). De esta forma, la espectroscopía de absorción en el UV/vis, permite la

detección de NPs metálicas en una suspensión coloidal por la banda de absorción asociada a la LSPR (Lim *et al.*, 2013).



La absorción del plasmón de las NPs de plata es más fuerte y estrecha (menor rango de  $\lambda$ ) que en las NPs de oro (NPAus). La LSPR de NPAus esféricas entre 10 y 100 nm, se encuentra en longitudes de onda entre 515-575 nm mientras que en NPAgs esféricas de igual tamaño, la LSPR se desplaza hacia longitudes de onda más cortas (400-525 nm) (ver **Figura 10B, C**). En el espectro de extinción UV/vis de NPs esféricas de igual composición, el desplazamiento del máximo del pico hacia menores longitudes de onda suele estar relacionado con la presencia de NPs más pequeñas (ver **Figura 10C**). (Sapsford *et al.*, 2013)

Las NPs esféricas presentan un único pico en el espectro de absorción (ver **Figura 10B, C**) mientras que las NPs anisotrópicas (como nanovarillas y prismas) muestran más de un pico (ver **Figura 10A, D**). La posición del pico depende de la composición y tamaño de las NPs (ver **Figura 10B, C**). Las propiedades dieléctricas del medio también influyen en el ancho y posición del pico (ver **Figura 10B**).

Como se explicó anteriormente, la LSPR determina la aparición de propiedades ópticas en las NPs metálicas que no están presentes en un volumen mayor del mismo material. La LSPR en NPs de plata y NPs de oro (NPAu) provocan una fuerte absorción y dispersión de la luz, que permite su aplicación en el área biomédica entre otras. (Sapsford *et al.*, 2013)

#### **1.2.1.2 Algunas aplicaciones biomédicas**

Uno de los efectos del LSPR, es que provoca una amplificación del campo eléctrico en la superficie de la NP metálica con efecto en moléculas muy cercanas a su superficie. Esto aumenta la sensibilidad en técnicas de obtención de imágenes por efecto SERS o fluorescencia (Schatz, Young y Van Duyne, 2006; Willets y Van Duyne, 2007; Feng *et al.*, 2015).

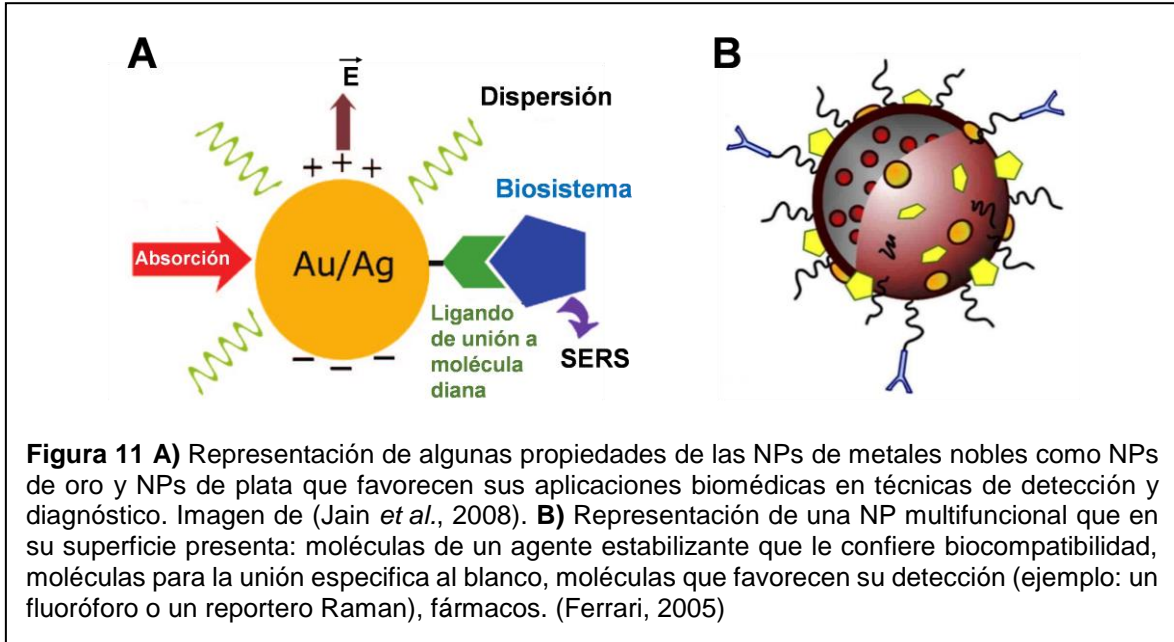
El fuerte campo EM generado en la superficie de las NPs metálicas por efecto del LSPR, puede apagar la fluorescencia de cromóforos ubicados a 5 nm (o menos) de la superficie de la NP por el efecto de transferencia de carga (el cromóforo dona electrones excitados a la NP metálica). En cambio, la fluorescencia de cromóforos ubicados a 10 nm (o más) se incrementa hasta 100 veces, pues a esta distancia no ocurre transferencia de carga pero el campo EM aún es fuerte y aumenta la probabilidad de fluorescencia. De esta forma, empleando "ligandos" de un tamaño adecuado se pueden unir fluoróforos moleculares a NPs metálicas para incrementar su fluorescencia. (Stewart, 2008)

Por otro lado, la señal Raman de moléculas cercanas a la superficie de la NP metálica se ve incrementada (SERS). Uno de los mecanismos que explica esto es el efecto electromagnético. La amplificación del campo EM en la superficie de la NP, incrementa la probabilidad de que ocurran eventos de dispersión Raman en

moléculas cercanas a su superficie (ver **Figura 11A**). (Jain *et al.*, 2008; Lane, Qian y Nie, 2015)

El espectro de absorción del LSPR es sensible a las propiedades dieléctricas del medio que la rodea, más importante que el medio en que se encuentra son las moléculas adsorbidas en la superficie de la NP. Esto se emplea para la detección de moléculas y es una herramienta muy versátil que requiere de la funcionalización de la superficie de la NP para su unión a la molécula de interés (Haynes *et al.*, 2005). En esta aplicación los cambios en el espectro de absorción (ancho, posición, intensidad) dependen de la concentración de la molécula de interés y la naturaleza de la misma.

Además, el tamaño de estas NPs favorece su aplicación en el estudio de sistemas biológicos. Algunas de estas NPs podrían entrar a la célula, lo cual no depende solo de su tamaño sino también de su carga y la presencia de ciertas moléculas en su superficie. El área superficial de estas NPs favorece la obtención de NPs multifuncionales (ver **Figura 11B**) que tengan en su superficie moléculas que le confieran especificidad por un tejido o célula en particular (ejemplo: fragmentos Fab) (Giljohann *et al.*, 2010). Estas NPs pueden transportar fármacos (nanocarriers). En cambio, otras NPs pueden servir para la destrucción del tejido maligno, como las NPs de oro que pueden absorben energía y la disipan en forma de calor. Las NPs también se emplean como biosensores, por ejemplo, las NPs con propiedades plasmónicas que tienen en su superficie una molécula de señal Raman conocida, permite el seguimiento de dicha NP por la colección de dicha señal empleando técnicas adecuadas. Entre las aplicaciones biomédicas de las NPs se define el término teranóstico = terapia + diagnóstico, para referirse al diseño de NPs multifuncionales que favorezcan el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Yu *et al.*, 2012; Cole y Holland, 2015).



### 1.2.2 Mecanismos de formación de nanopartículas

Un cristal o sólido cristalino consiste en el arreglo ordenado de átomos o iones en un sólido. Las NPs de plata son estructuras cristalinas donde se pueden encontrar diferentes tipos de arreglos de los átomos de plata que se corresponden con fases cristalinas. En un cristal, se forman núcleos (o semillas) a partir de los cuales comienza a crecer la estructura cristalina para formar la NP. De esta manera, en la formación de NPs metálicas están involucrados procesos de nucleación y crecimiento del cristal.

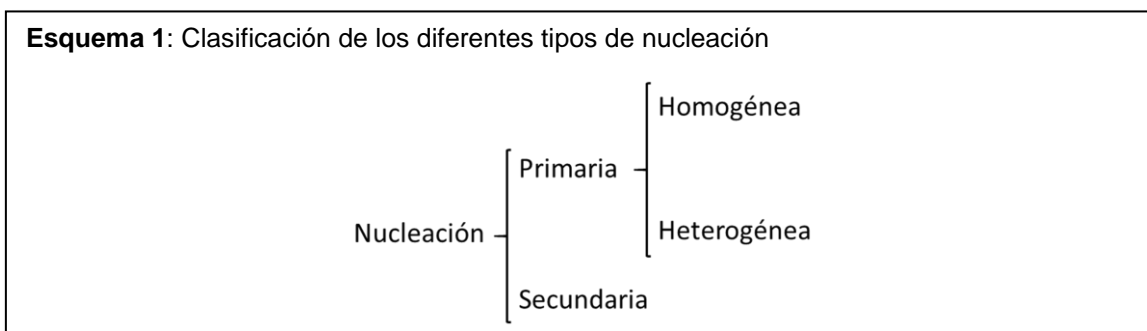
Aún no se conoce con exactitud cómo se forman los núcleos cristalinos estables dentro de un fluido homogéneo, pero existen varias teorías sobre los procesos de nucleación y crecimiento de las NPs. Un núcleo cristalino estable puede estar formado por decenas o miles de átomos (o moléculas). Debido al pequeño tamaño de los núcleos y el breve tiempo en que estos permanecen como tal, resulta difícil estudiarlos. Se piensa que pueden ser cristalinos o podrían ser una disposición dispersa de átomos (Mullin, 2001). Durante la formación de los núcleos, existen fuerzas que tienden a re-disolverlos cuando estos no han alcanzado el "radio crítico" (ver **Figura 12A**). Según la teoría de LaMer (que se describe en la sección 1.1.2.3),



una vez que se forman núcleos con un radio mayor al radio crítico (núcleos estables sean o no cristalinos), se favorece el crecimiento de los mismos formando NPs cristalinas.

### 1.2.2.1 Nucleación de nanopartículas

Teniendo en cuenta que el término "nucleación" se ha empleado para describir diferentes procesos, en el **Esquema 1** se clasifican los distintos tipos de nucleación y a continuación definiremos cada una de estas clasificaciones.



La nucleación se refiere al proceso de formación de núcleos a partir de los cuales crece una estructura cristalina. La nucleación primaria es aquella donde se forman núcleos a partir de la fase primaria, es decir, en ausencia de materia cristalina. En cambio, la nucleación secundaria ocurre en soluciones sobresaturadas en la vecindad de cristales (semillas) presentes en la solución. Como se observa en el esquema anterior, la nucleación primaria puede ser homogénea o heterogénea. La nucleación homogénea ocurre cuando los núcleos se forman uniformemente en la fase primaria de manera espontánea mientras que la nucleación heterogénea se forma en las in-homogeneidades estructurales (superficies de los recipientes, impurezas, límites de grano). (Mullin, 2001; Thanh, Maclean y Mahiddine, 2014)

En los métodos empleados en nuestro estudio para la obtención de NPs de plata, se formaron mayormente NPs casi esféricas. En las síntesis se emplearon soluciones con bajas concentraciones del precursor de plata (0.1 - 0.2 mM de AgNO<sub>3</sub>) y se crearon condiciones para partir de una fase primaria (solución del precursor de plata en el medio reductor y/o estabilizante) libre de cristales. Como nuestro sistema es cercano a lo que se describe como nucleación homogénea,

decidimos incluir en este capítulo de estado del arte, aspectos teóricos relacionados con procesos de nucleación homogénea.

### **Teoría clásica de nucleación (TCN)**

La teoría clásica de nucleación fue desarrollada por varios investigadores, entre los que destacan los trabajos publicados por Volmer y Weber en 1926 y el de Becker y Doring en 1935. Estos autores, siguiendo el trabajo fundamental de Gibbs, modelaron la cinética de los grupos sub-críticos y la velocidad de nucleación resultante. En sus enfoques, estos autores asumieron que la formación de núcleos no disminuía localmente la disponibilidad de monómeros y que la velocidad de nucleación permanecía estable. Sin embargo, lo anterior no es consistente con la rápida formación de cristales nucleados en solución. Este fenómeno de nucleación en ráfaga encontró una explicación plausible en los trabajos de LaMer (1950-1952) (ver teoría de LaMer más adelante). (Robb y Privman, 2008)

La TCN se aplica a procesos de nucleación primaria homogénea que tiene bases termodinámicas y en la cual se forman núcleos a partir de la fase primaria. La termodinámica ayuda a predecir si un proceso puede ocurrir de manera espontánea, y esto depende del valor del cambio de energía libre o energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) del sistema. Si la energía libre de Gibbs en el estado final es menor que su valor en el estado inicial, entonces  $\Delta G < 0$  y el proceso puede ocurrir de manera espontánea.

Durante la síntesis de una NP esférica en solución, la energía libre de Gibbs varía en función del radio ( $r$ ) de la NP ( $\Delta G(r)$ ). La  $\Delta G(r)$  se define como la suma del cambio de la energía libre en la superficie  $\Delta G_s$  y la variación de la energía libre de volumen  $\Delta G_v$  (ver ecuación **12**).

$$(12) \quad \Delta G(r) = \Delta G_s + \Delta G_v$$

Asumiendo que la partícula que se forma es esférica, su área superficial y su volumen estarían dados por las ecuaciones **13a** y **13b**, respectivamente.

$$(13) \quad \text{a) } A = 4\pi r^2 \quad \text{b) } V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

En la formación de NPs esféricas, las  $\Delta G_s$  y  $\Delta G_v$  de la ecuación **12**, estarían dados por las ecuaciones **14a** y **14b**, respectivamente.

$$(14) \quad a)\Delta G_s = 4\pi r^2\gamma \quad b)\Delta G_v = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v$$

De las expresiones **14 a-b** resulta evidente que  $\Delta G_s$  y  $\Delta G_v$  tienen una dependencia diferente con respecto al radio de la NP. La  $\Delta G_s$  es el exceso de energía libre entre la superficie de la NP y el volumen de la NP, depende del radio ( $r^2$ ) y de la tensión de interfase por unidad de área ( $\gamma$ ) que es la tensión entre la superficie cristalina que se forma y la solución sobresaturada en la que se encuentra la NP. En cambio, el  $\Delta G_v$  es el exceso de energía libre entre una partícula y el soluto en la solución, varía proporcionalmente con  $r^3$ , y depende del cambio de energía libre de Gibbs por unidad de volumen de la fase sólida ( $\Delta G_v$ ).

Como muestra la ecuación **15**,  $\Delta G_v$  (note que  $\Delta G_v \neq \Delta G_v$ ) depende de la temperatura absoluta ( $T$ ), la constante de Boltzman ( $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  J/K), el volumen molar ( $V_m > 0$ ) y el logaritmo neperiano de la sobresaturación de la solución ( $S$ ). A su vez,  $S = C/C_o$ , donde  $C$  es la concentración del soluto,  $C_o$  es la concentración de equilibrio o solubilidad del soluto. Sin sobresaturación ( $S=1$ ),  $\Delta G_v = 0$  y no se produciría la nucleación. Cuando  $C > C_o$ ,  $\Delta G_v < 0$  y  $\Delta G_v < 0$ .

$$(15) \quad \Delta G_v = \frac{-k_B T \ln S}{V_m} = \frac{-k_B T \ln\left(\frac{C}{C_o}\right)}{V_m}$$

La ecuación anterior es válida para  $T > 0^\circ\text{K}$  (en todos los procesos de formación de NPs  $T > 0^\circ\text{K}$ ), soluciones saturadas o sobresaturadas,  $S > 1$  que favorecen la formación de un núcleo, pues el  $\ln(n < 0)$  no existe en el dominio de los números reales. Por tanto,  $\Delta G_v \leq 0$ .

Para que la nucleación se produzca de manera espontánea, debe cumplirse que  $|\Delta G_s| < |\Delta G_v|$  (módulos de  $\Delta G_v$  y  $\Delta G_s$ ). Cuando comienza el proceso de nucleación primaria homogénea, el radio del núcleo es muy pequeño ( $r \ll 1$  nm), y por tanto,  $r^2 > r^3$ , por lo cual para algunos valores de  $r$  se cumple que  $|\Delta G_s| > |\Delta G_v|$ , y entonces  $\Delta G(r)$  sería positivo, por lo que las partículas que forman el núcleo tienden a re-disolverse. En cambio, para  $r > r_c$ , ( $r_c$ : radio crítico),  $|\Delta G_s| < |\Delta G_v|$ , y entonces  $\Delta G(r) < 0$ , por lo que el proceso de formación del núcleo ocurre de manera espontánea y ya no se va a re-disolver en la solución. De esta forma, cuando el

tamaño de un núcleo alcanza el valor del radio crítico ( $r_c$ ), llega a un punto de inflexión en el gráfico de  $\Delta G(r)$  (ver **Figura 12A**). El  $r_c$  se define como el tamaño mínimo que debe alcanzar un núcleo en solución para sobrevivir sin re-disolverse (ver ecuación **16**). Este  $r_c$  corresponde a un valor de energía crítica ( $\Delta G_c$ ), la cual se define como la variación de energía libre mínima necesaria para la formación de núcleos estables (ver ecuación **17a**).

Para determinar el  $r_c$  podemos buscar el punto donde  $\Delta G_v = \Delta G_s$  y por tanto  $\Delta G(r)=0$ . En estas condiciones, al derivar, vamos a obtener la pendiente (m) de la curva, y en este punto de inflexión:  $m=0$  (ver líneas discontinuas en la **Figura 12A**). Es por ello que para hallar el  $r_c$  se calcula la derivada de  $\Delta G(r)$  en función del radio y se iguala a cero. Los cálculos para determinar  $r_c$  y  $\Delta G_c$  se muestran a continuación.

$$\frac{d(\Delta G(r))}{dr} = 0$$

$$\frac{d}{dr} (\Delta G_s + \Delta G_v) = 0$$

$$\frac{d}{dr} \left( 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v \right) = 0$$

(Como  $\Delta G_v$  no depende de  $r$ , se considera constante al derivar.)

$$8\pi r \gamma + 4\pi r^2 \Delta G_v = 0$$

$$4\pi r^2 \Delta G_v = -8\pi r \gamma$$

$$(16) \quad r_c = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v}$$

Luego, conociendo el  $r_c$ , se puede calcular  $\Delta G_c$ :

$$\Delta G_c = 4\pi \gamma r_c^2 + \frac{4}{3} \pi r_c^3 \Delta G_v = \pi r_c^2 \left( 4\gamma + \frac{4}{3} \Delta G_v r_c \right)$$

Sustituyendo la ecuación **16** en la siguiente expresión obtengo la ecuación **17**

$$\Delta G_c = \pi r_c^2 \left( 4\gamma + \frac{4}{3} \Delta G_v \left( \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} \right) \right) = \pi r_c^2 \left( 4\gamma - \frac{8\gamma}{3} \right) = \pi \gamma r_c^2 \left( 4 - \frac{8}{3} \right)$$

$$(17) \quad \text{a) } \Delta G_c = \frac{4}{3} \pi \gamma r_c^2 \quad \text{b) } \Delta G_c = \frac{16\pi\gamma^3}{3 \Delta G_v^2} = \frac{16\pi\gamma^3 V_m^2}{3 K_B^2 T^2 (\ln S)^2}$$

Los parámetros experimentales que influyen en la velocidad de nucleación de N partículas se pueden describir por la ecuación **18b**, la cual se obtiene al sustituir la ecuación **17a** en la ecuación **18a**. En la ecuación **18a**, A es el factor pre-exponencial y las variables son la sobresaturación (S), la temperatura (T) y la energía libre de superficie por unidad de área ( $\gamma$ ). Los parámetros experimentales que varían en esta ecuación son la sobresaturación (S), la temperatura y la energía libre de superficie. La variación de la energía libre de superficie está dada por el empleo de diferentes surfactantes. Un incremento de S=2 a S=4, o sea, al duplicar la relación C/C<sub>o</sub> (anteriormente se explicó quiénes eran C y C<sub>o</sub>) provoca un aumento de  $\sim 10^{70}$  en la velocidad de nucleación. Un incremento de S=2 a S=4, o sea, al duplicar la relación C/C<sub>o</sub> (anteriormente se explicó quiénes eran C y C<sub>o</sub>), provoca un aumento de  $\sim 10^{70}$  en la velocidad de nucleación. Cuando S=4, esto significa que la concentración del soluto C=4C<sub>o</sub>, siendo C<sub>o</sub> la concentración de equilibrio o solubilidad del soluto. En la ecuación **18b** se observa que un incremento en la temperatura o en la sobresaturación, reducen exponencialmente el valor del exponente de e, por lo que es mucho menor el denominador incrementándose la velocidad de nucleación.

$$(18) \quad \text{a) } \frac{dN}{dt} = A e^{\left(-\frac{\Delta G_c}{k_B T}\right)} \quad \text{b) } \frac{dN}{dt} = A e^{\left(-\frac{16 \pi \gamma^3 V_m^2}{3 k_B^3 T^3 (\ln S)^2}\right)} = \frac{A}{e^{\left(\frac{16 \pi \gamma^3 V_m^2}{3 k_B^3 T^3 (\ln S)^2}\right)}}$$

### Algunas limitaciones en la aplicación de la TCN

Merikanto J y colaboradores (2007) plantean que a veces no se observa en la práctica la dependencia de la velocidad de nucleación con la temperatura que se plantea en la TCN. En esta teoría, se asignan propiedades termodinámicas macroscópicas a sistemas moleculares que obedecen a los principios de la mecánica cuántica, lo que puede conducir a cálculos inexactos. El grupo de Merikanto realizó simulaciones moleculares por el método de Monte Carlo para calcular el trabajo de formación de grupos moleculares. Estos autores demostraron que la TCN puede predecir el trabajo relacionado con la adición de un monómero a un grupo que ha alcanzado un tamaño determinado (umbral de tamaño) entre 8 y 50 moléculas. Este umbral depende de la temperatura y la naturaleza química de la molécula. Sin embargo, en los efectos microscópicos relacionados con la formación

de los grupos pequeños, dado por la TCN, es preciso introducir un término de corrección para el trabajo de formación del grupo total. El valor del término de corrección es constante para todos los grupos por encima de dicho tamaño del umbral. (Merikanto *et al.*, 2007)

Por otro lado, Kim y colaboradores (2011) opinan que el principal error de origen microscópico de la TCN, es asumir una interfase plana para estructuras con superficie curva en el orden de los nanómetros. En esta escala, las moléculas de polímeros en una superficie curva tienen más grados de libertad que los posibles en una superficie plana. Por ejemplo, los polímeros en el exterior de una superficie curva en una partícula menor de 100 nm, pueden adoptar más conformaciones que en una interfase plana. Esto reduce la energía libre de la interfase curva, lo que conduce a una menor energía de barrera para la nucleación y, por tanto, la velocidad de nucleación es mucho mayor. (Kim *et al.*, 2011)

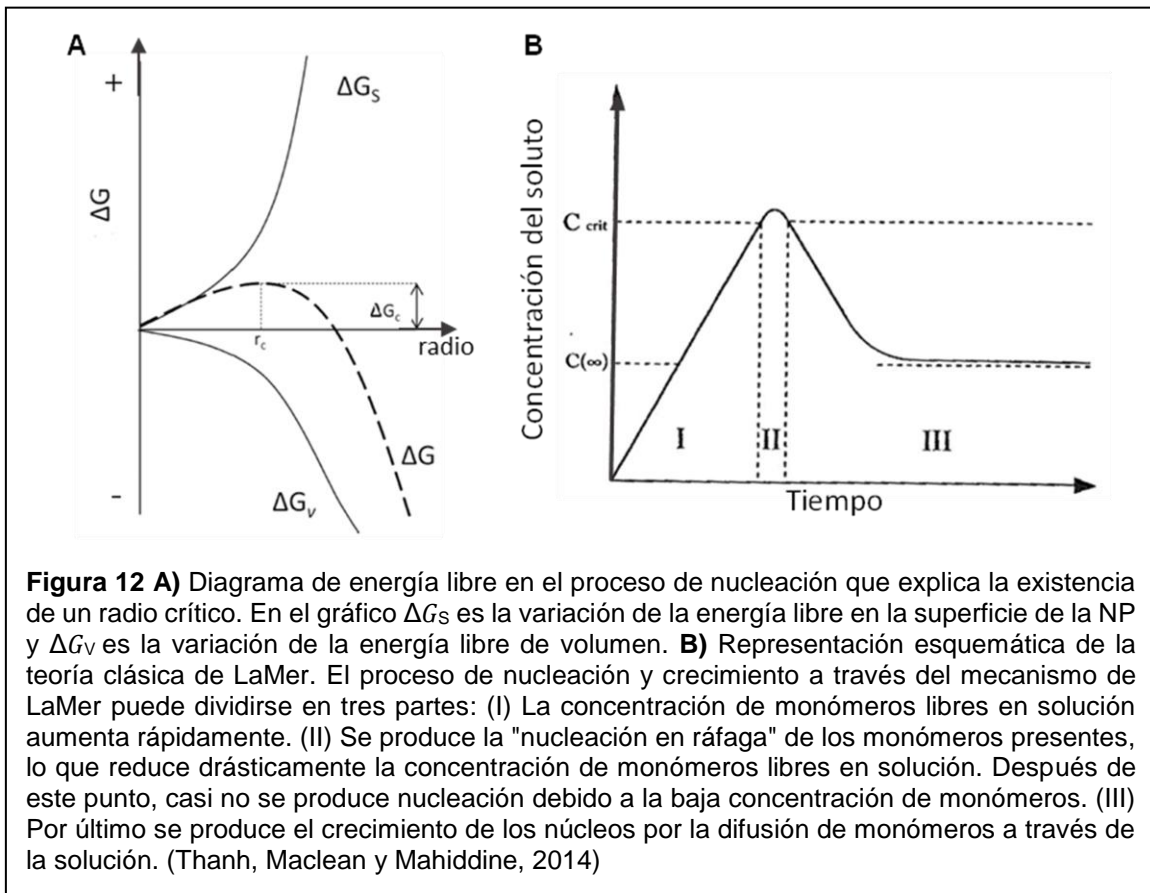
### **Teoría de LaMer**

La teoría de LaMer describe los mecanismos de nucleación y crecimiento para la formación de coloides o nanocristales a partir de un medio sobresaturado homogéneo en soluciones de sulfuros. En la **Figura 12B** se representa esquemáticamente el mecanismo de LaMer en un gráfico de concentración de soluto en función del tiempo. Este proceso de nucleación y crecimiento puede dividirse en tres partes como se ilustra en la **Figura 12B**.

Esta teoría sugiere que en la síntesis del coloide la concentración (C) del monómero aumenta rápidamente (por encima de la concentración de saturación ( $C_0$ )) durante un breve período de tiempo (etapa I en la **Figura 12B**). Cuando se alcanza una concentración crítica ( $C_{crit}$ ) de monómeros, se produce una nucleación en ráfaga, que consiste en la formación de un gran número de núcleos en un corto período de tiempo. Esto está asociado a un descenso de la concentración de monómeros en solución (etapa II en la **Figura 12B**). Luego, se produce una reducción más lenta de la concentración del monómero donde es mínima la nucleación (la concentración de monómero es muy baja impidiendo la formación de nuevos núcleos) y prevalece el crecimiento de las partículas a una velocidad más lenta en comparación con la

nucleación. De esta manera, se observa una separación en el tiempo de los procesos de nucleación y crecimiento de las partículas.

A partir del mecanismo descrito por LaMer se deduce que para lograr coloides monodispersos, es necesario alcanzar rápidamente una concentración crítica de monómeros que favorezcan una nucleación en ráfaga. Las velocidades de crecimiento que se grafican en la **Figura 12B**, reproducen consideraciones teóricas previas que permitieron estimar el valor del coeficiente de difusión del azufre. La aplicación de este método a la estimación de coeficientes de difusión será válida para cualquier sistema coloidal con baja dispersión de la distribución de tamaño de partículas en todas las etapas de su crecimiento. El mecanismo de LaMer se ha aplicado en los intentos de preparar varias partículas casi monodispersas en soluciones homogéneas, pero esto requiere ajustar cuidadosamente parámetros tales como la concentración de los reactivos.



### 1.2.2.2 Crecimiento de nanopartículas

El crecimiento de las NPs depende de dos mecanismos: la reacción en la superficie de la NP y la difusión de los monómeros a la superficie. A partir de la primera ley de Fick (ver ecuación **20**) para la difusión, se obtienen las ecuaciones que describen los procesos donde el factor limitante del crecimiento de la NP es la difusión del monómero a la superficie de la NP (ver ecuación **21**) o la velocidad de reacción de los monómeros en la superficie (ver ecuación **22**). En estas ecuaciones se expresa la relación entre el radio de la partícula ( $r$ ), el flujo total de monómeros que pasa a través de un plano esférico con radio  $x$  ( $J$ ), el coeficiente de difusión ( $D$ ) y la concentración a una distancia  $x$  ( $C$ ). Luego,  $C_b$  es la concentración total de monómeros dentro de la solución,  $C_i$  la concentración de monómeros en la interfase sólido / líquido,  $C_r$  la solubilidad de la partícula y  $k$  es la velocidad de reacción en la superficie de la NP.

El número de Damköhler  $K$  (ver ecuación **19**) indica si la reacción depende de la difusión o la reacción en la superficie del monómero. Si  $K \ll 1$ , entonces la difusión ( $D$ ) domina sobre la velocidad de reacción en la superficie ( $k$ ). Dependiendo del factor limitante del crecimiento de la NP, la velocidad de crecimiento de la NP ( $\frac{dr}{dt}$ ) se calcula empleando la ecuación **21** (cuando  $D$  es limitante), la ecuación **22** (cuando  $k$  es limitante) o la ecuación **23** cuando ninguno de los factores mencionados controla el crecimiento de la NP.

$$(19) \quad K = \frac{k_B T D}{2\gamma V_m k}$$

$$(20) \quad J = 4\pi x^2 D \frac{dC}{dx}$$

$$(21) \quad \text{a) } J = 4\pi D r (C_b - C_i) \quad \text{b) } \frac{dr}{dt} = \frac{D V_m}{r} (C_b - C_r)$$

$$(22) \quad \text{a) } J = 4\pi r^2 k (C_i - C_r) \quad \text{b) } \frac{dr}{dt} = k V_m (C_b - C_r)$$

$$(23) \quad \frac{dr}{dt} = \frac{D V_m (C_b - C_r)}{r + D/k}$$



La solubilidad de las NPs ( $C_r$ ) depende de su tamaño ( $r$ ) según la relación de Gibbs-Thomson (ecuación **24**), donde  $\mu$  es el potencial químico de una partícula esférica ( $\mu = 2\gamma V_m/r$ ).

$$(24) \quad C_r = C_b e^{\left(\frac{\mu}{k_B T}\right)} = C_b e^{\left(\frac{2\gamma V_m}{r k_B T}\right)}$$

El potencial químico ( $\mu$ ) de la NP y su solubilidad ( $C_r$ ) influyen en la distribución de tamaño de las NPs en la solución como se explicará en la teoría de crecimiento por el mecanismo de maduración de Ostwald.

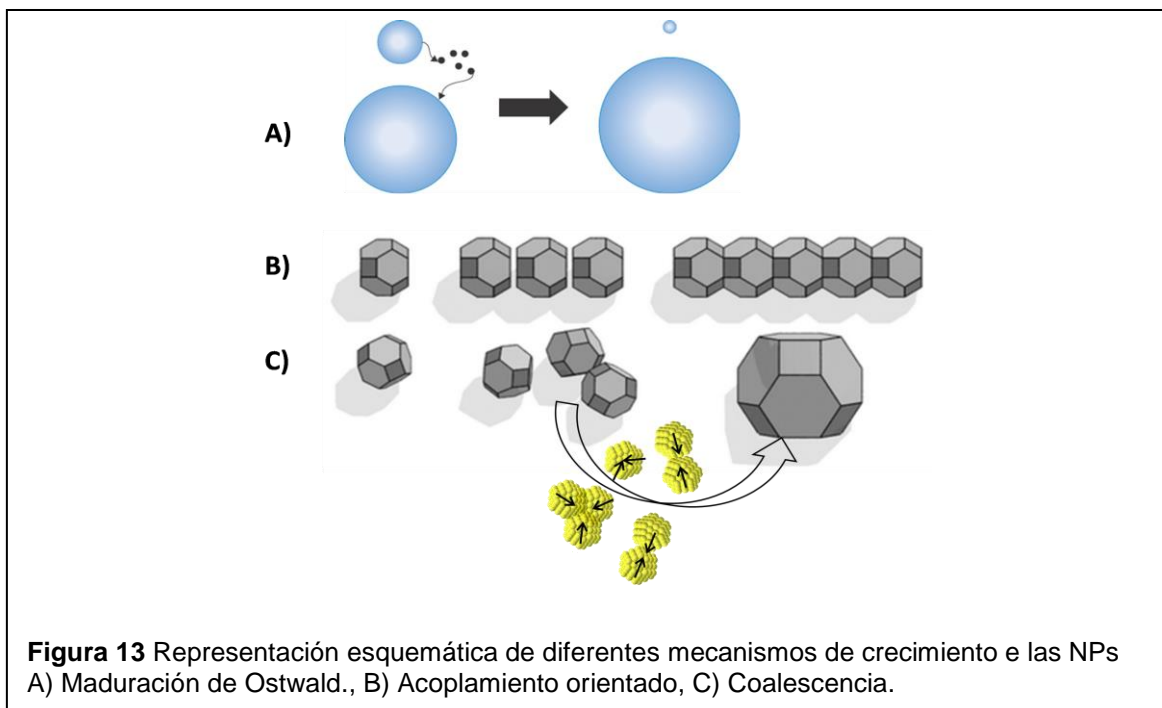
### **Maduración de Ostwald**

El mecanismo de crecimiento conocido como maduración de Ostwald (en inglés Ostwald ripening) es causado por el cambio en la solubilidad de las NPs dependiente de su tamaño (ver ecuación **24**). Este proceso se favorece termodinámicamente por lo que ocurre de manera espontánea. En las partículas más grandes es menor la relación superficie/volumen, su estado energético es menor (su energía superficial es más baja) siendo más estables energicamente que las partículas más pequeñas. Los átomos en la superficie de una partícula son menos estables energicamente que los átomos en el interior. Los átomos en la superficie de una partícula grande son más estables que en la superficie de una partícula pequeña (energicamente desfavorable). Por esta razón, en la partícula pequeña, que es más soluble, los átomos de su superficie tienden a re-disolverse y difundir a través de la solución, uniéndose a la superficie de partículas más grandes. Como resultado, las partículas más grandes continúan creciendo a expensas de la reducción de las partículas pequeñas que se reducen (y pueden desaparecer) (ver **Figura 13A**). Este mecanismo explica las diferencias en los tamaños de las partículas durante el crecimiento y la formación de grandes partículas que precipitan de la solución con el tiempo.

### **Coalescencia y Acoplamiento orientado**

La coalescencia y la unión orientada son procesos de crecimiento de NPs muy similares, que difieren en la orientación de la red cristalina en el límite del grano. En la coalescencia, no existe una preferencia particular por el punto de unión, mientras que para la unión orientada, se produce una alineación de los planos cristalinos en

la unión, formándose planos cristalográficos continuos. De esta forma, en las NPs formadas por coalescencia los planos están orientados aleatoriamente, mientras que las NPs formadas por fijación orientada, presentan una alineación perfecta de los planos cristalinos (ver **Figura 13B y C**).



### 1.2.3 Síntesis de nanopartículas de plata

En la síntesis de NPs de plata se requiere de un agente reductor (AR) y un agente estabilizante (AE). En ocasiones un mismo reactivo cumple ambas funciones como es el caso del citrato de sodio y del PEG. Durante la reacción, el AR se oxida y pierde un electrón (o más de uno) mientras que el agente oxidante, en este caso el ion  $\text{Ag}^+$  se reduce a  $\text{Ag}^0$ . Al formarse los átomos  $\text{Ag}^0$ , desaparecen las fuerzas de repulsión presentes entre los cationes  $\text{Ag}^+$ , lo que favorece la agrupación de los átomos de plata en la formación de núcleos y luego su crecimiento formando NPs de plata. Cuando una NP rebasa el radio crítico (descrito anteriormente) se favorece su crecimiento de manera espontánea.

Las NPs metálicas son inestables y tienden a aglomerarse y coalescer debido a las fuerzas de atracción (electrostáticas o de van der Waals) entre ellas. Este

incremento del tamaño conlleva a la pérdida de las interesantes propiedades ópticas presentes en el coloide de NPs. Lo anterior puede evitarse mediante la estabilización electrostática o estérica de las NPs metálicas (Polte, 2015). Los AE electrostáticos y estéricos se adsorben a la superficie de la NP, lo que reduce la energía en la interfase NP-solvente (tensión superficial) deteniendo el proceso de crecimiento de las NPs y evitando la agregación de estas. La relación entre las concentraciones del AE/precursor de plata, es importante para lograr una estabilización adecuada de las NPs. La interacción entre el AE y los átomos en la superficie de la NP son débiles, lo cual favorece el desplazamiento del AE por otras moléculas. Esto puede representar una ventaja ya que permite introducir otras moléculas de interés en la NP. Sin embargo, dichas interacciones débiles determinan que ante determinadas condiciones (ejemplo: elevada fuerza iónica) el AE se separe de la superficie de la NP lo que provoca que esta sea inestable.

La influencia de los AE en el crecimiento de las NPs no está del todo clara, en especial, para los AE estéricos como el PEG (Polte *et al.*, 2012). Cuando las moléculas de PEG recubren completamente la NP, crean un impedimento estérico que dificulta la interacción entre las NPs metálicas, lo cual detiene el crecimiento de NPs por coalescencia y/o maduración de Ostwald. En el caso de los agentes electrostáticos como el citrato de sodio, los iones citrato se adsorben a la superficie de la NP creando una capa de cargas negativas. Entre las NPs cubiertas de aniones citrato existen fuerzas de repulsión que evitan su agregación. (Polte *et al.*, 2012; Polte, 2015)

Existen varias vías de síntesis que emplean la reducción de sales de plata en solución para la obtención de NPs de plata. Uno de estos métodos consiste en la reducción de la sal precursora (por ejemplo:  $\text{AgNO}_3$ ) con agentes reductores como el  $\text{NaBH}_4$ , hidracina o citrato de sodio. Este último es un AR débil que además actúa como AE. La hidracina es particularmente eficaz como AR, sin embargo, su uso debe evitarse debido a su carcinogenicidad, riesgos ambientales e inestabilidad (especialmente en su forma anhidra). Existen otros métodos en los que se emplean como AR moléculas orgánicas (ejemplos: glicerol y poli-etilenglicol) que no son tan dañinos al medio ambiente (métodos verdes). (Gomes *et al.*, 2015)

En la síntesis de NPs de plata, parámetros como la temperatura de reacción, la concentración del precursor de  $\text{Ag}^+$  y la relación molar AE/ $\text{Ag}^+$  influyen en el tamaño y forma de las NPs metálicas (Sun y Xia, 2002; Polte *et al.*, 2010), así como en los mecanismos de nucleación y crecimiento que intervienen en la formación de las NPs.

El estudio de los mecanismos de formación de las NPs de plata es posible mediante técnicas como TEM, espectroscopía de absorción UV/vis y la dispersión de rayos-X en ángulos pequeños (SAXS: siglas del inglés *small angle X-ray scattering*). Estas técnicas han permitido tener idea de cuál de las teorías anteriores o combinaciones de las mismas explican mejor la síntesis de NPs en una condición determinada.

### **1.2.3.1 Síntesis de NPs de plata con PEG**

El PEG actúa como AR y AE en la síntesis de NPs de plata (Luo *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2007). En la literatura se emplean PEG de distintos pesos moleculares para obtener NPs de plata empleando diferentes temperaturas de reacción (25 - 100°C) (Luo *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2007; Li, Guo y Zhang, 2010; Nam *et al.*, 2011; Stiuftuc *et al.*, 2013). Como resultado, se producen NPs de plata cubiertas con PEG (NPs AgPEG) mediante una reacción de un solo paso.

En las síntesis de NPs AgPEG a altas temperaturas y en presencia de oxígeno, un incremento de la temperatura de reacción o el empleo de PEG de mayor peso molecular mejora la actividad reductora de PEG (Luo *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2011). Estas observaciones no pueden explicarse mediante los mecanismos de reducción que aparecen en la literatura. Dichos mecanismos consideran que solo los grupos terminales de las moléculas orgánicas están involucrados en la reducción de los iones plata (Fievet, Lagier y Figlarz, 1989; Luo *et al.*, 2005; Jeong y Park, 2014; Gomes *et al.*, 2015).

#### **Degradación térmica oxidativa del PEG**

A altas temperaturas (mayores de 70°C) y en presencia de oxígeno se favorece la degradación térmica oxidativa (DTO) del PEG. Este es un proceso ampliamente descrito en estudios que emplean PEG como material de almacenamiento de energía térmica y en cromatografía gaseosa (Glastrup 1996; Han *et al.* 1997; Jin-

Quan et al. 2009). Sin embargo, dicho proceso suele ignorarse en otras aplicaciones de PEG como la síntesis y estabilización de nanopartículas metálicas (Glastrup, 1996; Fleitas-Salazar *et al.*, 2017). En los pliegues de la estructura laminar de la molécula de PEG se produce un incremento de la tensión que reduce la energía de activación de la abstracción del H (Han, Kim y Kwon, 1997). Esto influye en la susceptibilidad del PEG al ataque oxidativo por radicales libres (este proceso se describirá en detalle en el capítulo 2). Durante la DTO, el PEG se degrada a complejos productos oxigenados de menor peso molecular mediante un proceso de escisión aleatoria de la cadena del polímero.

En este estudio proponemos que el incremento de la acción reductora de PEG observado (a altas temperaturas y presencia de O<sub>2</sub>) en nuestros experimentos y también por otros autores (Luo *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2011), está relacionado con la DTO del PEG. Adicionalmente, discutiremos cómo se ajustan las teorías de nucleación y crecimiento de NPs a las síntesis realizadas en las distintas condiciones.

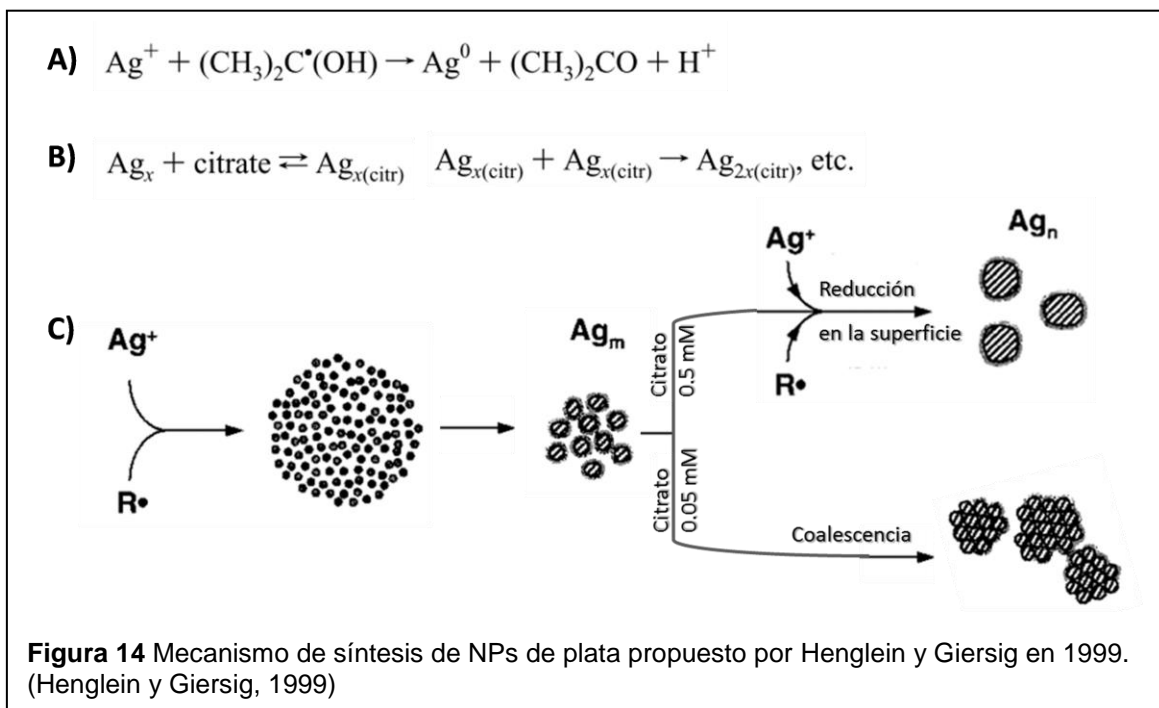
### **1.2.3.2 Mecanismos de formación de las nanopartículas de plata**

En diversos métodos de síntesis de NPs de plata se han estudiado los mecanismos de nucleación y crecimiento. En algunos casos se describe una clara separación entre la nucleación y el crecimiento de las NPs, mientras que en otros, ambos procesos ocurren de forma simultánea. En general, los autores describen una nucleación en ráfaga de LaMer en la síntesis NPs de plata, pero no está claro cómo se produce. En el 2011 Takesue et al. mediante SAXS, detectaron agrupaciones de Ag<sub>13</sub> en las primeras etapas de la formación de las NPs de plata (Takesue *et al.*, 2011). La poca información que se tiene sobre el proceso de nucleación se debe probablemente a lo rápido que ocurre este proceso y/o problemas de resolución de las técnicas analíticas empleadas. En cambio, los procesos de crecimiento de las NPs de plata han sido muy estudiados. Dependiendo de las condiciones de síntesis, el incremento en el tamaño de las NPs puede estar dado por reacciones autocatalíticas en la superficie de la NP, coalescencia entre NPs y/o la maduración de Ostwald. A continuación, describiremos algunos ejemplos de síntesis de NPs y

los mecanismos propuestos para la formación de las mismas. (Thanh, Maclean y Mahiddine, 2014)

**Irradiación- $\gamma$  de  $\text{AgClO}_4$  en propanol. AE: citrato de sodio**

En 1999, Henglein y Giersig estudiaron el proceso de síntesis de NPAs por irradiación  $\gamma$  del  $\text{AgClO}_4$  (0.1 mM) en presencia de propanol,  $\text{N}_2\text{O}$  y citrato de sodio. Estos autores proponen que se produce una reducción y nucleación autocatalítica lenta donde los radicales propanol formados por la radiación- $\gamma$  reducen  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  (ver **Figura 14A**). Los  $\text{Ag}^0$  se agrupan ( $\text{Ag}_x$ ) y la unión de estas agrupaciones cubiertas de citrato (ver **Figura 14B**) forma agrupaciones entre 10-20 átomos ( $\text{Ag}_m$ ) (otros estudios indican la presencia de intermediarios  $\text{Ag}_{13}$ ), que son cubiertas parcial o totalmente por citrato.



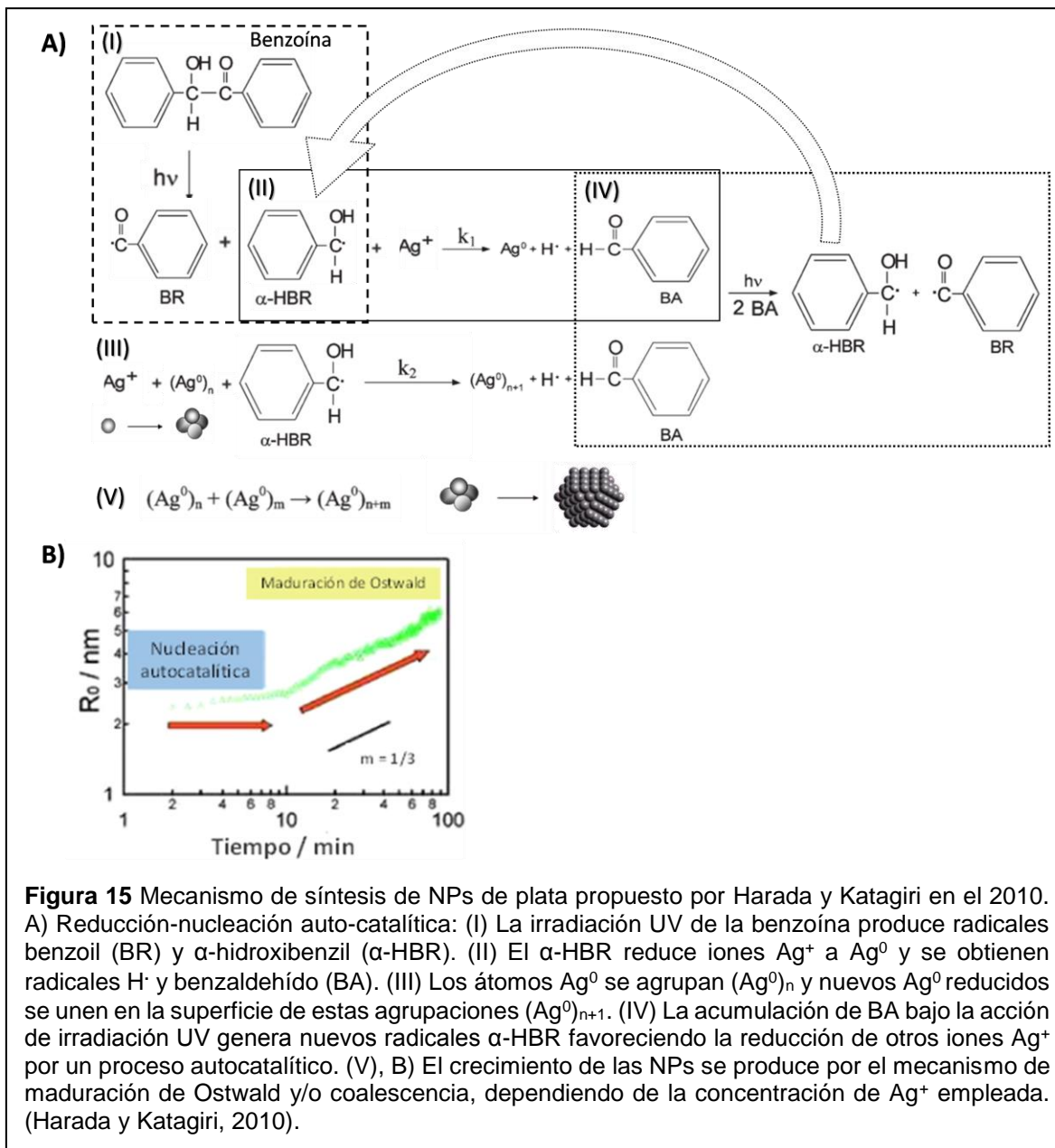
Henglein y Giersig propusieron dos mecanismos de crecimiento de NPs de plata dependientes de la concentración del AE (citrato): 1) A concentraciones intermedias (0.1-0.5 mM) de citrato de sodio, se produce la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  en la superficie de las NPAs formando partículas monodispersas. 2) Al emplear una baja concentración de citrato, las NPs de plata no están suficientemente cubiertas con citrato y se produce la coalescencia (ver **Figura 14C**). Concentraciones muy altas

de citrato provocan agregación de la NPs por la elevada fuerza iónica del medio. (Henglein y Giersig, 1999)

**Irradiación-UV de  $\text{AgClO}_4$  en presencia de benzoína. AE: PVP**

Harada y Katagiri estudiaron la foto-reducción de iones plata ( $\text{AgClO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) usando benzoína como foto-activador, en una solución de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) en agua/etanol (V/V: 1/1). La reacción se siguió mediante SAXS *in situ* mientras que se emplearon espectroscopía de absorción UV/Vis y TEM como estudios complementarios. En la **Figura 15A**, se representa un mecanismo de varias fases para la síntesis de NPs de plata propuesto por estos autores.

Durante los primeros 10 min ocurre la fase (1), una reducción-nucleación autocatalítica rápida que produce núcleos o NPs pequeñas con diámetros de ~5 nm (ver **Figura 15A**). 2) Entre 10 y 20 min aumenta el tamaño de las partículas y se reduce notablemente el número de las mismas. Los autores explican este resultado por el mecanismo de maduración de Ostwald. Cuando se emplea de 10 a 40 mM de  $\text{Ag}^+$ , a los 90 min de síntesis las partículas continúan creciendo por el mecanismo de maduración de Ostwald hasta alcanzar el estado estacionario, dando como resultado la precipitación de las partículas de Ag (ver **Figura 15B**). 3) Para síntesis que emplean 5 mM de  $\text{Ag}^+$  se observa una tercera etapa (30-90 min) donde se produce un crecimiento de las partículas por coalescencia con la presencia de un régimen transitorio de crecimiento de la maduración de Ostwald a la coalescencia (20-30 min). (Harada y Katagiri, 2010)

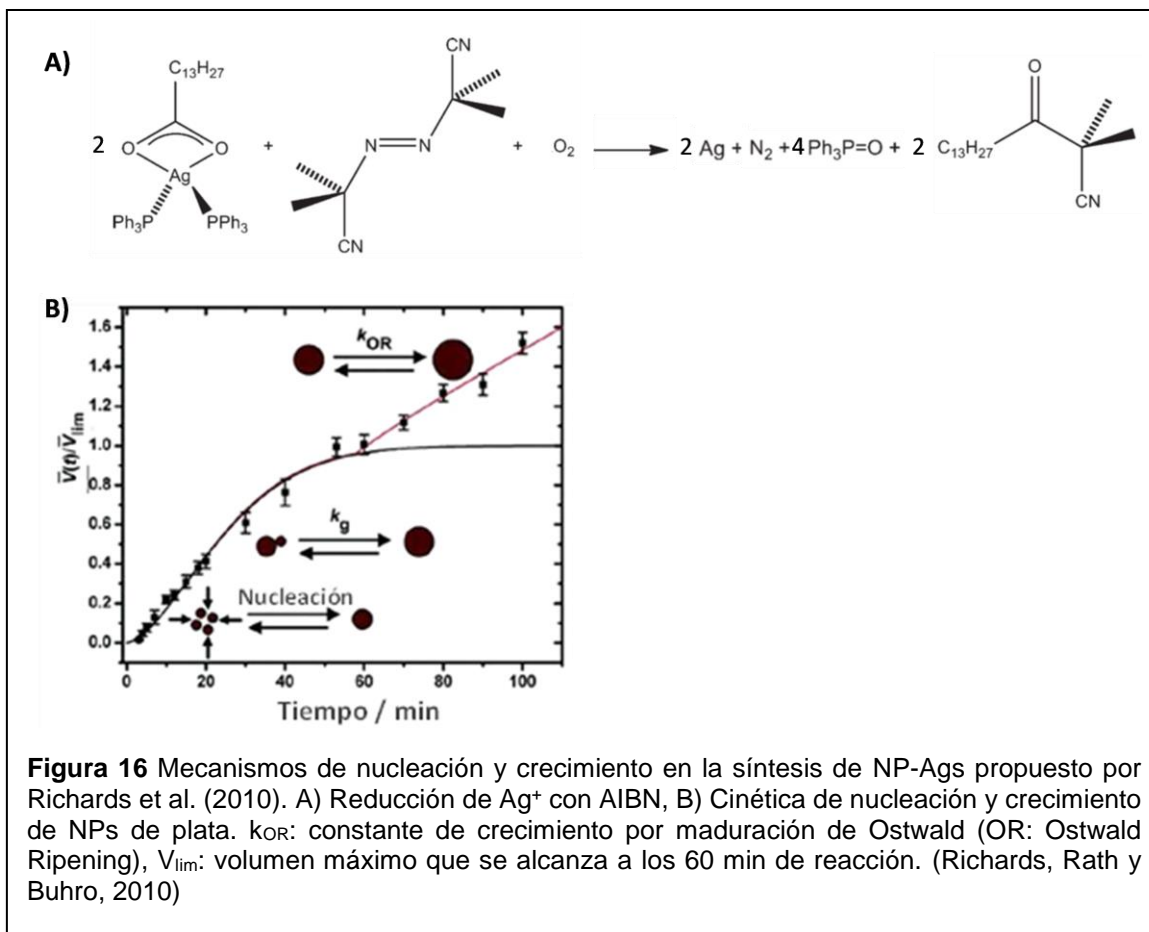


### Reducción de $\text{Ag}^+$ con AIBN a 130°C. AE: PHD-co- PVP

Richards et al (2010) obtuvieron nanopartículas de plata por reacción del precursor de plata con Azoisobutironitrilo (AIBN) en solución a 130°C en presencia de poli (1-hexadeceno)<sub>0,67</sub>-co-(1-vinilpirrolidona)<sub>0,33</sub> (PHD-co-PVP) como un polímero estabilizador. El proceso de síntesis se siguió por espectroscopia UV/Vis y TEM. Los autores propusieron para esta síntesis un proceso de tres pasos: 1) "nucleación en ráfaga" según la teoría clásica de LaMer, 2) Crecimiento por coalescencia de las



partículas que explica tanto la distribución bimodal del tamaño como la distribución poli-cristalina de las partículas observadas en TEM. 3) Siguiendo al proceso de coalescencia, se observa una maduración de Ostwald que corresponde a la porción lineal por encima de 60 minutos de tiempo de reacción (ver **Figura 16**).



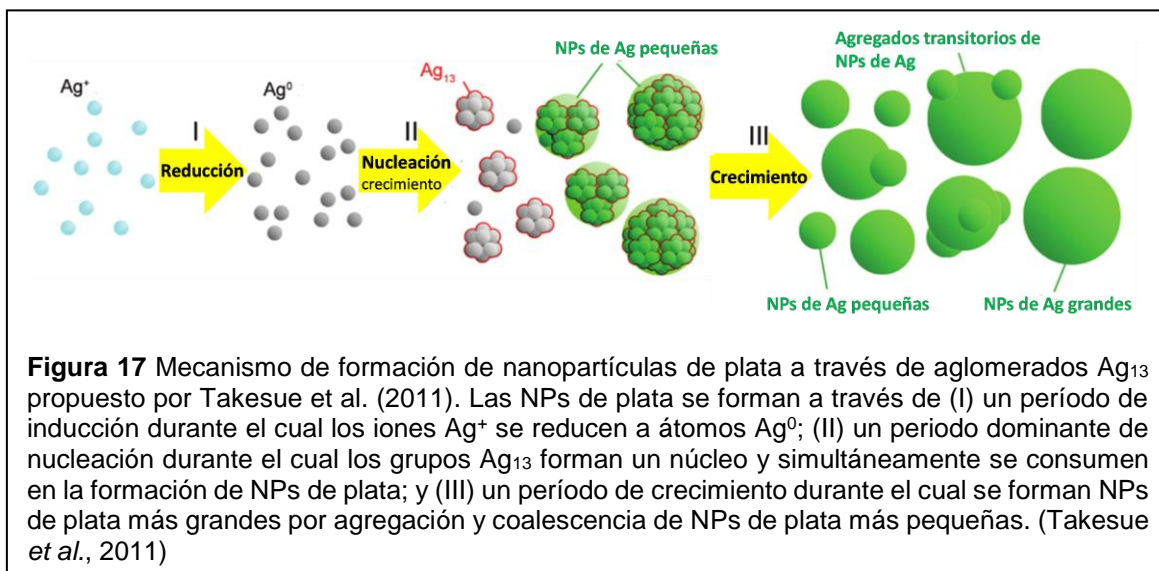
**Figura 16** Mecanismos de nucleación y crecimiento en la síntesis de NP-Ags propuesto por Richards et al. (2010). A) Reducción de  $Ag^+$  con AIBN, B) Cinética de nucleación y crecimiento de NPs de plata.  $k_{OR}$ : constante de crecimiento por maduración de Ostwald (OR: Ostwald Ripening),  $V_{lim}$ : volumen máximo que se alcanza a los 60 min de reacción. (Richards, Rath y Buhro, 2010)

### Reducción de $Ag^+$ con citrato de sodio. AE: Citrato de sodio

Estudios SAXS realizados por Takesue et al. (2011) confirman que la reducción de iones  $Ag^+$  conlleva a la formación de agrupaciones  $Ag_{13}$  de 0.7 nm que por coalescencia forman NPs de 3,36 nm. En el estudio descartan la reducción de iones  $Ag^+$  en la superficie del  $Ag_{13}$  pues no se detectaron formas  $Ag_{55}$  que tendrían un tamaño de 1,20 nm. Este grupo propone un mecanismo de tres etapas que se describe en la **Figura 17** (Takesue et al., 2011).

La formación de intermediarios de 13 átomos también se ha propuesto en el mecanismo de crecimiento de NPaus. Yao et al. (2010) propusieron la formación de

un intermediario  $Au_{13}$  en la síntesis de NPAsus con PVP y la posterior coalescencia de estas agrupaciones de átomos. En presencia de PVP, se forman dímeros  $Au_2Cl_6$  que luego pasan a formar trímeros. Después de esto, se produce un proceso de reducción que conduce a la formación de racimos de oro tales como  $Au_{13}$  con átomos en su superficie como iones de oro clorados. Finalmente, se forman partículas más grandes por coalescencia. (Yao *et al.*, 2010)



En los estudios anteriores, los límites de resolución del TEM y SAXS dificultan el estudio de la fase de nucleación. Los cortos tiempos requeridos para la detección de las NPs sugieren que la nucleación ocurre por el mecanismo de "nucleación en ráfaga" descrito por LaMer.

### 1.3 Molécula de hemoglobina

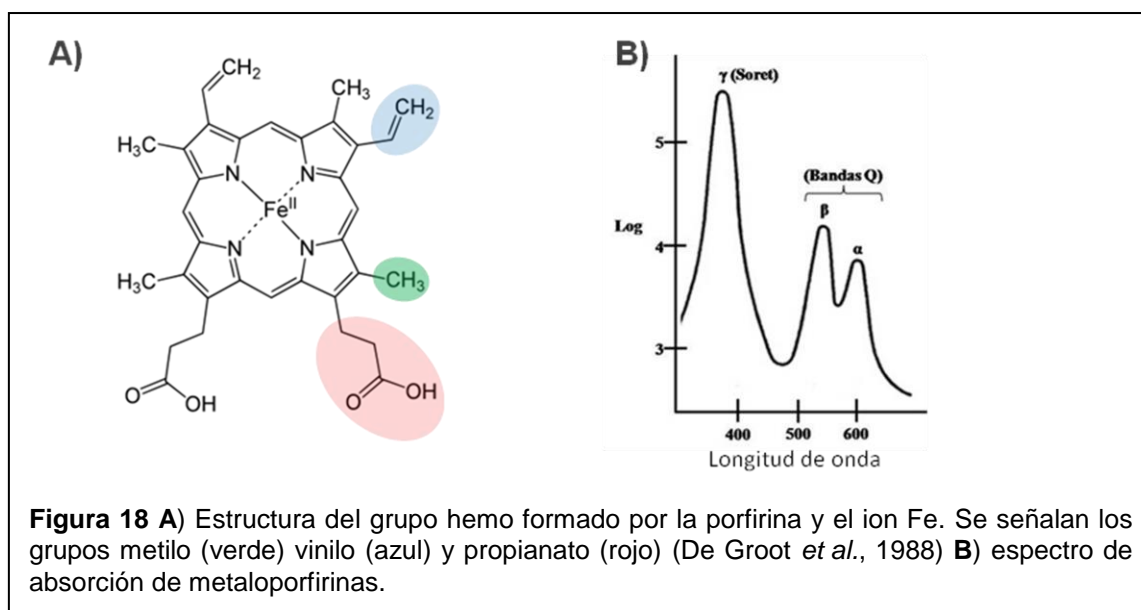
Como se mencionó en la sección 1.1, cuando una radiación EM incide sobre una molécula covalente, pueden ocurrir diferentes fenómenos producto de la interacción entre los fotones y dichas moléculas. Los procesos de absorción y dispersión de fotones por moléculas se describieron en las secciones 1.1.2 a 1.1.4. En esta sección solo nos referiremos al caso particular de la molécula de hemoglobina.

### 1.3.2 Espectro de absorción de la hemoglobina

La porfirina es un anillo de 24 miembros con 11 dobles enlaces conjugados y deslocalizados. Diferentes iones metálicos como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$  pueden insertarse en el centro del anillo porfirina por la aceptación de un par de electrones por átomos de N en el centro del anillo. De esta manera se forman metaloporfirinas como el grupo hemo de la Hemoglobina (ver **Figura 18A**). El espectro de absorción del grupo hemo muestra varias transiciones: la banda Q (490-650 nm) y la banda de Soret (400-436 nm). Estas transiciones se interpretan como transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  en el modelo de cuatro orbitales de Martin-Gouterman. En el modelo de Gouterman estas bandas se consideran transiciones electrónicas de dos orbitales HOMO (siglas del inglés: *Highest Occupied Molecular Orbital*),  $a_{1u}$  ( $\pi$ ) y  $a_{2u}$  ( $\pi$ ), a dos orbitales LUMO (siglas del inglés: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), e.g. ( $\pi^*$ ). Una transición fuerte del estado basal al segundo estado excitado  $S_2$  da lugar a la banda de Soret (420 nm) de mayor intensidad (ver **Figura 18B**). En las metaloporfirinas la transición débil del estado basal  $S_0$  al primer estado excitado  $S_1$  resulta en dos bandas Q de baja intensidad:  $\alpha$  (541 nm) y  $\beta$  (576 nm). Se ha encontrado que la unión del ligando a la hemoglobina y al entorno circundante afecta el patrón del espectro. (De Groot *et al.*, 1988; Dayer, Moosavi-Movahedi y Dayer, 2010)

La función biológica de este grupo en la Hb es el transporte de oxígeno mediado por cambios conformacionales en la estructura cuaternaria de la Hb. En la molécula de Hb, el residuo de histidina proximal proporciona el enlace directo al grupo hemo. También la naturaleza del enlace Fe-N depende de la conformación de la estructura cuaternaria de la Hb. Teniendo esto en cuenta, resulta lógico pensar que la adsorción de la Hb a una superficie SERS activa puede afectar su actividad biológica por cambios en su estructura. Sin embargo, De Groot *et al.* (1987,1988) demostraron que moléculas de Hb adsorbidas a NPAgs muestran una unión reversible a  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ , observándose la transición reversible entre los estados R (relajación) y T (tensión). Además, la vibración del estiramiento Fe-NH no se perturba por la adsorción a la superficie de la NPAg, lo que indica que el entorno del grupo hemo se conserva intacto y se mantiene la estructura tetramérica. De Groot

*et al.* sugieren que los grupos propionatos unidos al macrociclo de la porfirina (ver círculo rojo en la **Figura 18A**) median la adsorción de la hemoglobina a la superficie de la NP de plata cargada positivamente. De esta manera, se espera que la absorción de moléculas de Hb a NPs de plata no cambie su espectro de absorción. (De Groot y Hester, 1987; De Groot *et al.*, 1988)



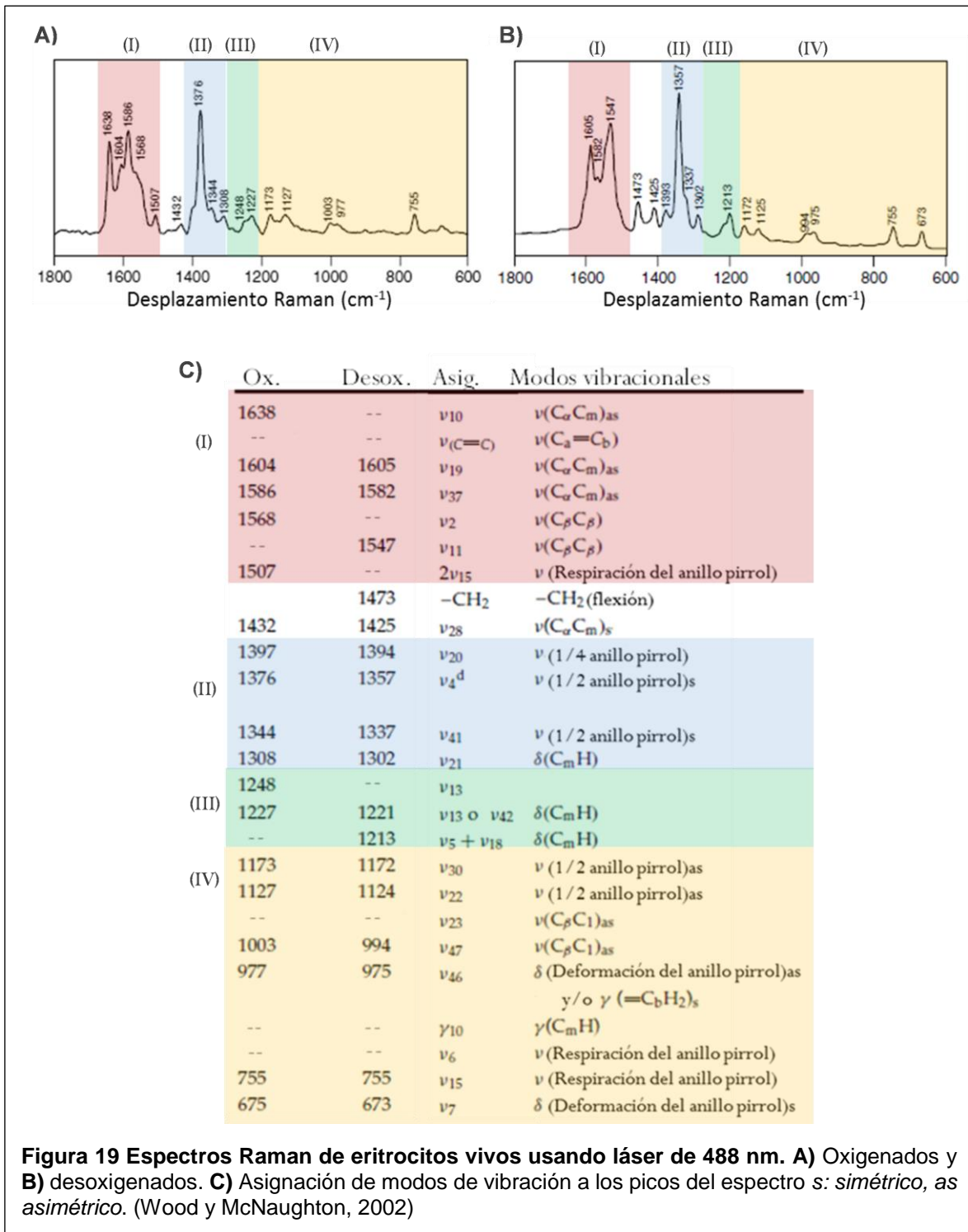
### 1.3.3 Espectro Raman de la hemoglobina

En la **Figura 19** se muestran los espectros Raman de eritrocitos vivos obtenidos por Wood y McNaughton (2002) empleando el láser de 488 nm. Entre los espectros de eritrocitos oxigenados y desoxigenados (ver **Figura 19A** y **B**) se aprecian diferencias en el número, posición e intensidad de algunos picos. La asignación de estos picos a distintos modos vibracionales se observa en la **Figura 19C**. Un análisis detallado de ambos espectros muestra un corrimiento de los picos y la aparición de otros picos en el espectro de células oxigenadas con respecto al espectro de células desoxigenadas. Se conoce que casi todos los picos en el espectro Raman de eritrocitos corresponden a las vibraciones de enlaces en el grupo hemo de las moléculas de hemoglobina (**Figura 18A**). Estas vibraciones dependen de cambios en la conformación del grupo hemo por la unión a un ligando ( $O_2$ ,  $CO_2$ , o  $NO$ ), la

posición del ion  $\text{Fe}^{2+}$  con respecto al anillo porfirina y la conformación de la hemoglobina. (Brazhe *et al.*, 2009)

En el espectro Raman de la hemoglobina se definen cuatro regiones principales (ver **Figura 19**): **(I)** región de bandas que marcan el estado del espín ( $1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ), **(II)** región de vibraciones de estiramiento del anillo pirrol ( $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), **(III)** región de deformación del grupo metino C-H ( $1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ), **(IV)** región de bajo número de onda ( $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ). En esta última, las células desoxigenadas presentan bandas en  $1172\text{-}1169$  y  $1125\text{-}1121\text{ cm}^{-1}$  que están asignadas a vibraciones de estiramiento asimétricas del medio anillo pirrol. Las bandas que aparecen a  $998\text{-}993$  y  $977\text{-}973$  están asociadas a vibraciones de estiramiento asimétricas C-C del macrociclo de la porfirina. Las bandas en  $755\text{-}753\text{ cm}^{-1}$  y  $678\text{-}668\text{ cm}^{-1}$  se asignan al modo de respiración del anillo pirrol y al modo de deformación simétrico del anillo pirrol, respectivamente.

Al excitar la molécula de Hb con un láser cuya  $\lambda$  se encuentre en las regiones de la banda de Soret o bandas  $\alpha/\beta$ , se obtiene un mayor número de picos en el espectro Raman y de mayor intensidad. Estas frecuencias activan modos de vibración asimétricos que de otro modo no se detectarían en el espectro Raman donde, generalmente, las bandas de mayor intensidad se corresponden con vibraciones simétricas que cambian la polaridad de la molécula. Esto es posible por diferentes mecanismos de dispersión de la resonancia. (Spiro y Streckas, 1974; De Groot *et al.*, 1988)



**Figura 19** Espectros Raman de eritrocitos vivos usando láser de 488 nm. **A)** Oxigenados y **B)** desoxigenados. **C)** Asignación de modos de vibración a los picos del espectro s: *simétrico*, *as asimétrico*. (Wood y McNaughton, 2002)

## 1.4 Efecto de la interacción de la luz con moléculas ubicadas en la vecindad de NPs metálicas

### 1.4.1 Conceptos generales del efecto SERS

Como consecuencia de la excitación del LSPR en las NPs metálicas, se produce una absorción selectiva de fotones y se genera una amplificación del campo electromagnético localizada en la superficie de la NP (Haynes y Van Duyne, 2001). Este es uno de los mecanismos que contribuyen al efecto SERS. Entre las diferentes superficies metálicas (Ag, Au, Cu, Na, Li, Pd, Pt) que sirven como sustratos activos en SERS, los mejores resultados para aplicaciones biomédicas se han obtenido con NPs de plata y oro (Brazhe *et al.*, 2009; Sapsford *et al.*, 2013).

SERS es una de las herramientas espectroscópicas más sensibles para la detección de moléculas, permitiendo la detección de moléculas a concentraciones de  $10^{-6}$  M y los llamados estudios de una sola molécula. En la literatura se describen ensayos SERS con incremento de la señal Raman en el orden de  $10^3$ - $10^{14}$ . El efecto SERS sólo se produce cuando la molécula estudiada se encuentra muy cerca de la superficie de la NP. Algunos estudios indican que la mayor intensidad de la señal se alcanza a distancias óptimas de  $\sim 15$ - $20$  nm de la superficie NP y disminuye significativamente para distancias mayores. (Brazhe *et al.*, 2009)

El factor de amplificación (EF, siglas del inglés: *enhancement factor*) se calcula por la ecuación **25**, donde se relacionan la intensidad del espectro SERS ( $I_{SERS}$ ), la intensidad del espectro Raman ( $I_{RS}$ ), el número de moléculas en la superficie del metal ( $N_{sup}$ ) y el número de moléculas totales ( $N_{Total}$ ) en el volumen de excitación. No siempre es posible conocer el número de moléculas que contribuyen al espectro SERS y el número de moléculas total en el volumen de excitación, lo que dificulta el cálculo del EF. (Lane, Qian y Nie, 2015)

$$(25) \quad EF = \frac{I_{SERS}/N_{sup}}{I_{RS}/N_{Total}}$$

En algunos estudios se emplean concentraciones muy bajas de moléculas en el control de manera que no se observa el espectro Raman. En estos casos, la aparición del espectro en presencia de NPs es lo que se interpreta como SERS.

### **1.4.2 Mecanismos de SERS**

Se han realizado numerosas investigaciones para comprender el origen del efecto SERS. La mayoría de las teorías afirman que la mayor contribución a este efecto se debe al mecanismo electromagnético (EM) y en menor medida al mecanismo químico de transferencia de carga (CT). Estos mecanismos pueden contribuir simultáneamente al factor de incremento de SERS. Otros factores que influyen son las condiciones experimentales, la composición, forma y tamaño de las NPs metálicas así como la composición de la muestra en particular.

#### **1.4.2.1 Mecanismo electromagnético**

La LSPR de NPs metálicas provoca un fuerte aumento local del campo eléctrico tanto de la radiación incidente como de la radiación dispersada. Al incidir una radiación EM con determinada frecuencia sobre una NP metálica esférica, provoca que esta emita su propio campo dipolar, amplificando el campo EM local. Al amplificarse el campo eléctrico incidente en la zona cercana a la NP, aumenta la probabilidad de dispersión Raman de las moléculas próximas a la superficie de la NP. La intensidad de la radiación de dispersión Raman producida en esta zona también se incrementa. Algunos estudios indican que el SERS de una sola molécula no está fuertemente relacionado con el LSPR, y los sitios activos para SERS se encuentran en las uniones entre dos NPs de plata. Trabajos teóricos con partículas aisladas, indican que el EF máximo que se puede alcanzar por la influencia del campo EM es de  $10^{11}$ . Este incremento solo se alcanza en determinados puntos entre partículas o en los bordes de partículas anisotrópicas. (Qian y Nie, 2008; Lane, Qian y Nie, 2015)

#### **1.4.2.2 Mecanismo de transferencia de carga**

El mecanismo de transferencia de carga (CT) surge de los cambios estructurales electrónicos que ocurren cuando una molécula libre se adsorbe en una superficie de metal. El mismo implica la transferencia de electrones entre la molécula y el sustrato de metal o NP metálica. A diferencia del mecanismo EM, en la CT se requiere del contacto directo entre las moléculas y la superficie metálica. Este



mecanismo fue propuesto por Albrecht y Chreighton en 1977 y luego confirmado por datos experimentales. Además, la contribución a la amplificación de la señal Raman por CT se encuentra en el rango de  $10^2$  a  $10^3$ , siendo menor que la contribución del mecanismo EM. (Lane, Qian y Nie, 2015)

#### **1.4.2.3 Resonancia de la molécula**

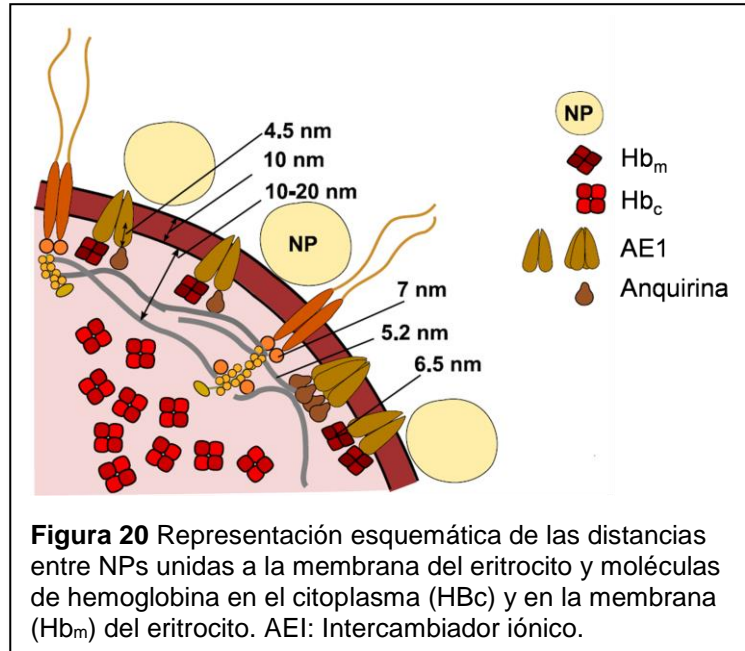
Las señales Raman más intensas se obtienen cuando la molécula entra en resonancia con el láser de excitación. En una molécula, cada modo vibracional tendrá una única frecuencia pero puede tener diferentes amplitudes. Cuando una molécula recibe energía, ya sea por colisión con otras moléculas o por transferencia de energía a partir de un fotón, aumenta la amplitud de la vibración. Dependiendo de la frecuencia de la radiación incidente, se puede obtener una mayor o menor amplitud de la vibración. (En física, la resonancia es la tendencia de un sistema a oscilar con mayor amplitud en determinadas frecuencias. Las frecuencias en las que la amplitud de la respuesta es un máximo relativo se conocen como frecuencias de resonancia del sistema, o frecuencias resonantes.) Algunas proteínas contienen centros activos o grupos funcionales (como el anillo de porfirina en las moléculas de hemoglobina) que pueden detectarse incluso a nivel de una sola molécula en condiciones de resonancia (Lane, Qian y Nie, 2015).

#### **1.4.3 Ensayos SERS en glóbulos rojos**

La molécula de Hb es el componente principal de los GR. Parte de estas moléculas se unen por interacciones electrostáticas a la cara interna de la membrana del eritrocito, de manera reversible. Esta unión puede ser directamente a los lípidos de la membrana o al intercambiador iónico AE1 (ver **Figura 20**).

A partir de datos experimentales reportados en la literatura, calculamos que cada eritrocito contiene aproximadamente  $2.8 \times 10^8$  moléculas de Hb. De estas,  $1.4 \times 10^6$  (~ 0.6% de la Hb total) se encuentran asociados a la membrana del GR (Hb<sub>m</sub>). Esta gran diferencia de

concentración entre la Hb libre en el citoplasma del eritrocito (Hb<sub>c</sub>) y la Hb<sub>m</sub>, favorece el estudio de la Hb<sub>c</sub> en el espectro Raman o el espectro Raman resonante del eritrocito, pues la contribución de Hb<sub>m</sub> a dichos espectros es insignificante. En cambio, las moléculas de Hb<sub>m</sub> son las que contribuyen al



espectro SERS por la distancia entre estas y NPs unidas a la superficie externa de la membrana del GR (ver **Figura 20**). (Shaklai, Yguerabide y Ranney, 1977; Lew *et al.*, 1995; Brazhe *et al.*, 2009)

La importancia del estudio del espectro Raman de glóbulos rojos consiste en la diferenciación del estado de oxigenación de la molécula de Hb y la posibilidad de relacionar estos espectros con patologías asociadas a cambios en esta molécula.

## CAPÍTULO 2: Efecto de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata con polietilenglicol

El presente estudio se realizó con el doble objetivo de establecer condiciones de síntesis reproducibles para la obtención de un coloide estable de NPs AgPEG y evaluar el posible efecto de la DTO-PEG en esta reacción. Para ello, evaluamos concentraciones entre 0,1 - 1 mM de AgNO<sub>3</sub> (2091397/Sigma-Aldrich) en las síntesis de NPs AgPEG empleando como agente reductor y estabilizante el PEG200 (P3015/Sigma-Aldrich), a temperaturas y condiciones atmosféricas que favorecen (100°C/aire (O<sub>2</sub>)) o no (60°C/aire (O<sub>2</sub>) y 100°C/N<sub>2</sub>) la DTO-PEG.

### 2.1 Metodología

Para nuestros experimentos, realizamos modificaciones al método descrito por Stiuftuc et al. (2013), empleando en todas las reacciones una solución al 0,6 % de PEG200 y 0,005 % de NaOH (S318-1/JT Baker).

El material de vidrio y las barras magnéticas empleadas en la síntesis se lavaron con "agua regia" antes de cada reacción. Las soluciones para la síntesis de nanopartículas se prepararon con agua desionizada.

Todas las reacciones se realizaron en la oscuridad a partir de que añadimos la solución de AgNO<sub>3</sub>. Al final de cada experimento, los coloides o suspensiones de nanopartículas se dejaron enfriar a 25±4°C en la oscuridad, conservándose en estas condiciones. Para facilitar la comprensión del texto, definimos códigos para las diferentes condiciones de reacción y las NPs correspondientes (ver **Tabla 1**).

Tabla 1 Condiciones de reacción

Reacción	Código de las nanopartículas	Temperatura	Atmósfera	Concentración AgNO <sub>3</sub>
R1	R1-AgPEG	60°C	Aire (O <sub>2</sub> )	0,1 mM
R2	R2-AgPEG			0,5 mM
R3	R3-AgPEG			1,0 mM
R4	R4-AgPEG	100°C	Aire (O <sub>2</sub> )	0,1 mM
R5	R5-AgPEG			0,5 mM
R6	R6-AgPEG			1,0 mM
R7	R7-AgPEG	100°C	N <sub>2</sub>	0,1 mM
R8	R8-AgPEG			0,5 mM

### **2.1.1 Síntesis de AgNPs a 60°C en aire (O<sub>2</sub>) (R1-R3)**

Calentamos a 60°C un Erlenmeyer con agua desionizada y añadimos PEG200 al 0,6% y NaOH al 0,005% agitando durante 30 minutos. Luego añadimos rápidamente el volumen correspondiente de la solución de AgNO<sub>3</sub> 10 mM para obtener la concentración deseada de AgNO<sub>3</sub>. Estas reacciones se realizaron durante 5 horas con agitación moderada.

### **2.1.2 Síntesis de AgNPs a 100°C en aire (O<sub>2</sub>) (R4-R6)**

Calentamos a 60°C un Erlenmeyer con agua desionizada y añadimos PEG200 al 0,6 % y NaOH al 0,005 %. Después de agitar la solución anterior durante 30 minutos elevamos la temperatura, cuando la solución comenzó a hervir, añadimos rápidamente el volumen correspondiente de la solución de AgNO<sub>3</sub> 10 mM (para alcanzar la concentración final de 0,1, 0,5 o 1 mM). Estas reacciones se realizaron durante 5 minutos para evitar cambios en el volumen por evaporación.

### **2.1.3 Síntesis de AgNPs a 100°C en N<sub>2</sub> (R7-R8)**

Para este experimento, se empleó nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto en 500 ml de agua desionizada. Para ello cubrimos con "parafilm" un frasco de cristal casi lleno de agua desionizada dejando un pequeño orificio (una aguja de jeringuilla en el "parafilm") para liberar el O<sub>2</sub> desplazado y el exceso de N<sub>2</sub>. Burbujeamos nitrógeno durante 45 minutos, agitando vigorosamente, a una temperatura de 25°C.

Estas síntesis se realizaron siguiendo un procedimiento similar al descrito para R4-R6, con las siguientes modificaciones. El experimento se realizó en atmósfera de N<sub>2</sub> usando una cámara de guantes de atmósfera controlada (Labconco). Empleamos agua desionizada y desoxigenada para preparar soluciones de NaOH al 1 % y AgNO<sub>3</sub> a 10 mM, así como las soluciones de PEG al 0,6 % y NaOH al 0,005 % para las reacciones R7 y R8. Solo se evaluaron dos concentraciones de AgNO<sub>3</sub> (0,1 mM y 0,5 mM).

### 2.1.4 Caracterización de NPs de plata

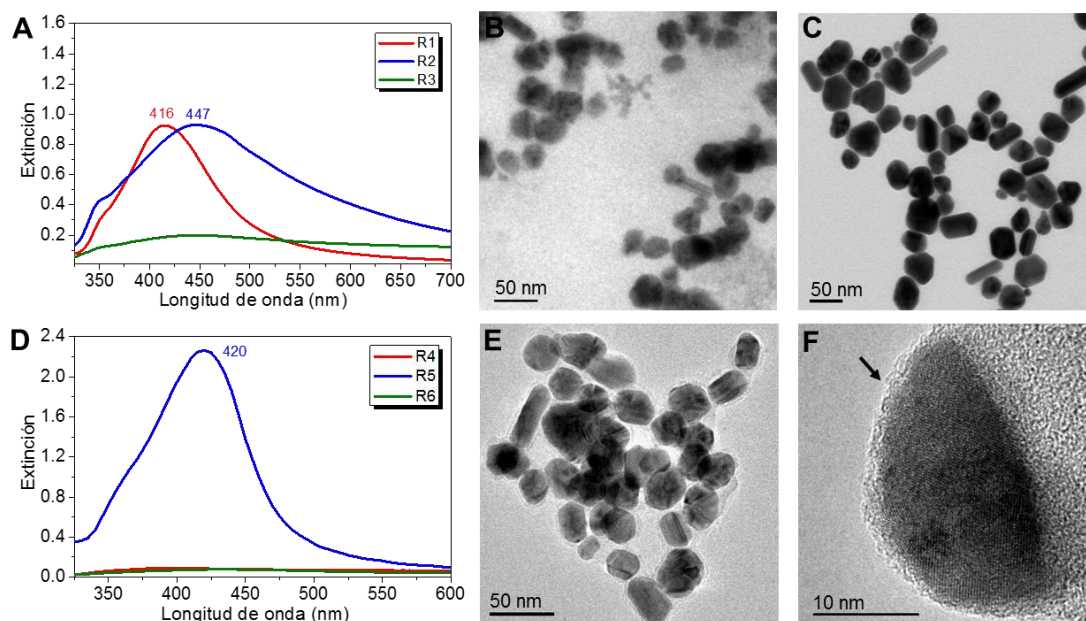
Para la caracterización de las nanopartículas obtenidas en las diferentes condiciones empleamos diferentes técnicas. El tamaño de las NPs de plata se determinó por DLS y TEM. El diámetro hidrodinámico (DH) de las NPs en DLS se midió usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern), equipado con un láser de 633 nm y un ángulo de detección de 173°. Las propiedades ópticas de los coloides de NPs se evaluaron en cubetas de cuarzo empleando un espectrofotómetro UV/visible Perkin Elmer Lambda 2 (UV/Vis). Los coloides que mostraron absorción del plasmón en los análisis UV/Vis se analizaron por TEM. Para preparar las rejillas con las muestras de NPs, colocamos una gota de 10  $\mu$ L del coloide en una película de carbón soportado por rejillas de cobre u oro. La gota se dejó secar por unos minutos y luego las rejillas se colocaron en viales para secarlas durante toda la noche al vacío. Al día siguiente se realizaron las mediciones en un equipo JEOL, JEM 2010 F operado a 200 kV. También analizamos la composición en las NPs por EDS. Además, las imágenes de alta resolución (HR-TEM) facilitaron el análisis de la estructura cristalina de las nanopartículas, mediante la medición de las distancias interplanares.

## 2.2 Resultados y Discusión

### 2.2.1 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 60°C

En la **Figura 21A** y en la **Tabla 2** se muestran los resultados de la caracterización de nanopartículas obtenidas en las reacciones R1-R3 (ver en la **Tabla 1** las condiciones de cada reacción). El espectro de extinción de NPs R1-AgPEG mostró un pico a 416 nm con un ancho a la altura media (FWHM, siglas del inglés: Full Width at Half Maximum) de 94 nm (ver **Figura 21A**). Este espectro coincide con lo reportado para la absorción del plasmón de superficie de NP-Ags esféricas (Luo *et al.*, 2005). En dicho espectro se observa un hombro izquierdo a aproximadamente 350 nm, el cual puede estar relacionado con la presencia de algunas NPs anisotrópicas (ver flecha en **Figura 21B**). El color amarillo y transparente del coloide sugiere la presencia de NPs de plata esféricas menores de 30 nm, producto de la

absorción del LSPR alrededor de 400 nm (Nam *et al.*, 2011). De manera consistente, las micrografías de TEM mostraron nanopartículas casi-esféricas con diámetros de  $7 \pm 4$  nm,  $25 \pm 5$  nm así como algunos prismas y nanovarillas (ver **Figura 21B** y **Tabla 2**). En DLS detectamos dos poblaciones de NPs R1-AgPEG con DH de 4 nm y 52 nm.

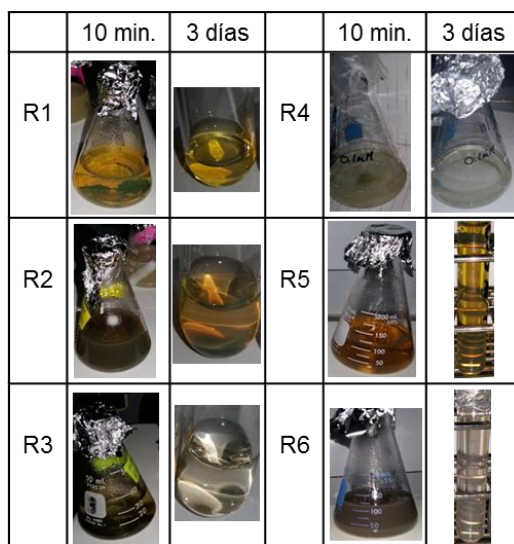


**Figura 21** Evaluación de diferentes parámetros en la síntesis de NPs de plata con PEG200. Los gráficos a la izquierda muestran los espectros de extinción de A) NPs R1-R3-AgPEG y D) NPs R4-R6-AgPEG. Las imágenes de MET de NPs B) R1-AgPEG, C) R2-AgPEG, E) R5-AgPEG. F) La imagen de AR-MET de NPs R5-AgPEG muestra una NP esférica cubierta por el polímero (ver flecha).

En cambio, R2 produjo una suspensión turbia y grisácea que luego formó un precipitado gris en el fondo del Erlenmeyer quedando un coloide transparente y anaranjado que se caracterizó por las técnicas antes mencionadas (ver **Figura 22**). Con respecto al espectro de extinción de NPs R1-AgPEG, el de NPs R2-AgPEG mostró un pico más ancho (FWHM: 185 nm) con desplazamiento hacia el rojo (447 nm) y un hombro izquierdo más evidente a 350 nm. Estas características sugieren la presencia de NPs más grandes y poli-dispersas en forma y tamaño. Dicho espectro mostró una elevación de la línea base, lo cual es consistente con la dispersión de la luz incidente por partículas grandes ( $>100$  nm) presentes en el

coloide (Dispersión Mie). En el análisis DLS detectamos NPs R2-AgPEG con DH de 10 nm y 76 nm. Las imágenes de TEM revelaron NPs con diferentes tamaños y un mayor porcentaje de NPs anisotrópicas (prismas, varillas, hexágonos) además de NPs casi esféricas y agregados.

En R3 se obtuvo una suspensión oscura y gris que con el tiempo formó un precipitado gris, quedando un coloide transparente y ligeramente gris (ver **Figura 22**) que se caracterizó por espectroscopía de absorción UV/Vis y DLS. El espectro de extinción de este coloide es plano, lo que sugiere la ausencia o baja concentración de NPs de plata. En DLS detectamos una población con DH alrededor de 146 nm que pueden ser partículas grandes o agregados de NPs los cuales carecen de absorción relacionada con el plasmón de superficie.



**Figura 22** Resultados de las reacciones R1-R6. Después de reposar 3 días en la oscuridad, los agregados y partículas grandes precipitan dando lugar a coloides transparentes que se caracterizaron por DLS y UV/Vis.

De manera similar a lo observado por otros autores (Sun y Xia, 2002; Zielinska *et al.*, 2009), en estas reacciones se observó el incremento del tamaño de las NPs al aumentar la concentración de  $\text{AgNO}_3$ . Los espectros de extinción de NPs R1-R3-AgPEG son coherentes con los resultados de DLS y TEM (ver **Figura 21A-C** y **Tabla 2**). Las imágenes de alta resolución de TEM (HR-TEM) de NPs AgPEG mostraron que las NPs estaban recubiertas por un material amorfo, lo cual indica la

formación de una capa de PEG alrededor de estas NPs (ver **Figura 21F**). Este recubrimiento con PEG incrementa el diámetro de las NPs AgPEG y en ocasiones puede afectar la nitidez de las imágenes TEM. En las imágenes TEM de baja magnificación no se observa la cubierta de PEG en las NPs AgPEG (ver imágenes TEM en la **Figura 21**). Por esta razón, en las mediciones del tamaño de las NPs AgPEG en TEM, se midió el centro de plata sin considerar el recubrimiento de PEG (ver **Tabla 2**). En imágenes HR-TEM, observamos que el grosor de la capa de PEG que recubre las NPs de plata varía de 1,7 a 6,0 nm (ver **Figura 21F**). De esta forma, el tamaño de NPs medido en TEM es de 4 a 12 nm menor que el tamaño real de las NPs AgPEG. Además, las moléculas orgánicas (PEG) en la superficie de NPs AgPEG forman capas de solvatación que incrementan el diámetro hidrodinámico que detectamos en DLS (Shkilnyy *et al.*, 2009). Lo antes expuesto explica por qué el DH medido por DLS es mayor que el diámetro determinado por TEM para estas NPs.

### **2.2.2 Posibles mecanismos de crecimiento de NPs AgPEG.**

En el capítulo 1, se describen los mecanismos de nucleación y crecimiento de NPs de Ag (sección 1.1.3.2). No es objetivo del presente trabajo estudiar dichos mecanismos en la síntesis de NPs AgPEG. No obstante, el análisis de estos permite comprender mejor los resultados obtenidos en dicha síntesis. Al inicio de la síntesis de NPs AgPEG, la alta concentración del precursor de plata favorece la "nucleación en ráfaga" descrita por LaMer. En la síntesis de NPs AgPEG, empleamos la misma concentración de PEG (AR y AE) y diferentes concentraciones de  $\text{Ag}^+$ . Al aumentar la concentración de iones  $\text{Ag}^+$ , se formará un mayor número de núcleos en la fase inicial de la síntesis (mientras no se sature la capacidad reductora de las moléculas de PEG presentes). La formación de estos núcleos alcanza su máximo cuando se reduce la concentración de  $\text{Ag}^+$  en la solución. A partir de este momento, se favorece el crecimiento de las NPs por diferentes mecanismos. La coalescencia entre núcleos para formar NPs reduce la concentración de núcleos en la solución por lo que en determinado momento se reduce la velocidad de crecimiento de las NPs. Es posible que además de la coalescencia, se produzca un crecimiento por el mecanismo de



maduración de Ostwald. Este mecanismo explica a) la presencia de dos poblaciones de NPs R1-AgPEG, unas muy pequeñas y otras de mayor tamaño, b) la formación de un precipitado en R2. El proceso de crecimiento se ve limitado por la estabilización de NPs con el agente estabilizante que en esta reacción es el PEG.

### **2.2.3 Análisis estequiométrico de las síntesis a 60°C**

En nuestros ensayos, el PEG200 actúa como AR y AE (estérico). Para asegurar la estabilización de las NPs de plata con PEG, se requiere determinado número de moléculas de PEG en la superficie de la NP (Cruje y Chithrani, 2014). Por otro lado, varios autores han planteado que los grupos terminales del PEG son los que intervienen en la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  (Fievet et al. 1989; Luo et al. 2005; Gomes et al. 2015; Khodashenas & Ghorbani 2015). De esta manera, cada molécula PEG puede reducir un número finito de iones  $\text{Ag}^+$ .

En las reacciones R1-R3 hay un exceso de 300 a 30 moléculas PEG con respecto al número de iones  $\text{Ag}^+$  (ver Tabla 2) que debe ser suficiente para reducir todos los iones  $\text{Ag}^+$  presentes en la solución. Sin embargo, en las reacciones R2 y R3 no se obtienen coloides estables de NPs, se obtuvieron grandes partículas y aglomerados de NPs que formaron un precipitado en el fondo del matraz.

Lo anterior puede deberse a i) la superposición o agrupamiento de moléculas PEG en la superficie de las NPs de plata (acción estabilizante) podría representar un impedimento estérico que afecta la acción reductora de dichas moléculas. En este caso, solo las moléculas PEG libres en la solución pueden reducir iones  $\text{Ag}^+$ . Si el número de iones  $\text{Ag}^+$  sobrepasa la capacidad reductora de las moléculas de PEG disponibles, entonces no todos los iones  $\text{Ag}^+$  serán reducidos a  $\text{Ag}^0$ . En estas condiciones decimos que se satura la acción reductora de las moléculas PEG. La presencia de iones  $\text{Ag}^+$  podría afectar la estabilidad coloidal de las NPs AgPEG. Otra posibilidad es que ii) debido a las altas concentraciones de  $\text{Ag}^+$ , es mayor el número de NPs formadas y su tamaño. Esto impide la estabilización de todas las NPs por las moléculas de PEG disponibles contribuyendo a la formación de NPs anisotrópicas y de grandes agregados.

Todo lo antes expuesto evidencia la importancia de la relación estequiométrica entre los reactivos durante la síntesis para garantizar la estabilidad coloidal de las NPs de plata.

La interpretación de los resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 60°C se realizó mediante el análisis estequiométrico de las reacciones R1-R3 y teniendo en cuenta las teorías de nucleación y crecimiento de NPs. Como empleamos la misma concentración de PEG (0,6 %) en todas las reacciones, la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> fue de aproximadamente 300, 60 y 30 cuando añadimos concentraciones de 0,1, 0,5, y 1,0 mM de AgNO<sub>3</sub>, respectivamente. También calculamos la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> usada por otros autores (Popa *et al.*, 2007; Li, Guo y Zhang, 2010) que emplean PEG200 en condiciones similares (temperaturas entre 25 y 60°C), con el fin de comparar resultados (ver **Tabla 2**).

Evidencias experimentales indican que una relación PEG200/Ag<sup>+</sup> > 2400 produce NPs AgPEG menores de 4 nm (Li, Guo y Zhang, 2010). En cambio, la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> ~ 300 que empleamos en la reacción R1 condujo a la formación de NPs R1-AgPEG casi esféricas de 25±5 nm y 7±4 nm. En el experimento realizado por Popa *et al.* (2007) en la matriz polimérica de PEG200 con una relación PEG200/Ag<sup>+</sup> ~ 106 produjo un resultado muy similar al que obtuvimos en R1. De manera interesante, en el estudio realizado por Popa *et al.* (2007), al aumentar la temperatura de reacción de 30°C a 60°C se obtuvo un mayor número de NPs de 20 nm (ver **Tabla 2**).

Cuando en la reacción se emplea una mayor concentración de Ag<sup>+</sup> en el límite que pueden ser reducidas completamente por el AR (reducción de la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> de 2400 a 106), se forma un mayor número de núcleos. Como consecuencia, se obtienen NPs más grandes, pues es mayor la probabilidad de coalescencia entre núcleos antes de que las moléculas de PEG200 en exceso estabilicen completamente las NPs AgPEG. Esto explica la formación de NPs de 20 a 25 nm obtenidas con relaciones PEG200/Ag<sup>+</sup> de 300 en R1 y de 106 en el estudio de Popa *et al.* (2007). Otro factor que favorece la coalescencia entre núcleos o NPs pequeñas antes de que sean estabilizadas por PEG, es el incremento de la

temperatura (para temperaturas menores a 70°C). Una mayor temperatura, incrementa la entropía del sistema, es mayor la velocidad de las NPs aumenta el número de colisiones entre estas lo que favorece la coalescencia y con ello la obtención de NPs de mayor tamaño.

**Tabla 2** Variación de la forma y tamaño de las NPs AgPEG con la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> empleada en la síntesis.

Reacción	Conc. AgNO <sub>3</sub> (mM)	Relación PEG200/Ag <sup>+</sup>	Temp. (°C)	Diámetro Hidrodinámico Diámetro ± Desv. Estd. (nm)	MET		
					Tamaño*	Forma	% / N
<i>Li et al. 2010</i>	0,005	9800	RT	ND	2,8	Esférica	
	0,01	4900			3,3		
	0,02	2450			3,5		
<i>Popa et al. 2007</i>	2,4	106	30	ND	20 ± 4	c-esférica	Pocas
			60	ND	4 ± 2		Muchas
					20 ± 4		
					4 ± 2		
R1	0,1	300	60	51,77 ± 20,13	25 ± 5	c-esférica	65 / 307
				3,76 ± 1,02	7 ± 4	c-esférica	30 / 307
					3,6 ± 0,9	varilla	3 / 307
					25 ± 7	Prisma	2 / 307
R2	0,5	60	60	75,68 ± 33,58	38 ± 8	c-esférica	57 / 184
				9,94 ± 2,61	10 ± 2	c-esférica	5 / 184
					2,4 ± 0,9	varilla	17 / 184
					42 ± 8	Poligonal	19 / 184
					28 ± 5	Prisma	2 / 184
					82 ± 20	Agregado	
R3	1,0	30		146,30 ± 62,31	ND	Agregado	
R4	0,1	300		148,98 ± 73,94 24,69 ± 5,19	ND		
R5	0,5	60	100	55,12 ± 25,09	26 ± 4	c-esférica	76 / 384
				2,82 ± 0,67	7 ± 2	c-esférica	18 / 384
					2,8 ± 0,76	varilla	4 / 384
					22 ± 6	Prisma	2 / 384
R6	1,0	30		170,73 ± 74,69	ND		
R7	0,1	300	100	99,08 ± 50,7	29 ± 5	c-esférica	84 / 280
				13,86 ± 4,10	7 ± 3	c-esférica	11 / 280
					2,1 ± 0,47	varilla	3 / 280
					29 ± 11	Prisma	2 / 280
					76 ± 16	Agregado	
R8	0,5	60	100	106,70 ± 42,81	29 ± 6	c-esférica	100 / 32
					221 ± 31	Agregado	
					88 ± 20	Agregado	

N: Número de nanopartículas aisladas, c-esférica: casi esféricas,

\* Las medidas representan el diámetro promedio de NPs c-esféricas, la relación largo/ancho de nanovarillas o la longitud de la base de prismas.

Cuando en la reacción se incrementa aún más la concentración de Ag<sup>+</sup> reduciendo la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> a 60 (R2), se obtiene una mayor poli-dispersión de las NPs en forma y tamaño formándose partículas grandes y agregados (ver **Figura 21C** y **Tabla 2**). Una explicación plausible es que al haber una mayor concentración de

iones  $\text{Ag}^+$ , se produce un mayor número de núcleos, aumentando la probabilidad de coalescencia entre dichos núcleos y NPs R2-AgPEG pequeñas. Como consecuencia, las moléculas de PEG disponibles no son suficientes para estabilizar todas las NPs formadas. De esta forma, algunas NPs de plata quedan parcialmente cubiertas por PEG (NPs no-estabilizadas) y pueden crecer como varillas u otras formas anisotrópicas debido a la adsorción preferencial de las moléculas PEG a determinados planos cristalinos (Karakoti *et al.*, 2011). Este efecto se ha estudiado ampliamente en el uso de poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) como agente estabilizante de NPs de plata (Wiley *et al.*, 2005). Además, las NPs no-estabilizadas pueden crecer (las más grandes) o reducirse (las más pequeñas) por el mecanismo de maduración de Ostwald, formando agregados o partículas más grandes que explican la turbidez de la suspensión de nanopartículas con la posterior formación de un precipitado. Siguiendo este razonamiento, es lógico esperar en la reacción R3 (PEG200/ $\text{Ag}^+$  ~ 30) una mayor cantidad de precipitado debido a la agregación, coalescencia y/o crecimiento ilimitado (mecanismo de Ostwald) de un mayor número de NPs no estabilizadas.

Del análisis anterior podemos concluir que una relación PEG200/ $\text{Ag}^+$  entre 100-300 y una temperatura de 60°C favorecen la formación de NPs casi-esféricas entre 20-25 nm completamente estabilizadas por moléculas de PEG. En estas condiciones, la presencia de algunas NPs muy pequeñas 4-7 nm en el coloide, a pesar de largos tiempos de reacción (1-5 horas), puede explicarse por mecanismos iniciales de maduración de Ostwald unido a la reducción del número de núcleos y NPs pequeñas (por coalescencia) que reducen la probabilidad de coalescencia de las NPs pequeñas restantes, antes de que sean estabilizadas todas las NPs de plata presentes, por moléculas de PEG en exceso. El incremento de la relación PEG200/ $\text{Ag}^+$  y/o la reducción de la temperatura favorecen la formación de NPs más pequeñas (ver **Tabla 2**). En nuestras condiciones experimentales, la relación PEG200/ $\text{Ag}^+$  mínima necesaria para reducir todos los iones  $\text{Ag}^+$  y/o estabilizar las NPs AgPEG (evitando la formación de precipitado) se encuentra entre 60 y 300. Cuando PEG200/ $\text{Ag}^+$  < 100 (30-60), las moléculas PEG disponibles no pueden

reducir todos los iones  $\text{Ag}^+$  y/o estabilizar todas las NPs AgPEG formando NPs poli-dispersas en forma y tamaño, así como grandes agregados.

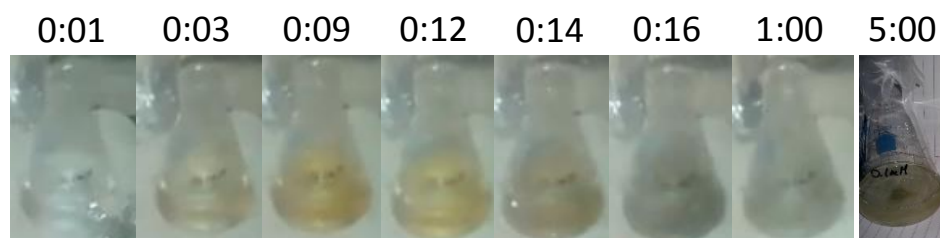
#### **2.2.4 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 100°C en aire ( $\text{O}_2$ )**

Las reacciones R4-R6 se realizaron a 100°C durante 5 minutos (ver acápite **2.2.1** y **Tabla 1**). A diferencia de las reacciones R1-R3, en R4-R6 no se observó la misma relación entre la concentración de  $\text{AgNO}_3$  y el tamaño de las NPs (ver **Figura 21A, D** y **Tabla 2**). A 100°C, solo la concentración media de 0,5 mM de  $\text{AgNO}_3$  (R5) produjo un coloide estable, mientras que en las otras reacciones (R4 y R6) se obtuvieron suspensiones grises y turbias que luego formaron un precipitado. En R6 (1 mM) observamos la formación de una suspensión turbia y oscura en pocos segundos. En cambio, en R5 (0.5 mM) se formó un coloide anaranjado y transparente (ver **Figura 22**). Inesperadamente, en R4 (0.1 mM), inmediatamente se observó la formación de un coloide amarillo y transparente el cual se tornó turbio y grisáceo en pocos segundos (ver **Figura 23**). Cuando dejamos reposar en la oscuridad y a  $25\pm 4^\circ\text{C}$  las suspensiones de R4 y R6 durante 3 días, ambas formaron un precipitado en el fondo de los Erlenmeyers dejando ver coloides transparentes e incoloros (ver **Figura 22**). El análisis de estos coloides reveló partículas con  $\text{DH} > 149$  nm y un espectro de extinción plano (ver **Figura 21D** y **Tabla 2**). La ausencia de color y la formación del precipitado sugieren la ausencia o una baja concentración de NPs en estos coloides así como la presencia de partículas grandes y agregados de NPs.

Por otro lado, el espectro de extinción de NPs R5-AgPEG mostró un pico intenso y estrecho (FWHM: 80.8 nm) con un hombro a 350 nm. La posición de este pico a 420 nm sugiere la presencia de NPs más grandes que las obtenidas en R1. Sin embargo, las imágenes TEM mostraron NPs esféricas de un tamaño similar a las NPs R1-AgPEG:  $26\pm 4$  nm (79%) y  $7\pm 2$  nm (19%) además de algunas nano-varillas y prismas (6%). El hombro que se observa a 350 nm podría estar relacionado con la presencia de las NPs anisotrópicas antes mencionadas (ver **Figura 21D, E** y **Tabla 2**). Mediante DLS detectamos NPs R5-AgPEG con DH de 3 nm y 55 nm. En

R5, se obtuvo un incremento del 15% en el número de NPs con diámetro de 25 nm con respecto a R1, lo que podría explicar el desplazamiento hacia el rojo del pico R5 (420 nm) comparado con el pico R1 (416 nm). En R5, la coalescencia de NPs para formar NPs de 26 nm es favorecida por la influencia de la temperatura en la reducción de  $\text{Ag}^+$ , como explicaremos más adelante detalladamente. La mayor intensidad del pico R5 sugiere una mayor concentración de NPs que en R1 y R2 (ver **Figura 21D, E**).

A 60°C, la relación PEG200/ $\text{Ag}^+$  de 300 produce un coloide amarillo y transparente de NPs R1-AgPEG, mientras que a 100°C, las NPs R4-AgPEG pequeñas formadas en un inicio (ver coloide amarillo en la **Figura 23**) se agregan y coalescen rápidamente produciendo una suspensión turbia y grisácea (ver **Figura 23**). Por otra parte, la relación PEG200/ $\text{Ag}^+$  de 60 forma un coloide anaranjado y transparente a 100°C con NPs R5-AgPEG casi esféricas pequeñas, mientras que a 60°C produce NPs R2-AgPEG poli-dispersas en forma y tamaño, así como agregados que más tarde precipitan (ver **Figura 21C, E, Figura 22 y Tabla 2**). Aparentemente, PEG200 puede reducir un mayor número de iones  $\text{Ag}^+$  y estabilizar más NPs AgPEG a 100°C (0.5 mM) que a 60°C (0.1 mM) formando NPs casi esféricas de aproximadamente 25 nm con estabilidad coloidal.



**Figura 23** Cinética de la reacción R4 ( $\text{O}_2$  / 100°C / 1 mM  $\text{AgNO}_3$ ) donde se aprecian los cambios de color del coloide en el tiempo (segundos) que se indica sobre cada foto.

### 2.2.5 Efecto de la temperatura en la síntesis de AgPEG NPs en aire ( $\text{O}_2$ )

Los distintos efectos de la concentración de  $\text{AgNO}_3$  que observamos en la síntesis de NPs AgPEG a 60°C y 100°C en presencia de  $\text{O}_2$ , sugieren que existen diferencias en los mecanismos de reducción de iones  $\text{Ag}^+$  a cada temperatura. Se conoce que a altas temperaturas y en presencia de  $\text{O}_2$ , se produce la degradación térmica

oxidativa del PEG (DTO-PEG) (Han, Kim y Kwon, 1995, 1997; Glastrup, 1996; Jin-Quan, Liang-Nian y Cheng-Xia, 2009; Boughen, Liggat y Ellis, 2010). Ahora bien, ¿por qué estas condiciones conducen a la DTO-PEG? En la **Figura 24** se propone un esquema de la DTO-PEG tomando en cuenta los productos de degradación identificados por varios autores mediante resonancia magnética nuclear (RMN): RMN-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C y cromatografía gaseosa (Han, Kim y Kwon, 1995; Glastrup, 1996; Jin-Quan *et al.*, 2009). A continuación, explicamos cómo se produce este proceso degradativo y como puede afectar la síntesis de NPs AgPEG. Los números entre paréntesis en los próximos párrafos se corresponden con estructuras representadas en la **Figura 24**.

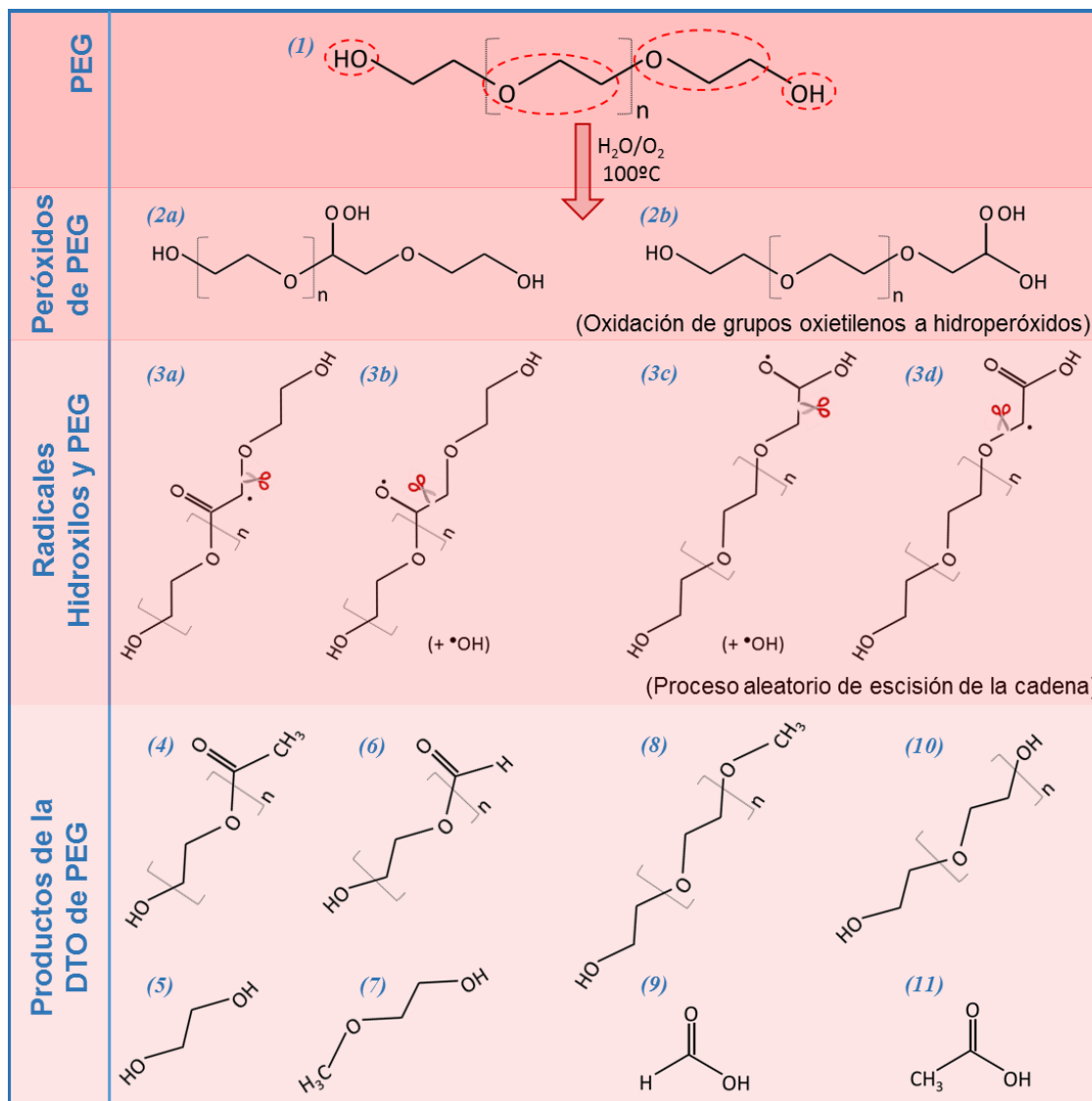
A altas temperaturas se produce la excitación de la molécula de O<sub>2</sub>, un electrón puede pasar del estado basal al estado excitado (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) se rompe uno de los enlaces de O<sub>2</sub>: O=O quedando O<sub>2</sub><sup>\*</sup>: ·O-O· que presenta en cada átomo un electrón no apareado. A diferencia del O<sub>2</sub>, el O<sub>2</sub><sup>\*</sup> no es estable y se torna reactivo. Por otro lado, en los pliegues de la estructura laminar de la molécula de PEG (1) se reduce la tensión, lo cual contribuye a reducir la energía de activación para la abstracción del hidrógeno en los carbonos internos ubicados en dichos pliegues. De esta forma, se favorece la formación de radicales libres en los grupos oxi-etilenos internos en la estructura del PEG. Es posible que en la reacción de abstracción del H por efecto del O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, se forme un radical PEG· y el radical peróxido (uno de los electrones no apareados en el O<sub>2</sub><sup>\*</sup> forma un enlace covalente con el H). Luego, ambos radicales descritos pueden reaccionar formando el peróxido de PEG.

En las reacciones R4-R6 (100°C/O<sub>2</sub>), la presencia de O<sub>2</sub> a 100°C favorece la oxidación de los grupos oxi-etilenos de las moléculas PEG (1) (ver **Figura 24**) a hidroperóxidos de PEG (2a, 2b). (Es posible que esto se lleve a cabo de la manera que se describió en el párrafo anterior.) De esta forma, las moléculas de PEG pueden reducir iones Ag<sup>+</sup> mediante esta reacción de oxidación (además de la reducción por los grupos terminales de PEG). Los peróxidos de PEG se consideran los iniciadores de las reacciones en cadena de los radicales libres, pues la inestabilidad del simple enlace entre los átomos de oxígeno en el peróxido genera radicales PEG (3b, 3c) y radicales hidroxilo. Este último, es el radical más reactivo

dentro del grupo de las especies reactivas del oxígeno, y rápidamente forma otros radicales PEG, incluyendo aquellos con un electrón no apareado en el átomo de carbono C (3a, 3d). Durante la DTO-PEG, los metales de transición (como la plata) pueden catalizar la reacción de descomposición del peróxido de PEG antes descrita (Han, Kim y Kwon, 1997; Jin-Quan *et al.*, 2009). Los radicales PEG (3a-3d), pueden descomponerse en diferentes moléculas siguiendo un proceso aleatorio de escisión de la cadena. Entre los productos de la DTO-PEG se han identificado ésteres (4), etilenglicol (5), aldehídos (6), éteres (7, 8), PEG de menor peso molecular (10) o ácidos carboxílicos (11), incluyendo el ácido fórmico (9). Muchos de estos productos de la degradación de PEG pueden reducir iones  $\text{Ag}^+$  (Shi *et al.*, 2011; Jeong y Park, 2014; Gomes *et al.*, 2015). Así, además de los grupos internos y terminales de PEG, cada molécula de PEG que es degradada, produce al menos dos moléculas diferentes que pueden reducir iones  $\text{Ag}^+$ . Además, la DTO-PEG incrementa el número de moléculas que pueden estabilizar las NPs de plata (productos de la degradación). Durante la fase de "terminación" de las reacciones en cadena de los radicales libres, se forman algunos productos de mayor peso molecular, probablemente, debido a la recombinación de radicales PEG (Han, Kim y Kwon, 1995).

Al comparar los estudios de DTO-PEG realizados por varios autores (Han, Kim y Kwon, 1995, 1997; Jin-Quan *et al.*, 2009; Boughen, Liggat y Ellis, 2010) se observa que el rendimiento de este proceso de degradación depende de la temperatura y el peso molecular de PEG. Teniendo en cuenta el bajo peso molecular del PEG200, en las reacciones R4-R6 algunas moléculas PEG200 pueden experimentar DTO durante el calentamiento a 100°C. Esto explicaría el incremento de la acción reductora del PEG a esta temperatura. Aparentemente, la adición de 0.5 mM de  $\text{AgNO}_3$  en R5 equilibra el incremento en la acción reductora de PEG.





**Figura 24 Esquema de la degradación térmica oxidativa (DTO) del PEG.** A temperaturas por encima de los  $70^\circ\text{C}$  y en presencia de  $\text{O}_2$ , la molécula de PEG (1) es susceptible al ataque oxidativo de radicales libres formándose hidroperóxidos de PEG (2a-b) que generan radicales PEG (3a-d). Estos radicales dan lugar a distintos productos (4-11) mediante el proceso aleatorio de escisión de la cadena.

Cuando se emplea una menor concentración de  $\text{AgNO}_3$  (0.1 mM), las NPs R4-AgPEG formadas inicialmente (como revela el color amarillo del coloide en la **Figura 23**) se agregan. Durante la fase de propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres, algunas de las moléculas PEG que estabilizan las NPs R4-AgPEG iniciales (ver flecha en la **Figura 21F**) pueden convertirse en radicales PEG debido al efecto de radicales hidroxilo y PEG en exceso (3a-d en la **Figura 24**). Esto

puede explicarse mediante alguno de los siguientes razonamientos: 1) La recombinación de los radicales PEG en la superficie de diferentes NPs R4-AgPEG provoca la agregación de NPs. 2) La elevada reactividad de los radicales PEG puede desestabilizar el arreglo de moléculas PEG que recubren la NP de plata. Esto conduce a la formación de NPs no-estabilizadas que pueden agregarse y/o coalescer. A 100°C, la alta entropía del sistema acelera estos procesos. Además, teniendo en cuenta que la adsorción de moléculas PEG a la superficie de la NP de plata está dada por interacciones débiles, la elevada energía cinética (velocidad) tanto de las partículas PEG como de las NPs de plata (a 100°C), dificulta que se produzca la adsorción de moléculas PEG a la NP. De esta manera, se afecta el proceso de estabilización de las NPs de plata y se favorece su agregación.

Por otro lado, al emplear una concentración de 1 mM de AgNO<sub>3</sub>, el número de moléculas PEG y productos de la DTO-PEG aún no es suficiente para la reducción y estabilización de iones Ag<sup>+</sup> y NPs de plata, respectivamente. Por ello se forman NPs no-estabilizadas que pueden agregarse y/o coalescer formando partículas grandes y agregados (ver la suspensión gris en la **Figura 22**). Esta podría ser una de las razones que dificulta reproducir el procedimiento descrito por Stiufluic et al. (2013).

Resumiendo, en la síntesis de NPs de plata con PEG a altas temperaturas y en presencia de oxígeno, es crítico emplear la relación PEG/Ag<sup>+</sup> adecuada. El exceso de radicales libres o el defecto de agentes reductores y estabilizantes podría conducir a la agregación y/o coalescencia de las NPs.

Como precedente podemos mencionar que agentes surfactantes como Brij 97 y Tween 80, que contienen múltiples grupos oxi-etilenos se han empleado en la reducción de iones Ag<sup>+</sup> en etanol (Liz-Marzan y Lado-Tourino, 1996). En dicho trabajo, la formación de radicales libres se favorece al emplear etanol como medio de reacción. En cambio, en nuestro trabajo, la temperatura de las reacciones R4-R6 (100°C) y la presencia de O<sub>2</sub> favorecen la oxidación de los grupos oxi-etilenos durante la DTO-PEG. Si incrementamos la temperatura de reacción evitando la DTO-PEG (por ejemplo, realizando la reacción en atmósfera de N<sub>2</sub>), entonces

podríamos esperar una reducción en el tiempo de reacción sin cambios en la actividad reductora del PEG.

### **2.2.6 Resultados de las síntesis de NPs AgPEG a 100°C en N<sub>2</sub>**

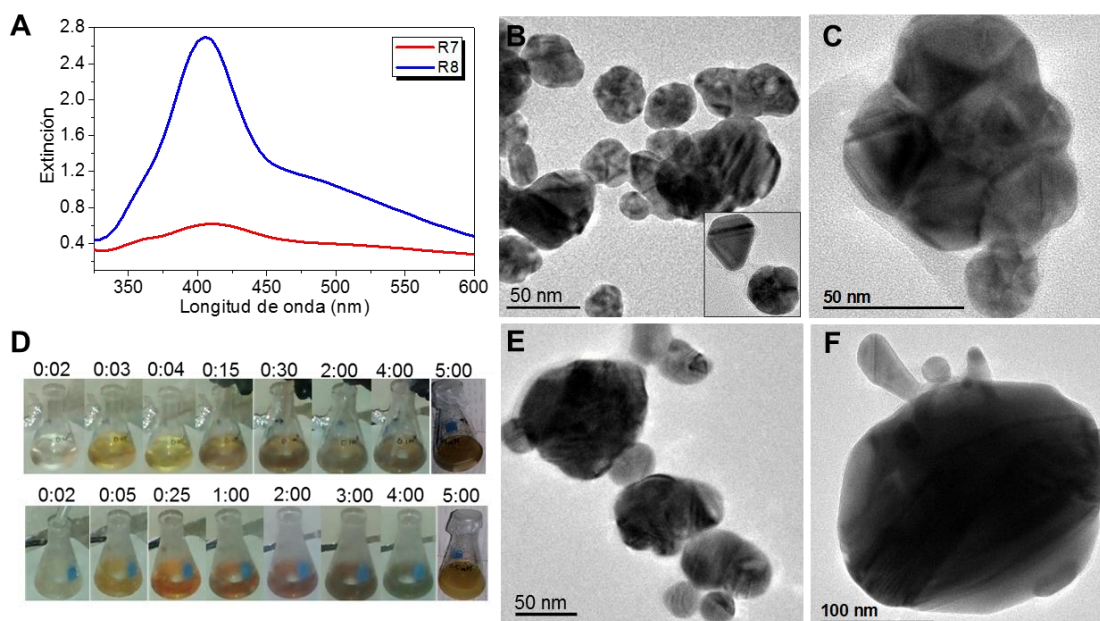
Para confirmar el efecto de la DTO-PEG en las reacciones R4-R6, llevamos a cabo las reacciones R7 y R8 a 100°C en atmósfera de N<sub>2</sub> (ver **tabla 1** en la sección materiales y métodos). Como las reacciones R3 y R6 (1 mM de AgNO<sub>3</sub>) rindieron resultados similares, en este experimento solo evaluamos las concentraciones 0.1 mM y 0.5 mM de AgNO<sub>3</sub> (R7 y R8).

Al elevar la temperatura a 100°C, se redujo drásticamente el tiempo de reacción. Las reacciones R4, R5, R7 y R8 formaron coloides amarillos (R4 y R7) o anaranjados (R5 y R8) en pocos segundos. El color anaranjado observado en R5 y R8 pudiera estar relacionado con una mayor concentración de NPs comparado con R4 y R7 donde es menor la concentración inicial de AgNO<sub>3</sub>. Para el análisis cinético de estas reacciones, tomamos muestras en diferentes momentos de cada reacción y las analizamos por UV/vis y DLS (ver **Figura 23**, **Figura 25** y **Figura 26**). En el ensayo de cinética, la reacción R5 se llevó a cabo durante 10 minutos. Los resultados de ambas reacciones R5 fueron similares y se comparan más adelante (ver al final de este capítulo: reproducibilidad de síntesis).

En R4, el coloide amarillo y transparente se volvió una suspensión turbia y grisácea en pocos segundos. Después de dejar reposar las muestras de la suspensiones tomadas a 1 y 5 minutos de la reacción, se observaron coloides transparentes e incoloros con un precipitado en el fondo. Los espectros de extinción de estos coloides son planos y se detectaron partículas con DH mayor de 100 nm mediante DLS (ver **Figura 26A, B**).

A diferencia de R4 (0.1 mM/ O<sub>2</sub>/ 100°C), la reacción R7 (0.1 mM/ N<sub>2</sub>/ 100°C) mostró cambios de color que sugieren un crecimiento más lento de las NPs. Los espectros de extinción de la cinética R7 muestran una reducción en la intensidad del pico alrededor de 416 nm y una elevación de la línea base entre 5 segundos y 2 minutos. Esto cambios sugieren una reducción en el número de NPs esféricas pequeñas que

puede estar dado por su agregación y coalescencia para formar partículas más grandes que dispersan la luz causando la elevación observada en la línea basal. Los espectros de las muestras de la reacción R7 colectadas entre 2 y 5 minutos de la reacción son muy similares, indicando que las NPs formadas fueron estabilizadas por PEG. A los 5 minutos detuvimos la reacción obteniendo un coloide marrón transparente (ver **Figura 25D** (superior)). Las micrografías de TEM muestran NPs R7-AgPEG casi esféricas de  $29\pm 5$  nm (84%) y  $7\pm 3$  nm (11%), nanovarillas (3%) y prismas (2%). También observamos agregados de  $76\pm 15$  nm con estructuras que sugieren la coalescencia entre NPs anisotrópicas (ver **Figura 25C**). El pico a 416 nm es consistente con la absorción del plasmón de superficie de NPs casi esféricas pequeñas. El hombro alrededor 350 nm y el incremento de la línea base podrían deberse a las NPs anisotrópicas observadas y a la presencia de agregados, respectivamente (ver **Figura 25A-C** y la **Tabla 2**). El análisis por DLS confirmó el incremento en tamaño de las NPs R7-AgPEG entre 5 segundos y 2 minutos, mientras que el DH se mantuvo constante (14 nm y 100 nm) de 3 a 5 minutos (ver **Figura 26F**).



**Figura 25 Síntesis de NPs de plata con PEG200 a 100°C en N<sub>2</sub> (R7 y R8).** A) Espectros de extinción de NPs R7 y R8-AgPEG. Las imágenes de MET de NPs: R7-AgPEG (B, C) y R8-AgPEG (E, F). D) Cinética de las reacciones R7 (arriba) y R8 (abajo) donde se observan los cambios de color del coloide en el tiempo (segundos).

A diferencia de R4, en R7 el coloide no perdió el color ni se formó precipitado. Las NPs R7-AgPEG son más pequeñas que las R4-AgPEG y más grandes que las R1-AgPEG. La temperatura de la reacción R7 (100°C) incrementa la probabilidad de colisiones entre NPs, lo que favorece los procesos de agregación y coalescencia para formar NPs más grandes antes de que las moléculas de PEG las cubran completamente, estabilizándolas. Aunque en R7 se forman NPs de mayor tamaño se alcanza la estabilidad coloidal, debido al alto número de moléculas PEG y la ausencia de radicales libres (en ausencia de O<sub>2</sub> no ocurre la DTO-PEG). En R7, la reducción de iones plata puede producirse únicamente por la oxidación de los grupos terminales del PEG, como se ha descrito en la literatura (Luo *et al.*, 2005)(Gomes *et al.*, 2015).

El coloide anaranjado y transparente de NPs R8-AgPEG se convirtió en una suspensión turbia y amarilla a los cuatro minutos de iniciar la reacción (ver **Figura 25D**), mientras que el coloide de NPs R5-AgPEG permaneció transparente y anaranjado incluso después de 10 minutos (ver **Figura 25D** (inferior)). En los espectros de extinción de la cinética de R8, el pico aumenta su intensidad de 5 segundos a 1 minuto de reacción y se desplaza hacia menores longitudes de onda. A partir de los 4 minutos, momento en que cambió de transparente a turbio el coloide, la intensidad del pico disminuye y se eleva la línea base variando la posición del pico (ver **Figura 26G**). Este comportamiento sugiere la agregación y/o coalescencia de NPs pequeñas formando partículas grandes y agregados que provocan la dispersión de la luz (incremento de la línea base). En DLS se detectaron NPs R8-AgPEG de más de 100 nm incluso a partir de 1 minuto de reacción (ver **Figura 25E, F** y **Figura 26H**). La alta desviación estándar en el análisis DLS de la muestra tomada a 1 minuto de la reacción, podría deberse a la presencia de NPs más pequeñas que están agregándose y/o formando partículas de mayor tamaño. A los 5 minutos se detuvo la reacción y esta muestra final se analizó por TEM mostrando agregados de 80 a 200 nm y algunas NPs R8-AgPEG de 29±6 nm. Por otro lado, en los espectros de extinción de la cinética de R5, la intensidad del pico de 420 nm aumentó entre 3 y 10 minutos manteniéndose baja la línea base (ver

Figura 26C). En DLS detectamos NPs R5-AgPEG con DH de 50 nm y 3 nm entre 1-10 minutos de reacción.

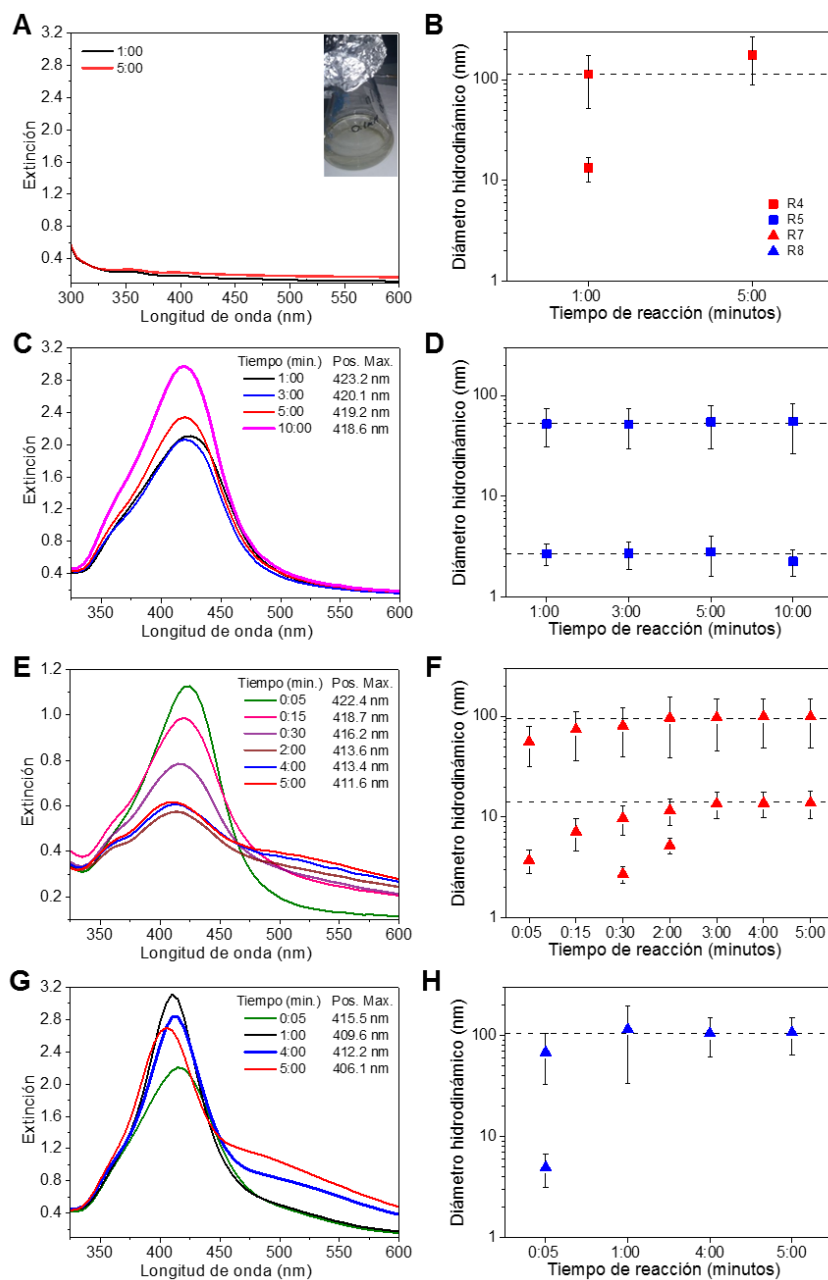


Figura 26 Cinética de las síntesis de NPs AgPEG a 100°C en aire (O<sub>2</sub>) y N<sub>2</sub>. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de las reacciones R4, R5, R7 y R8. Los gráficos a la izquierda muestran los resultados de los análisis por espectroscopía UV/vis: A) R4, C) R5, E) R7 y G) R8. Las leyendas representan el tiempo de reacción y a la derecha se muestra la posición del máximo del pico (Pos. Max.). La figura insertada en (A) muestra el coloide R4 incoloro y transparente a los 5 minutos de reacción. Los gráficos a la derecha muestran los resultados de DLS: B) R4, D) R5, F) R7 y H) R8.

Este experimento revela la estabilidad de las NPs R5-AgPEG en el tiempo de reacción y la inestabilidad de NPs R8-AgPEG. En las reacciones R2 (0.5 mM/ 60°C/ O<sub>2</sub>) y R8 (0.5 mM/ 100°C/ N<sub>2</sub>), la relación PEG200/Ag<sup>+</sup> de 60 no fue suficiente para producir NPs estables formándose un precipitado en ambos casos. En cambio, las condiciones de la reacción R5 (0.5 mM/ 100°C/ O<sub>2</sub>) favorecieron la formación de un coloide estable de NPs R5-AgPEG casi-esféricas de 26 nm. Este resultado es coherente con el rol de la DTO-PEG que propusimos anteriormente. En R5, la DTO-PEG favorece la reducción de todos los iones Ag<sup>+</sup> y/o la estabilización de todas las NPs R5-AgPEG formadas debido al incremento del número de i) grupos funcionales en la molécula de PEG que pueden reducir iones Ag<sup>+</sup>, ii) moléculas con actividad reductora y/o estabilizante (productos de la DTO-PEG).

Las diferencias observadas entre las reacciones R4 vs R7 y R5 vs R8 indican un efecto del O<sub>2</sub> en las síntesis de NPs de plata con PEG. Esto es coherente con nuestra propuesta de la acción de la DTO-PEG en las reacciones R4-R6. Esto podría confirmarse por técnicas como la RMN <sup>1</sup>H, y cromatografía gaseosa que pueden detectar la presencia de los productos de la DTO-PEG en las diferentes condiciones de síntesis. Sin embargo, la baja concentración de PEG que usamos en nuestro estudio dificulta realizar este tipo de análisis. En el estudio realizado por Luo et al. (2005), encontramos una evidencia de que el PEG se degrada durante la síntesis de NPs de plata a altas temperaturas. Estos autores, realizaron un análisis de RMN <sup>1</sup>H del PEG después de la síntesis de NPs de plata, encontrando picos entre 4 y 4.5 ppm. Estos picos indican la degradación del PEG formando productos de menor peso molecular con otros grupos funcionales (Han, Kim y Kwon, 1995; Boughen, Liggat y Ellis, 2010).

Luo et al. (2005) y Nam et al. (2011) evaluaron PEG de diferentes pesos moleculares en la síntesis de NPs de plata a altas temperaturas y en presencia de O<sub>2</sub> (sin variar la concentración de AgNO<sub>3</sub>). Aunque estos autores no tuvieron en cuenta la DTO-PEG, sus resultados pueden ser explicados por este proceso (ver **Figura 24**). Estos grupos (Luo *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2011) observaron que la actividad reductora de PEG mejora con el incremento de la temperatura o del peso molecular de PEG. A mayor temperatura, se degrada un mayor número de

moléculas PEG, por lo que es mayor el número de i) grupos oxi-etilenos que se oxidan a peróxido (mayor reducción de iones  $\text{Ag}^+$ ) y ii) productos de la DTO-PEG (moléculas con actividad reductora y estabilizante). De manera similar, una molécula PEG de mayor peso molecular posee más grupos oxi-etilenos por lo que i) aumenta la probabilidad que se oxidan a hidroperóxidos reduciendo iones  $\text{Ag}^+$  y ii) cada molécula puede dar lugar a un mayor número de productos de la DTO-PEG (en las condiciones de síntesis descritas anteriormente).

### **2.2.7 Reproducibilidad de las reacciones R1 y R5**

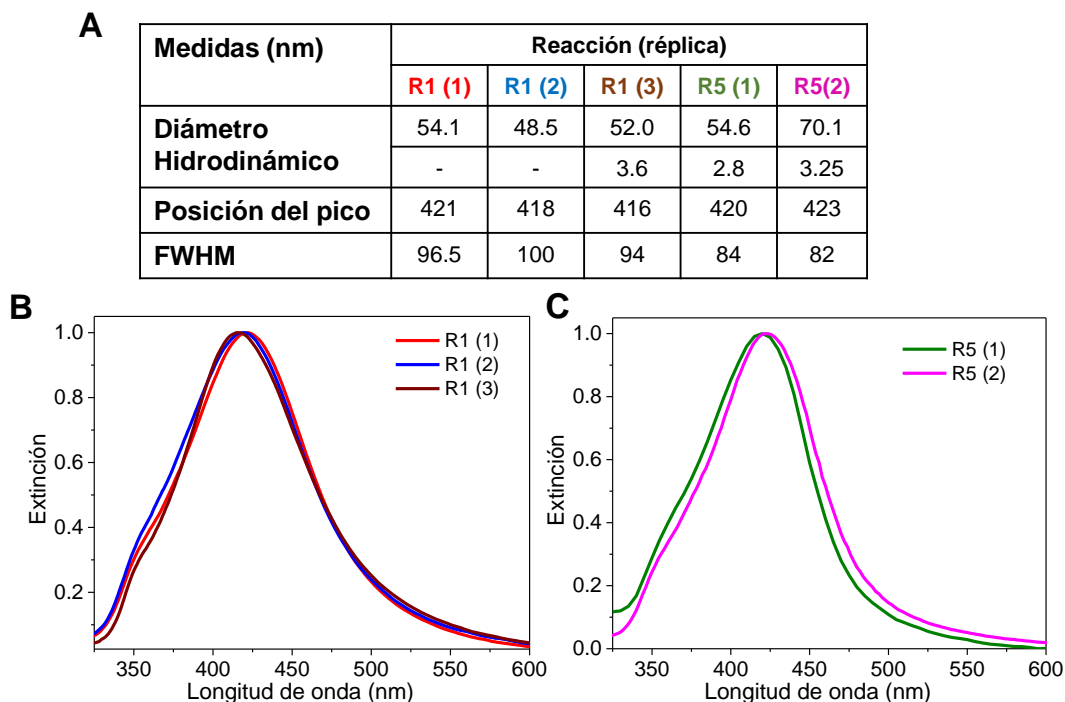
De las condiciones evaluadas anteriormente, solo las reacciones R1 y R5 produjeron coloides estables de NPs AgPEG. Con el fin de evaluar la reproducibilidad de estas síntesis, realizamos réplicas independientes de estas reacciones (3 réplicas de R1 y 2 réplicas de R5) (ver **Figura 27**).

Tuvimos en cuenta varios factores para lograr la reproducibilidad de estas síntesis. La solución de  $\text{AgNO}_3$  a 10 mM se preparó minutos antes de cada síntesis. El volumen necesario para alcanzar la concentración deseada de  $\text{AgNO}_3$  (R1: 0,1 mM y R5: 0,5 mM) se adicionó rápidamente a una solución homogénea de PEG200 al 0.6% y NaOH al 0.005% a la temperatura deseada (R1: 60°C y R5: 100°C (temperatura de ebullición)).

Los resultados de las diferentes síntesis se analizaron por DLS y UV/vis (ver **Figura 27**). En el espectro de extinción de NPs R5-AgPEG, el máximo del pico es de  $421,5 \pm 2,12$  nm y el FWHM de  $83,4 \pm 1,15$  nm. En ambas síntesis el promedio del DH de las NPs es de  $62,3 \pm 10,96$  nm y también se observaron NPs de  $3,0 \pm 0,32$  nm. La posición promedio del máximo del pico en el espectro de extinción de NPs R1-AgPEG fue de  $418,3 \pm 2,52$  nm y el FWHM de  $96,8 \pm 3,01$  nm. Las tres síntesis de R1 produjeron NPs con DH de  $51,5 \pm 2,83$  nm. Solo en la tercera réplica de la reacción R1 (R1 (3)) se detectaron NPs de 3,6 nm por DLS (ver **Figura 27<sup>a</sup>**). No obstante, la presencia de una población de tamaño similar se observa en la cinética de reacción de las síntesis 1 y 2 a menores tiempos de síntesis. En DLS, la presencia de NPs pequeñas puede estar enmascarada por NPs de mayor tamaño



debido a que la intensidad de la dispersión es proporcional a la sexta potencia del diámetro de la partícula.



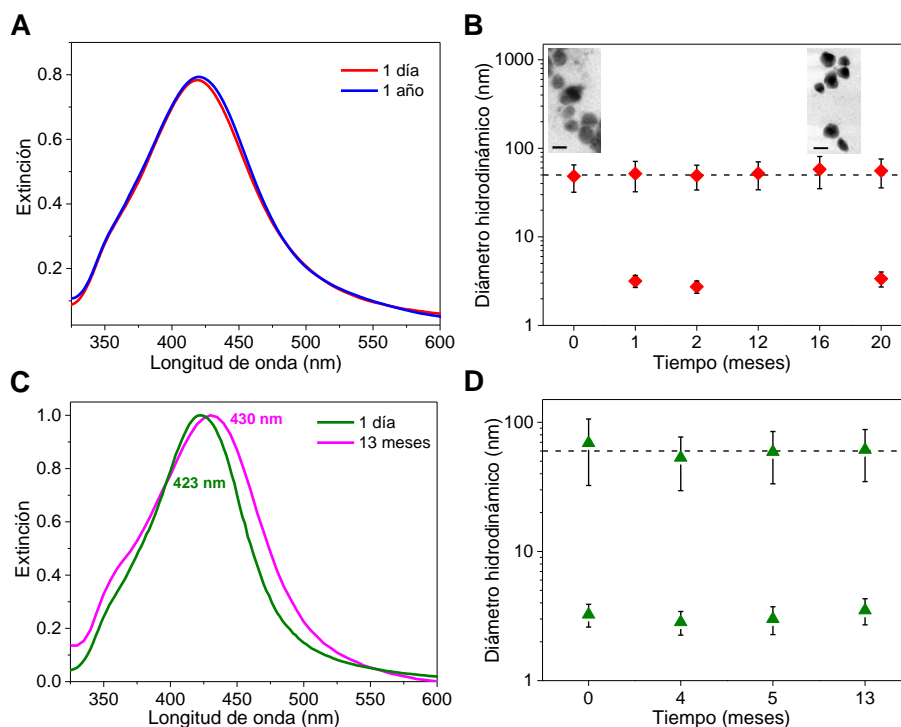
**Figura 27 Reproducibilidad de las reacciones R1 y R5. A)** Resultados DLS y características de los espectros de extinción que se muestran en B y C. Espectros de extinción normalizados de las NPs AgPEG producidas en **B)** tres síntesis R1 y **C)** dos síntesis de R5.

### 2.2.8 Estabilidad en el tiempo de NPs R1 y R5-AgPEG

Las NPs R1 y R5 AgPEG se conservaron a  $25\pm 4^\circ\text{C}$  en la oscuridad. Monitoreamos la estabilidad de estas NPs en el tiempo mediante el análisis de muestras por DLS y UV/vis, en diferentes tiempos después de la síntesis (ver **Figura 28**).

El coloide de NPs R1-AgPEG no cambió su apariencia ni sus propiedades físico-químicas durante al menos 12 meses, como refleja el espectro de extinción en la **Figura 28A**. Este coloide, conservado en las condiciones antes descritas, permaneció amarillo transparente sin formar precipitado. El DH de la población de NPs R1-AgPEG de mayor tamaño se mantuvo con un DH entre 48 - 52 nm hasta 12 meses después de la síntesis. A partir de los 16 meses mostró un ligero incremento entre 55 - 57 nm (ver **Figura 28B**). Las imágenes TEM tomadas 15 días

y 17 meses después de la síntesis, mostraron NPs con morfología y distribución de tamaños similares (ver imágenes insertadas en la **Figura 28B**).



**Figura 28 Estabilidad en el tiempo de NPs R1 y R5-AgPEG.** Se muestran los espectros de extinción de **A)** NPs R1-AgPEG y **C)** NPs R5-AgPEG así como los análisis DLS de **B)** NPs R1-AgPEG y **D)** NPs R5-AgPEG. Las imágenes MET insertadas en el gráfico (B), son NPs R1-AgPEG de la síntesis 2 (ver Figura 28) tomadas 15 días y 17 meses después de la síntesis.

Por DLS, detectamos poblaciones de NPs R5-AgPEG con DH similares hasta 13 meses después de la síntesis. Sin embargo, en este tiempo, el espectro de extinción muestra un desplazamiento de 7 nm hacia mayores longitudes de onda observándose más acentuado el hombro izquierdo alrededor de 350 nm (ver **Figura 28**). Esto sugiere un crecimiento lento de la población de mayor tamaño. Teniendo en cuenta que el análisis TEM mostró NPs de tamaños similares en los coloides de R1 y R5, el color anaranjado del coloide R5 se puede atribuir a una mayor concentración de NPs comparado con el coloide R1. Esta conclusión se sustenta también por la mayor intensidad del espectro de extinción de NPs R5-AgPEG comparado con el de NPs R1-AgPEG (ver **Figura 21**). Para lograr una mayor

estabilidad de coloide R5 podemos realizar una dilución del coloide de al menos  $\frac{1}{2}$  en agua desionizada, una vez concluida la síntesis.

### **2.3 Conclusiones del capítulo 2**

Los mecanismos descritos en la literatura para la reducción de iones  $\text{Ag}^+$  por moléculas orgánicas involucran únicamente, la acción de los grupos terminales de dichas moléculas. En el presente estudio, proponemos que en las síntesis de NPs AgPEG realizadas a temperaturas mayores de  $70^\circ\text{C}$  en presencia de  $\text{O}_2$ , tiene lugar un mecanismo de reducción adicional. En estas condiciones, se produce la degradación térmica oxidativa del PEG. Durante este proceso, los grupos oxo-etilenos, los radicales libres y productos de degradación del PEG intervienen en la síntesis de las NPs AgPEG. Este mecanismo explica el incremento en la acción reductora de PEG con el incremento de temperatura de reacción o el uso de PEG de mayor peso molecular, a través del incremento en el número de los grupos funcionales por molécula, así como del número de moléculas que actúan como agentes reductores y/o estabilizantes.

En este capítulo, también hacemos énfasis en el efecto de la relación  $\text{PEG}/\text{Ag}^+$  en las síntesis realizadas a diferentes temperaturas. Este parámetro influye en la divergencia de resultados obtenidos por diferentes autores, al emplear PEG de igual peso molecular para la síntesis de NPs AgPEG. El análisis comparativo de nuestros resultados con los reportados en la literatura en condiciones que favorecen la DTO-PEG, sugiere que la relación  $\text{PEG}/\text{Ag}^+$  que produce un coloide estable de NPs AgPEG depende del peso molecular de PEG y la temperatura de reacción.

Adicionalmente, este estudio permitió establecer las condiciones óptimas para la síntesis reproducible de NPs AgPEG estables en el tiempo (más de 1 año). Esto favorece la reproducibilidad y comparación de las aplicaciones de estas NPs en diferentes momentos después de su síntesis. También favorecería comparar estudios entre diferentes laboratorios que decidan emplear este método de síntesis de NPs AgPEG. Otras ventajas de este método (R1) son su sencillez, no daña el medio ambiente (verde) y se realiza en condiciones fáciles de reproducir en cualquier laboratorio.

## **CAPÍTULO 3: Efecto de las nanopartículas de plata en la señal Raman de eritrocitos vivos.**

### **3.1 Metodología**

#### **3.1.1 Síntesis de nanopartículas de plata con NaBH<sub>4</sub> (NPAGs)**

Para la síntesis de NPAGs empleamos un método descrito anteriormente (Ciou *et al.*, 2009), con algunas modificaciones. El borohidruro de sodio (632287 / Sigma-Aldrich) se usó como agente reductor primario de los iones plata y el citrato de sodio (W302600 / Sigma-Aldrich) como agente reductor secundario y estabilizante. Las soluciones de NaBH<sub>4</sub>, a 20 mM, citrato de sodio a 5 mM y AgNO<sub>3</sub> 10 mM se prepararon minutos antes de la síntesis. En un Erlenmeyer, calentamos agua desionizada a 60°C. Cuando el agua alcanzó la temperatura deseada, añadimos 0.2 mM de AgNO<sub>3</sub> y 0.5 mM de citrato de sodio (en la oscuridad). La reacción se agitó vigorosamente durante 15 minutos, y luego se añadió rápidamente 2 mM de NaBH<sub>4</sub>. Inmediatamente, se observó la formación de un coloide amarillo. Continuamos agitando vigorosamente a 60°C durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, el coloide de NPAGs se dejó refrescar y se conservó a 25±4°C en la oscuridad.

#### **3.1.2 Estabilidad de NPs de plata en presencia de sales**

Para evaluar la estabilidad de las NPs de plata en presencia de sales, realizamos diluciones ½ de cada coloide en diferentes concentraciones de NaCl (50-200 mM). Como controles, igual volumen de cada coloide se diluyó ½ en agua o tampón fosfato salino (PBS: siglas del inglés phosphate buffer saline). Además, se evaluó la estabilidad de las NPs en el tiempo, analizando en DLS y UV/Vis, muestras de los coloides de NPs de plata tomadas a diferentes tiempos después de la síntesis (1 día - 2 años).

### **3.1.3 Ensayo de hemólisis**

Evaluamos el efecto de las NPs en la viabilidad de los eritrocitos mediante un ensayo de hemólisis. Alícuotas iguales de eritrocitos frescos se incubaron durante 2 h a  $25\pm 4^\circ\text{C}$  con diferentes diluciones (1:10 a 1:100) de NPs de plata (NPAGs, NPs R1 y R5-AgPEG). Como controles de este ensayo, una alícuota de eritrocitos se diluyó en agua desionizada (control positivo de hemólisis) y otra en PBS 1X (control negativo). Después del tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 3 minutos y la presencia de hemoglobina libre en los sobrenadantes se midió en un espectrofotómetro de placas en el rango 300 a 700 nm.

### **3.1.4 Obtención de hemoglobina libre**

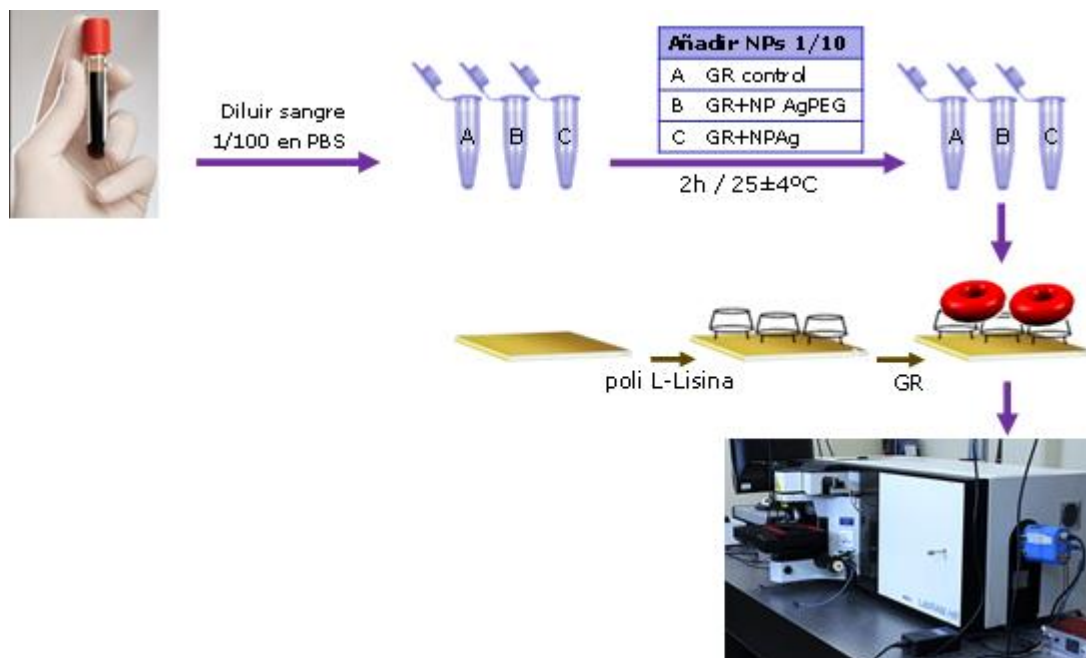
La obtención de hemoglobina libre, se realizó mediante la lisis de los eritrocitos. Centrifugamos 1 ml de sangre total a 6000 rpm durante 2 minutos. Desechamos el sobrenadante y completamos el volumen con PBS. Realizamos dos lavados de los eritrocitos en PBS. Después de la segunda centrifugación en las mismas condiciones, añadimos agua desionizada para completar 1 ml, provocando la lisis de los GR. Centrifugamos nuevamente esta muestra a 6000 rpm durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante, que contiene hemoglobina libre, se separó en otro tubo y se conservó a  $4^\circ\text{C}$  hasta el día del experimento.

### **3.1.5 Experimentos Raman**

Para los ensayos Raman en eritrocitos vivos, el mismo día del experimento se extrajo sangre por venopunción de un individuo sano. Realizamos una dilución de sangre en PBS 1:100 (V:V) y añadimos NPs de plata en una dilución final 1:10 (V:V). Como control, empleamos células con la misma dilución en PBS. Los glóbulos rojos (GR), se incubaron con (o sin) NPs de plata durante 2 h a  $25\pm 4^\circ\text{C}$ .

Con el fin de inmovilizar los eritrocitos para las mediciones de los espectros Raman, recubrimos obleas de silicio con poli-L-lisina (ver **Figura 29**). Después del periodo de incubación de los eritrocitos con las NPs de plata, añadimos una gota de la

suspensión de GR (con o sin NPs), a una oblea de silicio cubierta con poli-L-lisina. La muestra se dejó reposar 20 minutos y luego se realizó la medición.



**Figura 29** Representación del diagrama de flujo seguido para la evaluación del efecto de NPs de plata en el espectro Raman de glóbulos rojos (GR). Ver detalles de los experimentos en la sección materiales y métodos.

Las mediciones se realizaron con un micro-espectrómetro Raman (LabRam HR Horiba) equipado con una cámara CCD, láser de 488 nm. La potencia del láser 488 nm en la muestra es de 5 mW. No empleamos condiciones confocal, midiendo con un objetivo 50X y una rejilla de difracción de 600 orificios. Cada medición se realizó con una adquisición de 20 segundos. Analizamos los datos empleando los programas LabSpect 6 y Origin 9. En cada experimento, calibramos la frecuencia empleando como referencia la banda de vibración del silicio que muestra un desplazamiento Raman ( $\Delta\bar{\nu}$ ) a  $520\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2 Resultados y Discusión

Varios estudios emplean NP Ags y NPs AgPEG en estudios Raman de moléculas. En este capítulo, evaluaremos las NPs de plata como amplificadores de la señal Raman de GR vivos. Para ello, sintetizamos NPs AgPEG (Capítulo 2) y NP Ags y

establecimos las condiciones que no afectan la viabilidad de los GR durante los experimentos.

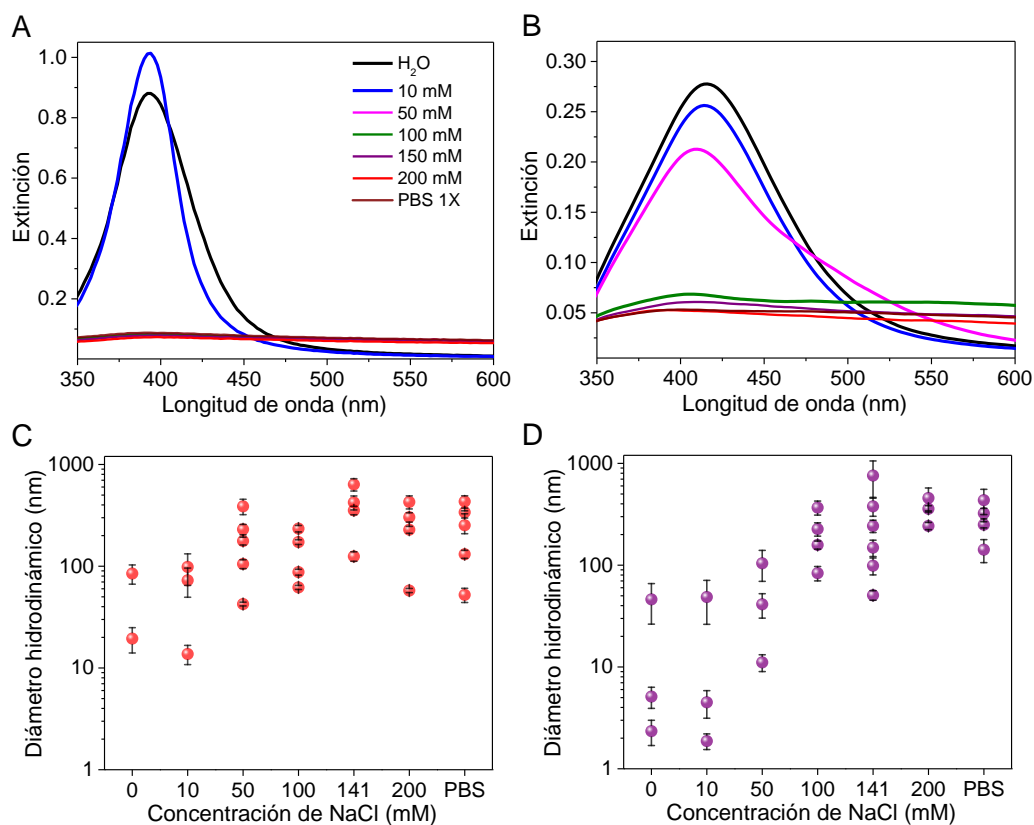
Las NPs de plata sintetizadas con NaBH<sub>4</sub> y citrato de sodio (NPAgs) (ver procedimiento en el acápite 3.1.1) formaron un coloide de color amarillo intenso. El espectro de extinción correspondiente muestra un pico intenso y estrecho (FWHM de 61.2 nm) a 394 nm (ver espectro de extinción en agua en la **Figura 30A**). Este espectro refleja una alta concentración de NPAgs esféricas y pequeñas con poca poli-dispersión (en forma y tamaño) (Slistan-Grijalva *et al.*, 2005a; Ciou *et al.*, 2009). Las imágenes de TEM de las NPAgs mostraron NPs esféricas de 20 nm (ver Anexo 1).

### **3.2.1 Estabilidad de las NPs de plata en presencia de sales**

Entre las aplicaciones de las NPs de plata, nuestro grupo tiene especial interés en el efecto de estas NPs en la amplificación de la señal Raman de células vivas. Los experimentos en células vivas requieren el uso de un medio isotónico, el cual puede provocar la agregación de las NPs afectando sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, se ha visto que la adición de iones haluros o sulfato a las NPs de plata puede favorecer el efecto SERS (Doering & Nie 2002; Aroca *et al.* 2005; Bell & Sirimuthu 2006; Ciou *et al.* 2009). Por lo antes expuesto, decidimos evaluar el efecto de sales en las NPs de plata que se emplearán en estudios Raman.

Para evaluar la estabilidad de las NPs en presencia de sales, realizamos diluciones ½ de los coloides de NPAgs y NPs R1-AgPEG en PBS y en diferentes concentraciones de NaCl (10-200 mM). Las NPAgs son más sensibles al efecto de sales que las NPs R1-AgPEG, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Shkilnyy *et al.*, 2009). La adición de pequeñas concentraciones de NaCl (10 mM) a las NPAgs provocó un incremento de la intensidad del plasmón de superficie y el estrechamiento del pico (ver Figura 30<sup>a</sup>). En cambio, concentraciones a partir de 50 mM de NaCl y la dilución en PBS de las NPAgs, provocó la pérdida de absorción asociada al LSPR en el espectro de extinción (ver **Figura 30A**). Esto coincide con la detección de agregados mayores de 150 nm en DLS (ver **Figura 30C**). En

cambio, la agregación de las NPs R1-AgPEG mostró una dependencia con la concentración de sales. A medida que aumentamos la concentración de sales, observamos en el pico del espectro de extinción un incremento en el FWHM, un desplazamiento del máximo hacia menores longitudes de onda y una reducción en intensidad, así como una elevación en la línea base (debido a la dispersión Mie por los agregados). En el análisis DLS, observamos mayores DHs y poli-dispersión asociados al incremento de la concentración de sales (ver **Figura 30B y D**).



**Figura 30 Efecto de la adición de sales a NPs de plata.** Se muestra la variación de los espectros de extinción (A, B) y el diámetro hidrodinámico (C, D) de las poblaciones de NPs de plata con la concentración de sales: **A, C**) NPAGs y **B, D**) NPs AgPEG. La leyenda mostrada en el gráfico A es válida también para B.

Durante los experimentos observamos que los coloides amarillos de NPs de plata se volvieron incoloros con la exposición a concentraciones crecientes de sales, incluyendo concentraciones fisiológicas. Esto es consistente con la obtención de espectros de extinción planos con un incremento en la línea base (ver **Figura 30A, B**), lo cual refleja la formación de agregados (mayores de 100 nm) donde la



dispersión Mie contribuye a la reducción de la intensidad del haz transmitido contribuyendo al incremento de la línea base del espectro. Además, al formarse agregados, se pierden las propiedades ópticas de las NPs asociadas a la absorción del plasmón de superficie. Sin embargo, algunos autores inducen la agregación de NPs de plata unidas a la molécula de interés mediante la adición de sales para favorecer el efecto SERS (Ciou et al., 2009). Teniendo esto en cuenta, decidimos evaluar el efecto de las NPs de plata en ensayos Raman de los GR vivos.

### **3.2.2 Efecto de sales y NPs de plata en el espectro de absorción de Hb**

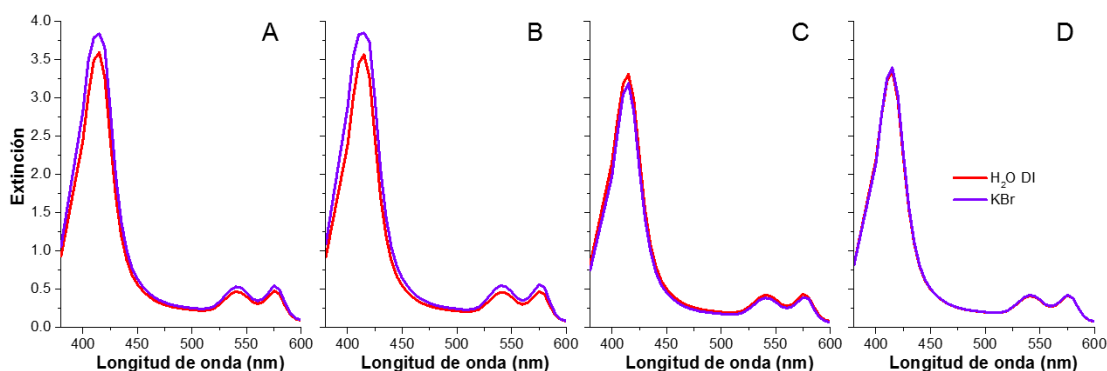
Antes de evaluar el efecto de las NPs de plata en la señal Raman de GR, evaluamos su efecto en el espectro de absorción de la Hb libre. Estas mediciones se realizaron en agua y en presencia de sales (KBr 50 mM).

Se sabe que la absorción de la banda de Soret (absorción del grupo hemo) es sensible al entorno de este grupo (Jones, Balakrishnan y Spiro, 2012). Con el fin de conocer si la incubación de las moléculas de Hb con las NPs de plata afecta la absorción de las moléculas de Hb, medimos su espectro al ser incubadas con (o sin) NPs y en presencia (o no) de sales.

La adición de sales a la Hb produjo un incremento en la intensidad de la banda de Soret (422 nm) (ver **Figura 31A**). Este efecto también se observó en las muestras de Hb incubadas con NPAGs en presencia de sales (ver **Figura 31B**). En cambio, en las muestras de Hb incubadas con NPs R1 y R5-AgPEG se observó una reducción en la intensidad de la absorción de esta banda con respecto al control de Hb libre sin NPs y no se observaron cambios entre la muestra incubada en agua con respecto a las muestras incubadas en presencia de sales (ver **Figura 31C y D**).

La presencia de sales puede propiciar un cambio conformacional en la Hb que provoque este incremento en la absorción. Se ha reportado que el cambio en la estructura cuaternaria de la Hb por la transición entre el estado T y R produce cambios en el grupo hemo que favorecen una mayor intensidad en la absorción de la banda de Soret. Existen evidencias de cómo se afecta el grupo hemo por la unión de iones halogenuros (Ikeda-Saito et al. 1985). Por otro lado, la interacción entre Hb

y NPs AgPEG puede reducir la absorción por la presencia del PEG en el entorno del grupo Hemo.

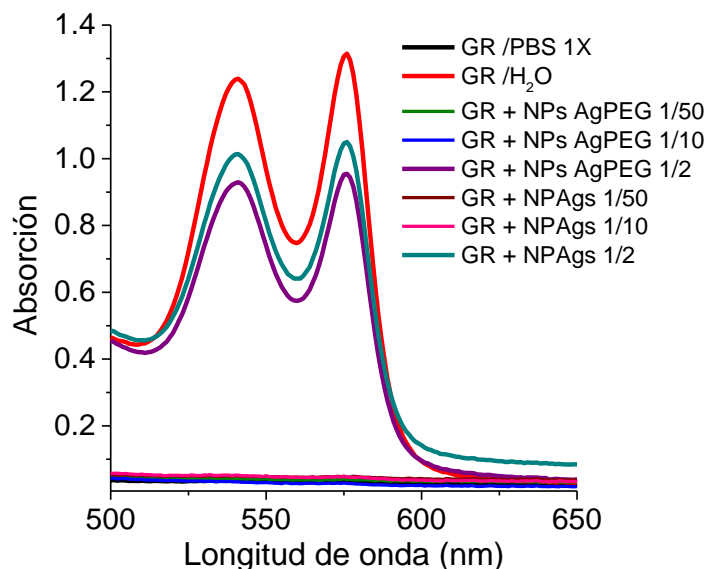


**Figura 31 Efecto de sales y NPs en la absorción de la Hb libre. A) Hb libre B) Hb libre + NPAs, C) Hb libre + NPs R1-AgPEG y D) Hb libre + NPs R5-AgPEG. Las muestras se diluyeron en agua desionizada (líneas en rojo) o en KBr 50 mM (líneas violetas).**

### 3.2.3 Efecto de NPs de plata en la viabilidad de los eritrocitos

Para evaluar el efecto de NPs de plata en el espectro Raman de GRs, es importante determinar la mínima dilución de estas NPs que no afecta la viabilidad de los eritrocitos. La toxicidad de NPs en GR puede estimarse determinando el contenido de hemoglobina (grado de hemólisis) en el sobrenadante de GR mediante espectroscopía de absorción en el rango visible (500-650 nm) (ver **Figura 32**). En este rango, la oxi-hemoglobina muestra picos con máximos de absorción a 541 nm y 576 nm. En este estudio solo analizamos las bandas Q del espectro ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de la hemoglobina debido a la superposición de la banda de Soret (422 nm) con la absorción del plasmón de superficie de las NPs de plata.

En el estudio de hemólisis por efecto de NPs de plata, los GRs diluidos 1/10 en PBS se incubaron con diferentes diluciones de NPs de plata durante 2 horas. En este ensayo empleamos como controles de hemólisis, muestras con igual volumen de GRs diluidos en agua (medio hipotónico / control positivo) o en PBS 1X (medio isotónico / control negativo). Luego centrifugamos las muestras durante 10 minutos a 6000 rpm y analizamos el sobrenadante por espectroscopía de absorción para la detección de Hb libre.



**Figura 32** Efecto de NPs AgPEG y NPAs en la viabilidad de los glóbulos rojos.

Como se observa en la **Figura 32**, las diluciones  $\frac{1}{2}$  de NPs AgPEG y NPAs provocan hemólisis de los GR. Este efecto está mediado por la alta concentración de NPs y no por la reducción en la concentración de sales del medio, como se evidencia en otros estudios donde añadimos un volumen de agua igual al de NPs. Seleccionamos la dilución  $\frac{1}{10}$  de NPs de plata para realizar los ensayos Raman en GR, pues es la mínima dilución donde no detectamos Hb en el sobrenadante (hemólisis) de GRs.

### **3.2.4 Efecto de NPs de plata en el espectro Raman de GR vivos**

En los experimentos Raman realizados en eritrocitos vivos tratamos de favorecer la interacción entre NPs y los glóbulos rojos durante el proceso de agregación, de manera tal que los agregados de NPs se formaran en la superficie de estas células. Para ello, homogeneizamos la suspensión de GR diluidos en PBS justo antes de añadir las NPs de plata y continuamos agitando suavemente durante los primeros minutos de la incubación.

En las mediciones Raman, calculamos el área iluminada por el láser (A). Para ello, primero determinamos el diámetro teórico (Dt) del punto iluminado por el láser de 488 nm (spot), al emplear un objetivo 50X con apertura numérica (NA) de 0.75:

$$Dt = \frac{\lambda \times 1.22}{NA} = \frac{488 \text{ nm} \times 1.22}{0.75} = 793.8 \text{ nm} \approx 800 \text{ nm}$$

$$A = \pi r^2 = 3.14 \times (0.4 \mu\text{m})^2 = 0.5 \mu\text{m}^2$$

Lo más probable es que las NPs se unan a la superficie del eritrocito (ver **Figura 20**) y no entren al GR durante el experimento, teniendo en cuenta que i) las NPs de plata forman agregados en un medio isotónico, ii) los GRs son muy pequeños (<10  $\mu\text{m}$ ) y iii) las NPs se incubaron con los GRs durante poco tiempo (2h) antes de la medición (Lin *et al.*, 2009)(Brazhe *et al.*, 2009). El área de la membrana plasmática del eritrocito es de  $\sim 147 \mu\text{m}^2$  (Shaklai, Yguerabide y Ranney, 1977), y las moléculas de Hb unidas a la cara interna de la membrana (Hb<sub>m</sub>) del GR tienen una densidad de  $\sim 9\,500 \text{ Hb}_m/\mu\text{m}^2$ . Se piensa que las Hb<sub>m</sub> son las únicas que pueden contribuir al espectro SERS por su cercanía con NPs ubicadas en la cara externa de la membrana del GR (ver **Figura 20**) (Brazhe *et al.*, 2009). Por tanto, al incidir el láser en un área de  $0.5 \mu\text{m}^2$  de la membrana del eritrocito, se estaría colectando la señal correspondiente a  $\sim 4\,750 \text{ Hb}_m$  (como máximo). Además, se ha planteado que la desoxi-hemoglobina tiene mayor afinidad de unión a la membrana del eritrocito que la oxi-hemoglobina (Tsuneshige, Imai y Tyuma, 1987). Lo anterior explica por qué en nuestro experimento, a pesar de no establecer condiciones para la desoxigenación de los eritrocitos, el espectro SERS es muy similar al obtenido por Wood *et al.* (2002) para eritrocitos desoxigenados (ver **Figura 34** y **Figura 19**).

A diferencia de lo reportado por Brazhe *et al.* (2009), en nuestros resultados no observamos muchas diferencias en las posiciones de los picos entre los espectros de GRs incubados en ausencia y en presencia de NPs de plata. Esto puede estar dado por el empleo de condiciones experimentales diferentes. En el estudio realizado por Brazhe *et al.* (2009), emplean el láser 514 nm para excitar la muestra, una mayor concentración de NPs (NPs : GR 3:2) y realizan los ensayos en condiciones ligeramente hipertónicas. En nuestro ensayo empleamos el láser

488 nm, menor concentración de NPs y condiciones isotónicas, pues el volumen añadido de NPs (1:10) no afecta la isotonicidad del medio. Por otro lado, estudios realizados en células nucleadas, indican que es posible coleccionar el espectro Raman de diferentes zonas de la célula (núcleo, citoplasma, membrana celular) (Uzunbajakava *et al.*, 2003; Matthaus *et al.*, 2007). Por esta razón, aunque Brazhe *et al.* (2009) plantearon que la Hb<sub>c</sub> son las que contribuyen principalmente al espectro Raman resonante debido a su mayor concentración, esto puede variar dependiendo del punto donde se enfoca el láser. Nuestros resultados sugieren que tanto en el espectro SERS como en el espectro Raman resonante, se colecta señal proveniente de moléculas Hb<sub>m</sub> principalmente. Esto explicaría por qué en los tres espectros Raman predominan picos que se corresponden con GR desoxigenados (comparar **Figura 34** con la **Figura 19B**).

#### **3.2.4.1 Efecto de amplificación de la señal Raman por NPs de plata**

En la mayoría de los picos del espectro Raman de GRs se observa una diferencia de  $10^2$  en presencia de NPs AgPEG con respecto al espectro control (sin NPs) y de  $10^3$  en presencia de NPAs (ver **Figura 34**). En ambos casos, el mayor incremento se observó en el pico de  $1357\text{ cm}^{-1}$  (asignado al modo de vibración simétrico  $\nu_4$  (1/2 anillo pirrol)) que fue de  $10^3$  al incubar los GRs con NPs AgPEG y de  $10^4$  al incubar los GRs con NPAs (ver **Tabla 3**). Este pico es el de mayor intensidad en el espectro Raman de GRs excitados con un láser 488 nm (ver **Figura 19**) (Wood y McNaughton, 2002). La región I ( $1650\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) del espectro es la segunda zona con mayor amplificación de la señal en los espectros de GR incubados con NPs de plata.

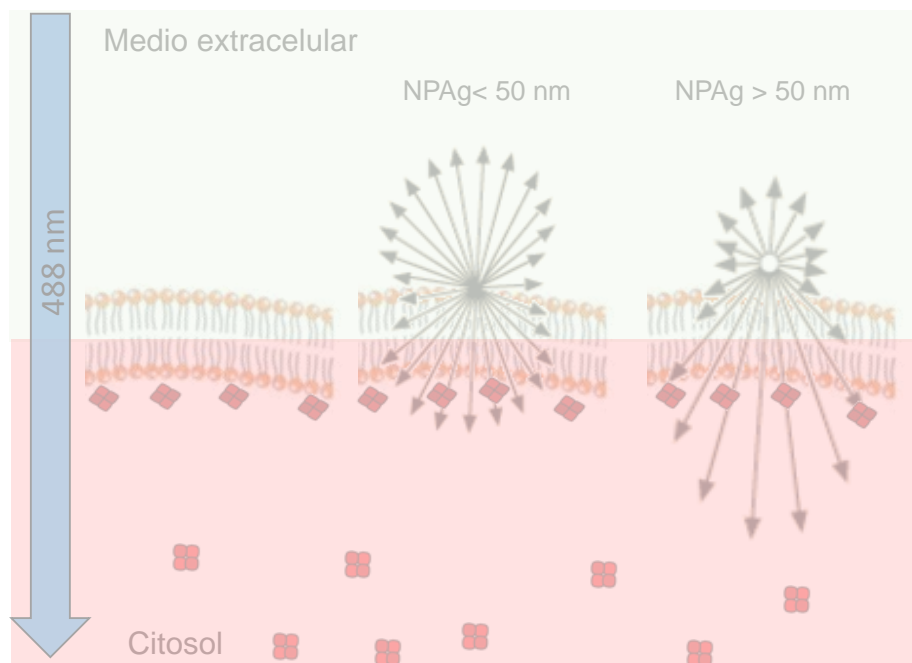
Asumiendo que la molécula de Hb y las NPs se encuentran en diferentes caras de la membrana del eritrocito, y dado que no se observan diferencias en la posición de los picos entre los espectros, descartamos que el mecanismo de transferencia de carga tenga alguna contribución al efecto SERS. En cambio, los mecanismos electromagnético y de resonancia influyen en el efecto observado.

La presencia de NPs de plata contribuye a la variación de la polarizabilidad de las moléculas de Hb. La oscilación coherente y colectiva de electrones de la banda de

conducción en la superficie de una NP de plata de aproximadamente 25 nm, provoca cambios en la polaridad de moléculas de Hb (5.5 nm) que se encuentren cercanas (a menos de 20 nm) a la superficie de la NP metálica. Las moléculas de Hb están bajo el efecto de polarización inducido por la incidencia del láser (campo eléctrico variable) y "reforzado" por el plasmón de superficie de NPs de plata cercanas. Los cambios en la polarizabilidad de la molécula por efecto de las NPs pueden incrementar la probabilidad de eventos de dispersión Raman.

Otro factor que puede aportar a la amplificación de la señal Raman, además de los mecanismos descritos en la literatura, es la dispersión elástica de las NPs y agregados de NPs de plata. En la **Figura 33**, se muestra una representación esquemática del efecto de dispersión elástica de NPs de plata y agregados de NPs en la superficie del GR, al incidir un láser de 488 nm.

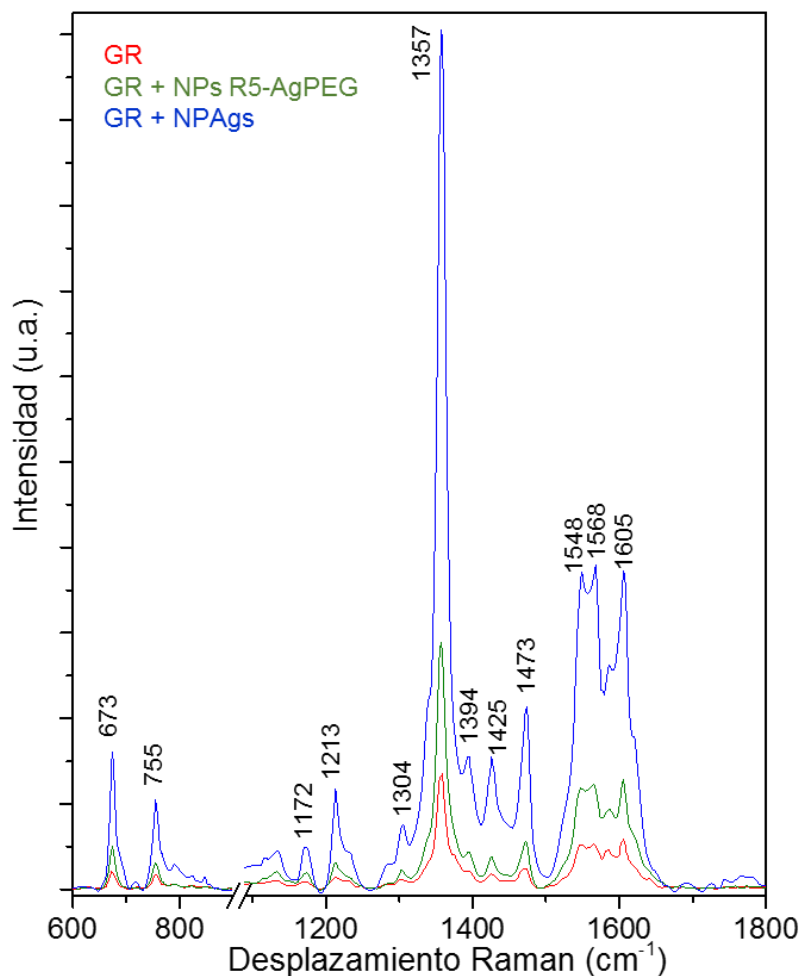
Las NPs de plata se comportan como fuentes puntuales de radiación debido a la dispersión elástica. Dependiendo de la relación entre la  $\lambda$  del láser incidente y el diámetro de la NP se puede obtener un efecto de dispersión Rayleigh o Mie. En la **Figura 33**, la imagen del centro representa la dispersión Rayleigh en presencia de NPs menores de 50 nm y a la derecha la dispersión Mie para NPs mayores de 50 nm. La intensidad de la dispersión "hacia el frente" se incrementa al aumentar el tamaño de la NP. De esta forma, NPs o agregados más grandes incrementan de manera local la intensidad de la radiación incidente en moléculas cercanas a las NPs, lo que aumenta la probabilidad de dispersión Raman por dichas moléculas. En concentraciones fisiológicas de sales (141 mM de NaCl), las NPAGs forman agregados más grandes que las NPs AgPEG (ver **Figura 30**), por lo que probablemente en nuestro ensayo las NPAGs formen agregados más grandes en la superficie de los GR que las NPs AgPEG. En este caso, el efecto Mie podría ser otro factor que contribuya a que la amplificación de la señal Raman de GRs por las NPAGs sea mayor que las NPs AgPEG.



**Figura 33** Representación esquemática del efecto de dispersión elástica por NPs de plata y agregados de NPs en la superficie del GR, al incidir un láser de 488 nm. A la izquierda, se representa una sección de la membrana del GR en ausencia de NPs. En el medio, dispersión Rayleigh por NPs menores de 50 nm. A la derecha, dispersión Mie por NPs mayores de 50 nm. Las NPs se comportan como fuentes puntuales de radiación que aumentan la probabilidad de dispersión Raman en moléculas de Hb cercanas. Las moléculas de Hb representadas por los cuadrados rojos no están en la escala apropiada. Esta moléculas tienen un diámetro de aproximadamente 5,5 nm, siendo 10 veces menores que las NPs de 50 nm.

Se conoce que la agregación de NPAgs forma “puntos calientes” donde se incrementa la intensidad del campo eléctrico (Kneipp *et al.*, 1999; Otto, 2002; Lin *et al.*, 2009; Shkilnyy *et al.*, 2009; Matteini *et al.*, 2015). En nuestro experimento dichos puntos calientes pueden formarse en las uniones de NPs agregadas en la superficie del GR. En esta zona, aumenta la probabilidad de que las moléculas de desoxi-Hb (unidas a la membrana celular) dispersen fotones de manera inelástica (Raman), lo que aumenta la intensidad de la señal Raman del GR. Es posible que el recubrimiento de PEG en las NPs AgPEG favorezca la interacción con la membrana de los GR formándose agregados diferentes, que podrían estar más dispersos provocando la amplificación de la señal en un menor número de moléculas Hb<sub>m</sub>. Por otro lado, el efecto de amplificación dado por el mecanismo electromagnético depende de la distancia entre la NP (o agregados e NPs) y la molécula de interés. La presencia del polímero en NPs AgPEG puede incrementar

en alguna medida la distancia y reducir la absorción de fotones incidentes. En los estudios de NPs incubadas directamente con moléculas de Hb se observó una menor absorción de la Hb en las muestras incubadas con NPs AgPEG en comparación con las muestras de Hb control y las incubadas con NPAsg (ver **Figura 31**). Para una mejor justificación de las diferencias de amplificación de la señal Raman observada en presencia de ambas NPs de plata se requieren análisis TEM, SEM (microscopía electrónica de barrido) o de AFM (microscopía de fuerza atómica) que permitan monitorear la formación o no de agregados de estas NPs en la superficie de estas células, en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 34** Amplificación de la señal Raman de glóbulos rojos (GR) vivos por efecto de NPs de plata. Experimento realizado empleando un láser de 488 nm a una potencia de 5 mW



Como no conocemos el número de NPs y/o agregados involucrados en la amplificación de la señal Raman, ni el número de moléculas que se encuentran bajo su efecto, es difícil determinar el factor de amplificación. Por otro lado, al emplear un objetivo con NA: 0.75, se colecta señal de un gran número de moléculas. Otros estudios donde se emplea objetivo de inmersión con NA: 0.9 y condiciones confocal posibilitan el estudio de una región más reducida en la membrana del eritrocito. Dado que los espectros de la **Figura 34** representan el promedio de la señal proveniente de varias moléculas en la muestra, el **efecto promedio** podría enmascarar en alguna medida la magnitud real del efecto amplificador de las NPs presentes (o sus agregados). En un coloide que contiene NPs heterogéneas, no todas las NPs son partículas calientes, por lo que no todas contribuyen a la amplificación de la señal. La forma, tamaño y estado de agregación de las NPs, además de la  $\lambda$  del láser de excitación, influyen en que una NP o agregados de NPs formen "puntos calientes". (Kneipp *et al.*, 1999)

Al estudiar sistemas biológicos empleando SERS, es importante conocer si la adsorción de la biomolécula a la superficie de las NPs metálicas modifica su estructura afectando su función biológica. En los espectros Raman de GRs no encontramos picos adicionales a los descritos por Wood y McNaughton (2002) (ver **Figura 34**), lo que sugiere que en nuestras condiciones experimentales no se altera la estructura del grupo hemo. Esto es coherente con la posible ubicación de las NPs de plata en la membrana del eritrocito sin interactuar directamente con las moléculas de Hb.

El incremento de la señal Raman por la presencia de NPs de plata favorece una mejor resolución de todos los picos, en especial aquellos con baja intensidad en el espectro del control de células. Esto incrementa la relación señal/ruido favoreciendo el empleo de esta técnica en la obtención de bio-imágenes.

**Tabla 3** Asignación de modos vibracionales e incremento de la señal Raman en GR incubados con NPs de plata. Los colores se relacionan con las diferentes regiones descritas en el capítulo 1 y **Figura 19**.

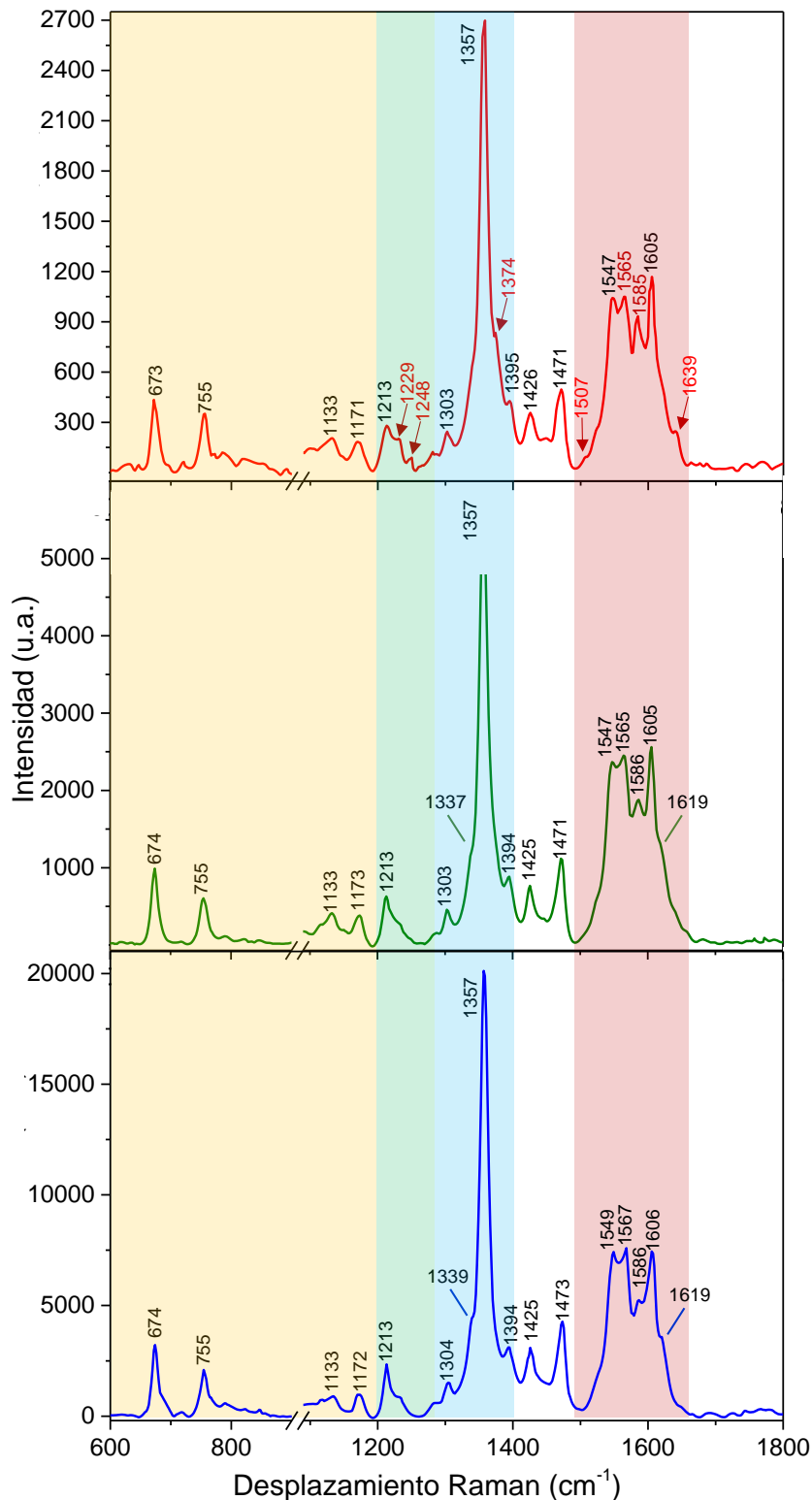
Asignación de modos de vibración		GR control	GR+NP AgPEG		GR+NPAg	
		Posición	Posición	$\frac{I_{(GR+NP AgPEG)}}{I_{(GR)}}$	Posición	$\frac{I_{(GR+NPAg)}}{I_{(GR)}}$
v7	$\delta(\text{deformación del anillo pirrol})_{sim}$	673	674	5.96E+02	674	2.82E+03
v15	v(respiración del anillo pirrol)	755	755	2.56E+02	755	1.74E+03
v22	$v(1/2 \text{ anillo pirrol})_{asim}$	1133	1133	2.07E+02	1133	7.03E+02
v30	$v(1/2 \text{ anillo pirrol})_{asim}$	1171	1173	2.04E+02	1172	7.91E+02
v5 + v18	$\delta(\text{CmH})$	1213	1213	3.48E+02	1213	2.06E+03
v13 o v42	$\delta(\text{CmH})$	1229	no		no	
v13	$\delta(\text{CmH})$	1248	no		no	
v21	$\delta(\text{CmH})$	1303	1303	2.13E+02	1304	1.29E+03
v41	$v(1/2 \text{ anillo pirrol})_{sim}$	no	1337		1339	
v4	$v(1/2 \text{ anillo pirrol})_{sim}$	1357	1357	3.12E+03	1357	1.75E+04
		1374	no		no	
v20	$v(1/4 \text{ anillo pirrol})$	1395	1394	4.57E+02	1394	2.67E+03
v28	$v(\text{C}\alpha\text{Cm})_{sim}$	1426	1425	4.09E+02	1425	2.73E+03
	-CH2 (tijera)	1471	1473	6.25E+02		3.80E+03
2v15	v(respiración del anillo pirrol)	1507	no		no	
v11	$v(\text{C}\beta\text{C}\beta)_{asim}$	1547	1549	1.32E+03	1549	6.23E+03
v2	$v(\text{C}\beta\text{C}\beta)_{asim}$	1565	1565	1.39E+03	1567	6.36E+03
v37	$v(\text{C}\alpha\text{Cm})_{asim}$	1585	1586	1.01E+03	1586	4.38E+03
v19	$v(\text{C}\alpha\text{Cm})_{asim}$	1605	1605	1.39E+03	1606	6.27E+03
		no	1619		1619	
v10	$v(\text{C}\alpha\text{Cm})_{asim}$	1639	no		no	

### 3.2.4.2 Asignación de picos en el espectro de GR

En el espectro Raman resonante de GRs control (ver espectro rojo en la **Figura 35**) predominan picos presentes en células desoxigenadas, sin embargo, se observan algunos picos que corresponden al espectro de células oxigenadas (ver **Figura 19**). En la región I del espectro ( $1650\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ ) observamos un pico muy pequeño a  $1507 \text{ cm}^{-1}$  ( $2\nu_{15}$  respiración del anillo pirrol) en el espectro control de GRs, el cual es característico de oxihemoglobina (ver **Figura 19A**) y no se observó en los espectros SERS. Un pico de mayor intensidad a  $1547 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{11}$ :  $v(\text{C}\beta\text{C}\beta)_{as}$ ) corresponde a desoxi-Hb y está presente en los tres espectros. Los picos a  $\sim 1586 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{37}$ :  $v(\text{C}\alpha\text{Cm})_{as}$ ) y  $\sim 1567 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ :  $v(\text{C}\beta\text{C}\beta)_{as}$ ) corresponden a GRs oxigenados (ver **Figura 19**). En nuestros espectros, aparece un pico a  $1586 \text{ cm}^{-1}$  pero su intensidad en relación a los picos adyacentes se reduce en los espectros

SERS (ver **Figura 35**). En cambio, el pico a  $1565\text{-}1567\text{ cm}^{-1}$  está presente en los tres espectros con una intensidad relativa similar. El pico de  $1605\text{ cm}^{-1}$  aparece con una intensidad relativa similar al espectro reportado para GRs desoxigenados (Wood y McNaughton, 2002). En el espectro de GR control se distingue con claridad un pico a  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$ :  $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_m)_{as}$ ) característico de células oxigenadas que no aparece en los espectros SERS. En los espectros de GRs en presencia de NPs se observa un hombro a  $1619\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(\text{C}_a=\text{C}_b)$   $\nu(\text{C}=\text{C})$ ) característico del modo de vibración del doble enlace C=C, que puede mostrar la contribución del grupo vinilo adyacente al anillo de porfirina o los doble enlaces entre en el anillo de porfirina (ver **Figura 18**).

En la región de vibraciones de estiramiento del anillo pirrol (II) ( $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ ), detectamos picos a  $1303\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ :  $\delta(\text{C}_m\text{H})$ ) y a  $1394\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{20}$ :  $\nu(1/4\text{ anillo pirrol})$ ) en posiciones más cercanas a las reportadas para desoxi-Hb. El pico de  $1337\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{41}$ :  $\nu(1/2\text{ anillo pirrol})_s$ ) es apenas perceptible en el espectro control y se observa en los espectros de GRs incubados con NPs de plata como un hombro similar al que aparece en el espectro de Wood y McNaughton (2002) pero en la posición  $1337\text{-}1339\text{ cm}^{-1}$ . En experimentos Raman, al emplear el láser  $488\text{ nm}$  en eritrocitos vivos incubados con NPs AgPEG y NPAGs, se observó el mayor incremento de la señal en el pico correspondiente al modo de vibración  $\nu_4$ :  $\nu(1/2\text{ anillo pirrol})_s$ . Este pico es un marcador del estado de oxigenación de la Hb, y aparece a  $1357\text{ cm}^{-1}$  en desoxihemoglobina y a  $1376\text{ cm}^{-1}$  para oxihemoglobina. En los tres espectros se observa un pico intenso a  $1357\text{ cm}^{-1}$  mientras que en el espectro de GR control (sin NPs), aparece además, un hombro en la posición  $1376\text{ cm}^{-1}$ . La baja señal de este pico en el espectro se explica por el efecto promedio, ya que la oxi-Hb está más distante de la membrana o menos representada en el volumen de excitación. Esto explica también la ausencia de este pico en los espectros SERS.



**Figura 35** Espectro Raman Resonante de GR control (rojo) y espectros SERS de GRs incubados con NPs AgPEG (verde) o NPAGs (azul). Los colores delimitan las diferentes regiones del espectro descritas en el capítulo 1 y **Figura 19**.

Estrategias encaminadas a la diferenciación de células oxigenadas y desoxigenadas podrían tomar ventaja del estudio realizado teniendo en cuenta que se precisan modificaciones que favorezcan la penetración de las NPs a la célula. Experimentos de electroporación se han aplicado exitosamente en líneas celulares de carcinomas para asegurar la entrada de NPs a células manteniendo su viabilidad. (Lin *et al.*, 2009)

En la región (III) de deformación del grupo metino C-H ( $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ ), observamos el pico  $1213\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_5 + \nu_{18}$ :  $\delta(\text{C}_m\text{H})$ ) característico de desoxi-Hb en los tres espectros. En cambio, los picos de oxi-Hb a  $1249\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{13}$ :  $\delta(\text{C}_m\text{H})$ ) y  $1228\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{13}$  o  $\nu_{42}$   $\delta(\text{C}_m\text{H})$ ) solo se observaron en el espectro de GR control.

Por último, en la región de bajo número de onda ( $1200-600\text{ cm}^{-1}$ ), no se observan marcadas diferencias entre células oxigenadas y desoxigenadas. En los tres espectros de la **Figura 35** observamos los picos de  $1172\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{30}$ :  $\nu$  (1/2 anillo pirrol)<sub>as</sub>),  $1133\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{22}$ :  $\nu$ (1/2 anillo pirrol)<sub>as</sub>),  $755\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{15}$ :  $\nu$ (respiración de anillo pirrol)) y  $673\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_7$ :  $\delta$ (deformación del anillo pirrol)<sub>s</sub>).

Todo lo anterior indica que el espectro de GR control es el promedio de moléculas de desoxi-Hb y oxi-Hb. La señal predominante de picos corresponde a desoxi-Hb, posiblemente porque el foco se encuentra en la región de la membrana celular de los eritrocitos. En los espectros SERS, desaparece o se reduce la intensidad de picos de oxi-Hb, lo cual puede estar dado por la contribución al espectro de Hb<sub>m</sub> como se mencionó anteriormente.

### **3.3 Conclusiones del capítulo 3**

Las NPs AgPEG y NPAGs amplifican la señal Raman de glóbulos rojos vivos. La amplificación de picos correspondientes a desoxi-Hb sugiere que estas NPs de plata se ubican en la superficie del eritrocito, amplificando la señal de moléculas de Hb<sub>m</sub> unidas a la cara interna de la membrana. Como las moléculas de desoxi-Hb tienen mayor afinidad de unión a membrana es lógico que se incrementen picos de desoxi-Hb. Las condiciones experimentales empleadas podrían enmascarar la magnitud real del efecto amplificador de las NPs de plata por el "efecto promedio".

Los mecanismos que contribuyen al efecto amplificador de la señal Raman de eritrocitos vivos son el empleo de frecuencias resonantes (láser 488 nm), efecto electromagnético por la formación de puntos calientes en las uniones de las NPs y por efecto de la dispersión de Mie que incrementa la intensidad de la dispersión hacia delante (hacia la muestra). Todos estos efectos aumentan la probabilidad de dispersión Raman por moléculas de Hb en los GRs vivos.

Las NPs de plata sintetizadas pueden emplearse en condiciones que favorezcan su agregación en la membrana celular y de esta forma favorecer el estudio de moléculas cercanas a la membrana de diferentes células y los procesos biológicos en los que están implicadas. El estudio de procesos intracelulares requieren de otras NPs o un recubrimiento de estas NPs que impida su agregación, favorezca su entrada a células de mayor tamaño que el eritrocito (>10µm) sin afectar su efecto de amplificación.

## **CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS**

En el establecimiento de las condiciones óptimas para la síntesis de NPs de plata con PEG, se estudió el efecto de la temperatura y la atmósfera de O<sub>2</sub>. Observamos que la actividad reductora del PEG depende de la temperatura y la presencia de O<sub>2</sub> en la reacción. Esto sugiere que la degradación térmica oxidativa del PEG desempeña un papel importante durante la síntesis. En los mecanismos de reducción de iones plata reportados en la literatura para moléculas orgánicas, solo intervienen los grupos terminales de dichas moléculas. Sin contradecir estos mecanismos, aquí proponemos un mecanismo adicional que tiene lugar en condiciones favorables a la degradación térmica oxidativa del PEG. El mecanismo de reducción que proponemos involucra los grupos oxi-etilenos internos del PEG así como los grupos terminales de las moléculas formadas por la degradación del PEG. En este trabajo aportamos evidencia experimental que sustenta este mecanismo, el mismo debe ser comprobado mediante la identificación de las especies químicas presentes en cada condición de síntesis. Sin embargo, en la literatura encontramos evidencias de la degradación del PEG después de la síntesis de NPs de plata con PEG200. El mecanismo propuesto, a diferencia de los anteriores, explica por qué, en las síntesis realizadas con PEG a altas temperaturas y en presencia de O<sub>2</sub>, la actividad de reducción de los iones plata aumenta con un incremento de la temperatura o el uso de un PEG de mayor peso molecular.

En este estudio, empleamos un método verde y reproducible que permitió obtener NPs R1-AgPEG con estabilidad coloidal por al menos dos años. Esto permite la comparación de estudios entre diferentes aplicaciones y laboratorios. Anteriormente se había reportado la utilidad de NPs similares para estudios SERS de moléculas. Aquí demostramos que las NPs AgPEG sintetizadas pueden emplearse en estudios Raman de células vivas sin afectar su viabilidad. Estas NPs son susceptibles a la agregación en medio fisiológico por lo que resulta poco probable su entrada a la célula pero se puede favorecer la formación de agregados en la superficie celular que favorezcan el efecto de amplificación de la señal Raman de moléculas cercanas a la membrana celular. Para la aplicación de estas NPs en estudios de procesos

intracelulares se deben encontrar condiciones que favorezcan la estabilidad de estas NPs en condiciones fisiológicas (como las concentraciones fisiológicas de sales en la sangre) y evaluar en qué medida podría afectarse la amplificación de la señal en ausencia de agregados.

Las proteínas de membrana constituyen marcadores biológicos importantes involucrados en diferentes procesos celulares. Este trabajo evidencia la utilidad de las NPs de plata sintetizadas en la amplificación de la señal Raman de moléculas unidas a la membrana celular. De esta forma, estas NPs se podrían aplicar para estudiar patrones de expresión diferencial de biomoléculas asociadas o que conforman la membrana celular una vez establecidas las diferencias entre los espectros Raman para las distintas condiciones.



## RECOMENDACIONES

Como estrategia para dar continuidad a esta investigación, tenemos las siguientes recomendaciones:

1. Realizar estudios de termogravimetría, resonancia magnética nuclear (RMN): RMN-<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C y cromatografía gaseosa con moléculas PEG de diferente peso molecular y en diferentes concentraciones que favorezcan:
  - a. Identificar la presencia de productos de la DTO-PEG en condiciones similares a las empleadas para la síntesis de NPs AgPEG en los trabajos de Luo, Nam y Fleitas-Salazar (Luo *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2011; Fleitas-Salazar *et al.*, 2017)
  - b. Determinar la relación entre la concentración de PEG y la temperatura en la obtención de productos de la DTO-PEG.
  - c. Determinar la influencia de la concentración del iones Ag<sup>+</sup> en la DTO-PEG, manteniendo constante la concentración de PEG y la temperatura
2. Evaluar el efecto de las NPAg y NPs AgPEG en la amplificación de la señal de moléculas de Hb libres, en agua y en presencia de diferentes concentraciones de sales para evaluar la importancia de la agregación de las partículas en su efecto de amplificación.
3. Obtener NPs de plata anisotrópicas (ejemplo: nanoestrellas, nanovarillas, nanocubos) para la amplificación de la señal Raman de células y moléculas.
4. Estudiar el efecto de las NPs de plata en la señal Raman de otras células como Hela, Huh-7 (hepatoma humano), leucocitos sanos y células cancerígenas.
5. Comparar el efecto de las NPs de plata fuera y dentro de las células en la señal Raman de dichas células.

## REFERENCIAS

- Aroca, R. F., Alvarez-Puebla, R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S. y Garcia-Ramos, J. V. (2005) "Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures", *Adv Colloid Interface Sci*, 116, pp. 45–61. doi: 10.1016/j.cis.2005.04.007.
- Bell, S. E. J. y Sirimuthu, N. M. S. (2006) "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Sub-Micromolar Detection of DNA/RNA Mononucleotides", *J. Am. Chem. Soc.*, 128(49), pp. 15580–15581. doi: 10.1021/ja066263w.
- Boughen, L., Liggat, J. y Ellis, G. (2010) "Thermal degradation of polyethylene glycol 6000 and its effect on the assay of macroprolactin", *Clin Biochem*, 43(9), pp. 750–753. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.02.012.
- Brazhe, N. A., Abdali, S., Brazhe, A. R., Luneva, O. G., Bryzgalova, N. Y., Parshina, E. Y., Sosnovtseva, O. V. y Maksimov, G. V. (2009) "New insight into erythrocyte through in vivo surface-enhanced Raman spectroscopy", *Biophys. J.*, 97(12), pp. 3206–3214. doi: 10.1016/j.bpj.2009.09.029.
- Ciou, S. H., Cao, Y. W., Huang, H. C., Su, D. Y. y Huang, C. L. (2009) "SERS enhancement factors studies of silver nanoprism and spherical nanoparticle colloids in the presence of bromide ions", *J. Phys. Chem. C*, 113(22), pp. 9520–9525. doi: 10.1021/jp809687v.
- Cole, J. T. y Holland, N. B. (2015) "Multifunctional nanoparticles for use in theranostic applications", *Drug Deliv Transl Res*. Springer US, 5(3), pp. 295–309. doi: 10.1007/s13346-015-0218-2.
- Cruje, C. y Chithrani, D. B. (2014) "Polyethylene Glycol Density and Length Affects Nanoparticle Uptake by Cancer Cells", *J Nanomed Res*, 1(1), pp. 1–6. doi: 10.15406/jnmr.2014.01.00006.
- Dayer, M. R., Moosavi-Movahedi, A. A. y Dayer, M. S. (2010) "Band Assignment in Hemoglobin Porphyrin Ring Spectrum: Using Four- Orbital Model of Gouterman", *Protein Pept. Lett.*, 17(4), pp. 473–479.
- Doering, W. E. y Nie, S. (2002) "Single-molecule and single-nanoparticle SERS: Examining the roles of surface active sites and chemical enhancement", *Journal of Physical Chemistry B*, 106(2), pp. 311–317. doi: 10.1021/jp011730b.
- Feng, A. L., You, M. L., Tian, L., Singamaneni, S., Liu, M., Duan, Z., Lu, T. J., Xu, F. y Lin, M. (2015) "Distance-Dependent Plasmon-Enhanced Fluorescence of Upconversion Nanoparticles using Polyelectrolyte Multilayers as Tunable Spacers", *Sci Rep*, 5(1), p. 7779. doi: 10.1038/srep07779.
- Ferrari, M. (2005) "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges", *Nat. Rev. Cancer*, 5(3), pp. 161–171. doi: 10.1038/nrc1566.
- Fievet, F., Lagier, J. P. y Figlarz, M. (1989) "Preparing Monodisperse Metal Powders

in Micrometer and Submicrometer Sizes by the Polyol Process”, *MRS Bull*, 14(12), pp. 29–34. doi: 10.1557/S0883769400060930.

Fleitas-Salazar, N., Silva-Campa, E., Pedroso-Santana, S., Tanori, J., Pedroza-Montero, M. R. y Riera, R. (2017) “Effect of temperature on the synthesis of silver nanoparticles with polyethylene glycol: new insights into the reduction mechanism”, *J. Nanopart. Res. Journal of Nanoparticle Research*, 19, p. 113. doi: 10.1007/s11051-017-3780-3.

García-Solé, J., Bausá, L. E. y Jaque, D. (2005) *An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*. Madrid: John Wiley & Sons Ltd.

Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C. y Mirkin, C. A. (2010) “Gold nanoparticles for biology and medicine”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 49(19), pp. 3280–3294. doi: 10.1002/anie.200904359.

Glastrup, J. (1996) “Degradation of polyethylene glycol. A study of the reaction mechanism in a model molecule: Tetraethylene glycol”, *Polym Degrad Stab*, 52(3), pp. 217–222. doi: 10.1016/0141-3910(95)00225-1.

Gomes, J. F., Garcia, A. C., Ferreira, E. B., Pires, C., Oliveira, V. L., Tremiliosi-Filho, G. y Gasparotto, L. H. S. (2015) “New insights into the formation mechanism of Ag, Au and AgAu nanoparticles in aqueous alkaline media: alkoxides from alcohols, aldehydes and ketones as universal reducing agents”, *Phys Chem Chem Phys*, 17, pp. 21683–21693. doi: 10.1039/c5cp02155c.

De Groot, J. y Hester, R. E. (1987) “Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy of Oxyhemoglobin Adsorbed onto Colloidal Silver”, *J Phys Chem*, 91(7), pp. 1693–1696.

De Groot, J., Hester, R. E., Kaminaka, S. y Kitagawa, T. (1988) “Functional Activity of Hemoglobins Adsorbed on Colloidal Silver: A Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy Study”, *J. Phys. Chem*, 92(7), pp. 2044–2048.

Han, S., Kim, C. y Kwon, D. (1995) “Thermal degradation of poly(ethyleneglycol)”, *Polym Degrad Stab*, 47, pp. 203–208.

Han, S., Kim, C. y Kwon, D. (1997) “Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol”, *Polymer*, 38(2), pp. 317–323. doi: 10.1016/S0032-3861(97)88175-X.

Hanlon, E. B., Manoharan, R., Koo, T.-W., Shafer, K. E., Motz, J. T., Fitzmaurice, M. y Kramer, J. R. (2000) “Prospects for in vivo Raman spectroscopy”, *Phys. Med. Biol*, 45(0), pp. 1–59.

Harada, M. y Katagiri, E. (2010) “Mechanism of silver particle formation during photoreduction using in situ time-resolved saxs analysis”, *Langmuir*, 26(23), pp. 17896–17905. doi: 10.1021/la102705h.

Haynes, C. L. y Van Duyne, R. P. (2001) “Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics”, *Journal of*

- Physical Chemistry B*, 105(24), pp. 5599–5611. doi: 10.1021/jp010657m.
- Haynes, C. L., Haes, A. J., McFarland, A. D., Duyne, R. P. Van y Van Duyne, R. P. (2005) “Nanoparticles with tunable localized surface plasmon resonances”, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, pp. 47–99.
- Henglein, A. y Giersig, M. (1999) “Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate.”, *J Phys Chem B*, 103(44), pp. 9533–9538. doi: 10.1021/jp9925334.
- Horch, M., Hildebrandt, P. y Zebger, I. (2015) “Concepts in bio-molecular spectroscopy: vibrational case studies on metalloenzymes”, *Phys Chem Chem Phys*, 17, pp. 18222–18237. doi: 10.1039/c5cp02447a.
- Hugh D., Y., Roger A., F., Sears, F. W. y Zemansky, M. W. (2009) *Física Universitaria con física moderna*. 12a ed. Pearson.
- Ikeda-Saito, M., Argade, P. V y Rousseau, D. L. (1985) “Resonance Raman evidence of chloride binding to the heme iron in myeloperoxidase”, *FEBS Lett.*, 184(1), pp. 52–55.
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. y El-Sayed, M. A. (2008) “Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine”, *Acc. Chem. Res.*, 41(12), pp. 1578–1586. doi: 10.1021/ar7002804.
- Jeong, L. y Park, W. H. (2014) “Preparation and characterization of gelatin nanofibers containing silver nanoparticles”, *Int J Mol Sci*, 15, pp. 6857–6879. doi: 10.3390/ijms15046857.
- Jin-Quan, W., Liang-Nian, H. y Cheng-Xia, M. (2009) “Polyethylene glycol radical-initiated oxidation of benzylic alcohols in compressed carbon dioxide”, *Green Chem.*, 11(7), pp. 1013–1017. doi: 10.1039/B900128J.
- Jin-Quan, W., Liang-Nian, H., Cheng-Xia, M. y Jian, G. (2009) “The free-radical chemistry of polyethylene glycol: Organic reactions in compressed carbon dioxide”, *ChemSusChem*, 2(8), pp. 755–760. doi: 10.1002/cssc.200900060.
- Jones, E. M., Balakrishnan, G. y Spiro, T. G. (2012) “Heme reactivity is uncoupled from quaternary structure in gel-encapsulated hemoglobin: A resonance Raman spectroscopic study”, *J Am Chem Soc*, 134(7), pp. 3461–3471. doi: 10.1021/ja210126j.
- Karakoti, A. S., Das, S., Thevuthasan, S. y Seal, S. (2011) “PEGylated inorganic nanoparticles”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50, pp. 1980–1994. doi: 10.1002/anie.201002969.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. y Schatz, G. C. (2003) “The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment”, *J Phys Chem B*, 107(3), pp. 668–677. doi: 10.1021/jp026731y.
- Kim, Y., Park, C. B., Chen, P. y Thompson, R. B. (2011) “Origins of the failure of

classical nucleation theory for nanocellular polymer foams”, *Soft Matter*. The Royal Society of Chemistry, 7(16), p. 7351. doi: 10.1039/c1sm05575e.

Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R. y Feld, M. S. (1999) “Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy.”, *Chem. Rev.*, 99(10), pp. 2957–76. doi: 10.1021/cr980133r.

Lane, L. A., Qian, X. y Nie, S. (2015) “SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging”, *Chem. Rev.*, 115(19), pp. 10489–10529. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00265.

Lee, S., Chang, S., Lai, Y., Lin, C. y Tsai, C. (2014) “Effect of Temperature on the Growth of Silver Nanoparticles Using Plasmon-Mediated Method under the Irradiation of Green LEDs”, *Mater.*, 7, pp. 7781–7798. doi: 10.3390/ma7127781.

Lew, V. L., Raftos, J. E., Sorette, M., Bookchin, R. M. y Mohandas, N. (1995) “Generation of Normal Human Red Cell Volume, Hemoglobin Content, and Membrane Area Distributions by “Birth” or Regulation?”, *Blood*, 86(1), pp. 334–341.

Li, W., Guo, Y. y Zhang, P. (2010) “SERS-active silver nanoparticles prepared by a simple and green method”, *J Phys Chem C*, 114, pp. 6413–6417. doi: 10.1021/jp100526v.

Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X. y Low, S. C. (2013) “Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering”, *Nanoscale Res Lett*. Nanoscale Research Letters, 8(1), p. 381. doi: 10.1186/1556-276X-8-381.

Lin, J., Chen, R., Feng, S., Li, Y., Huang, Z., Xie, S., Yu, Y., Cheng, M. y Zeng, H. (2009) “Rapid delivery of silver nanoparticles into living cells by electroporation for surface-enhanced Raman spectroscopy”, *Biosens Bioelectron*, 25, pp. 388–394. doi: 10.1016/j.bios.2009.07.027.

Link, S., Mohamed, M. B. y El-Sayed, M. A. (1999) “Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant”, *J Phys Chem B*, 103(16), pp. 3073–3077. doi: 10.1021/jp990183f.

Liz-Marzan, L. M. y Lado-Tourino, I. (1996) “Reduction and stabilization of silver nanoparticles in ethanol by nonionic surfactants”, *Langmuir*, 12(15), pp. 3585–3589. doi: 10.1021/la951501e.

Luo, C., Zhang, Y., Zeng, X., Zeng, Y. y Wang, Y. (2005) “The role of poly(ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles”, *J Colloid Interface Sci*, 288(2), pp. 444–448. doi: 10.1016/j.jcis.2005.03.005.

Luo, Y., Zhao, R. y Pendry, J. B. (2014) “van der Waals interactions at the nanoscale: the effects of nonlocality.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), pp. 18422–7. doi: 10.1073/pnas.1420551111.

Matteini, P., de Angelis, M., Ulivi, L., Centi, S. y Pini, R. (2015) “Concave gold nanocube assemblies as nanotraps for surface-enhanced Raman scattering-based

detection of proteins”, *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 7(8), pp. 3474–3480. doi: Doi 10.1039/C4nr05704j.

Matthaus, C., Chernenko, T., Newmark, J. A., Warner, C. M. y Diem, M. (2007) “Label-Free Detection of Mitochondrial Distribution in Cells by Nonresonant Raman Microspectroscopy”, *Biophys. J.*, 93, pp. 668–673. doi: 10.1529/biophysj.106.102061.

Merikanto, J., Zapadinsky, E., Lauri, A. y Vehkamäki, H. (2007) “Origin of the Failure of Classical Nucleation Theory: Incorrect Description of the Smallest Clusters”, *Phys Rev Lett*, 91(14), p. 145702. doi: 10.1103/PhysRevLett.98.145702.

Mullin, J. W. (2001) *Crystallization*. Fourth, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Fourth. Editado por Butterworth-Heinemann. London: Butterworth-Heinemann. doi: 10.1002/0471238961.0318251918152119.a01.pub3.

Nam, S., Parikh, D. V., Condon, B. D., Zhao, Q. y Yoshioka-Tarver, M. (2011) “Importance of poly(ethylene glycol) conformation for the synthesis of silver nanoparticles in aqueous solution”, *J Nanopart Res*, 13(9), pp. 3755–3764. doi: 10.1007/s11051-011-0297-z.

Otto, A. (2002) “What is observed in single molecule SERS, and why?”, *J Raman Spectrosc*, 33(8), pp. 593–598. doi: 10.1002/jrs.879.

Polte, J. (2015) “Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective”, *CrystEngComm*, 17, pp. 6809–6830. doi: 10.1039/c5ce01014d.

Polte, J., Herder, M., Eler, R., Rolf, S., Fischer, A., Würth, C., Thünemann, A. F., Kraehnert, R. y Emmerling, F. (2010) “Mechanistic insights into seeded growth processes of gold nanoparticles.”, *Nanoscale*, 2(11), pp. 2463–2469. doi: 10.1039/c0nr00541j.

Polte, J., Tuaeov, X., Wuithschick, M., Fischer, A., Thuenemann, A. F., Rademann, K., Kraehnert, R. y Emmerling, F. (2012) “Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: Analogies and differences to the growth of gold nanoparticles”, *ACS Nano*, 6(7), pp. 5791–5802. doi: 10.1021/nn301724z.

Popa, M., Pradell, T., Crespo, D. y Calderon-Moreno, J. M. (2007) “Stable silver colloidal dispersions using short chain polyethylene glycol”, *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*, 303(3), pp. 184–190. doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.03.050.

Qian, X.-M. y Nie, S. M. (2008) “Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications”, *Chem Soc Rev*, 37, pp. 912–920. doi: 10.1039/b708839f.

Richards, V. N., Rath, N. P. y Buhro, W. E. (2010) “Pathway from a molecular precursor to silver nanoparticles: The prominent role of aggregative growth”, *Chem Mat*, 22(11), pp. 3556–3567. doi: 10.1021/cm100871g.

Robb, D. T. y Privman, V. (2008) “Model of Nanocrystal Formation in Solution by

- Burst Nucleation and Diffusional Growth”, *Langmuir*. American Chemical Society, 24(1), pp. 26–35. doi: 10.1021/LA702097G.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H. y Medintz, I. L. (2013) “Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology”, *Chem. Rev.*, 113(3), pp. 1904–2074. doi: 10.1021/cr300143v.
- Schatz, G. C., Young, M. A. y Van Duyne, R. P. (2006) “Electromagnetic mechanism of SERS”, *Top Appl Phys*, 103, pp. 19–46. doi: 10.1007/11663898\_2.
- Shaklai, N., Yguerabide, J. y Ranney, H. M. (1977) “Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore”, *Biochem.*, 16(25), pp. 5585–5592. doi: 10.1021/bi00644a031.
- Shi, Q., Vitichuli, N., Nowak, J., Noar, J., Caldwell, J. M., Breidt, F., Bourham, M., McCord, M. y Zhang, X. (2011) “One-step synthesis of silver nanoparticle-filled nylon 6 nanofibers and their antibacterial properties”, *J. Mater. Chem.*, 21, p. 10330. doi: 10.1039/c1jm11492a.
- Shkilnyy, A., Souce, M., Dubois, P., Warmont, F., Saboungi, M.-L. y Chourpa, I. (2009) “Poly(ethylene glycol)-stabilized silver nanoparticles for bioanalytical applications of SERS spectroscopy.”, *Analyst*, 134(9), pp. 1868–1872. doi: 10.1039/b905694g.
- Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Ávalos-Borja, M., Castellón-Barraza, F. F. y Posada-Amarillas, A. (2005a) “Assessment of growth of silver nanoparticles synthesized from an ethylene glycol-silver nitrate-polyvinylpyrrolidone solution”, *Physica E*, 25(4), pp. 438–448. doi: 10.1016/j.physe.2004.07.010.
- Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Ávalos-Borja, M., Castellón-Barraza, F. F. y Posada-Amarillas, A. (2005b) “Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol”, *Physica E*, 27(1–2), pp. 104–112. doi: 10.1016/j.physe.2004.10.014.
- Smith, E. y Dent, G. (2005) *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. John Wiley & Sons Ltd.
- Spiro, T. G. y Strekas, T. C. (1974) “Resonance Raman Spectra of Heme Proteins. Effects of Oxidation and Spin State”, *J. Am. Chem. Soc.*, 96(2), pp. 338–345.
- Stevenson, A. P., Blanco Bea, D., Civit, S., Antoranz Contera, S., Iglesias Cerveto, A. y Trigueros, S. (2012) “Three strategies to stabilise nearly monodispersed silver nanoparticles in aqueous solution.”, *Nanoscale Res Lett*. Springer Open Ltd, 7(1), p. 151. doi: 10.1186/1556-276X-7-151.
- Stewart, M. (2008) “Nanostructured Plasmonic Sensors”, *Chemical reviews*, 108(2), pp. 494–521. doi: 10.1021/cr068126n.

- Stiufiuc, R., Iacovita, C., Lucaciu, C. M., Stiufiuc, G., Dutu, A. G., Braescu, C. y Leopold, N. (2013) "SERS-active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol.", *Nanoscale Res Lett.* Nanoscale Research Letters, 8(1), p. 47. doi: 10.1186/1556-276X-8-47.
- Sun, Y. y Xia, Y. (2002) "Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles.", *Science*, 298, pp. 2176–2179. doi: 10.1126/science.1077229.
- Takesue, M., Tomura, T., Yamada, M., Hata, K., Kuwamoto, S. y Yonezawa, T. (2011) "Size of Elementary Clusters and Process Period in Silver.PDF", *J. Am. Chem. Soc.*, 133, pp. 14164–14167.
- Thanh, N. T. K., Maclean, N. y Mahiddine, S. (2014) "Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution", *Chem. Rev.*, 114, pp. 7610–7630. doi: 10.1021/cr400544s.
- Tsuneshige, A., Imai, K. y Tyuma, I. (1987) "The Binding of Hemoglobin to Red Cell Membrane Lowers Its Oxygen Affinity", *J. Biochem.*, 101(3), pp. 695–704.
- Uzunbajakava, N., Lenferink, A., Kraan, Y., Willekens, B., Vrensen, G., Greve, J. y Otto, C. (2003) "Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells", *Biopolymers*, 72(1), pp. 1–9. doi: 10.1002/bip.10246.
- Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B. y Xia, Y. (2005) "Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver", *Chem. Eur. J*, 11, pp. 454–463. doi: 10.1002/chem.200400927.
- Willets, K. A. y Van Duyne, R. P. (2007) "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing", *Annu Rev Phys Chem*, 58(1), pp. 267–297. doi: 10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607.
- Wood, B. R. y McNaughton, D. (2002) "Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo", *J. Raman Spectrosc.*, 33, pp. 517–523. doi: 10.1002/jrs.870.
- Yao, T., Sun, Z., Li, Y., Pan, Z., Wei, H., Xie, Y., Nomura, M., Niwa, Y., Yan, W., Wu, Z., Jiang, Y., Liu, Q. y Wei, S. (2010) "Insights into Initial Kinetic Nucleation of Gold Nanocrystals", *J Am Chem Soc.* American Chemical Society, 132(22), pp. 7696–7701. doi: 10.1021/ja101101d.
- Ye-Wan, M., Zhao-Wang, W., Li-Hua, Z. y Jie, Z. (2010) "Theoretical Studies of Optical Properties of Silver Nanoparticles", *Chin . Phys. Lett.*, 27(2), p. 24207. doi: 10.1088/0256-307X/27/2/024207.
- Yu, M. K., Park, J., Jon, S. y Sangyong, J. (2012) "Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy", *Theranostics*, 2(10). doi: 10.7150/thno.3463.
- Zielinska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M. y Hupka, J. (2009) "Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size", *Procedia Chem*, 1, pp. 1560–1566. doi: 10.1016/j.proche.2009.11.004.



### Anexo 1

Imagen TEM de las NPAs obtenidas empleando  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante.

Se observan NPs esféricas entre 10 y 20 nm. En la esquina inferior derecha se muestra una imagen de alta resolución de una NPAs (HR-TEM) donde se aprecia la estructura cristalina de la NP.

