



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

Universidad de Sonora

División de Ciencias Exáctas y Naturales

Departamento de Física

Síntesis verde de nanopartículas de oro y plata empleando extractos  
de *Vitex mollis*: Efecto sobre células de endotelio vascular humano.

Tesis

Que para obtener el título de  
Maestro en Nanotecnología

PRESENTA

Abraham Ariel Arizmendi Grijalva

Hermosillo, Sonora, México

Julio 2018

# 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

## Agradecimientos:

A CONACYT por el proyecto de Infraestructura INFR-2014-01-225455 que permitió la adquisición del Difractómetro de Rayos X de monocristal Bruker D8 QUEST usado en esta tesis. De igual forma agradecemos al Dr. Rogerio Sotelo (CIAD A.C., Hermosillo) y a la Dra. Yedith Soberanes por el apoyo en la obtención de los difractogramas de este trabajo de tesis.

A los integrantes del laboratorio de Biomateriales por asesorarme en el tema, que fue ajeno a mi conocimiento.

Al Dr. Aarón Alberto Martínez Higuera y al M.C. Juan Manuel Martínez Soto por instruirme en el manejo de células necesario para los ensayos realizados en la presente tesis.

## Índice

Agradecimientos: .....	i
Lista de figuras .....	iv
Lista de tablas.....	vi
Resumen.....	1
Introducción .....	2
Referencias.....	4
Capítulo 1 .....	6
Antecedentes .....	6
1.1 Nanomateriales .....	6
1.2 Ruta de síntesis .....	7
1.3 Métodos con bioreductores.....	10
1.4 Síntesis con extractos de plantas .....	10
1.5 Respuesta antiangiogénica.....	12
1.6 Migración Celular .....	16
Hipótesis.....	16
Objetivo General .....	17
Objetivos específicos.....	17
Referencias.....	18
Capítulo 2 .....	23
Técnicas experimentales.....	23
2.1 Espectroscopia UV-Visible.....	23
2.2 Microscopia electrónica .....	29
2.3 Espectroscopía infrarroja .....	35
2.4 Dispersión Dinámica de Luz.....	37
2.5 Potencial Zeta.....	42
2.6 Microscopía confocal de fluorescencia .....	47
2.7 Difracción de rayos x .....	50
2.8 Absorción atómica.....	53
Referencias.....	54
Capítulo 3 .....	58
Evaluación Celular .....	58
3.1 Determinación de viabilidad con MTT .....	58

3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno .....	59
3.3 Ensayos de migración en ralladura .....	60
Referencias.....	62
Capítulo 4 .....	63
Resultados .....	63
4.1 Espectroscopia Uv-Visible .....	63
4.2 Microscopía Electrónica .....	69
4.3 HRTEM.....	75
4.4 IR.....	77
4.5 DLS.....	80
4.6 Potencial Zeta.....	81
4.7 Difracción de Rayo X.....	82
4.8 Absorción atómica.....	84
4.9 MTT .....	85
4.10 ROS .....	86
4.11 Ralladura .....	90
Discusión .....	93
Referencias.....	94
Capítulo 5 .....	96
Conclusiones y perspectivas.....	96
Apéndices .....	98
Apéndice 1: Metodología de obtención de extracto .....	98
Apéndice 2: Preparación de precursores metálicos.....	98
Apéndice 3: síntesis de NPs.....	99
Apéndice 4: Limpieza de NPs. ....	100

## Lista de figuras

Figura 1 Nanoescala y comparación [4].....	6
Figura 2 (A) Fructofuranosa (B) Ácido Fructurónico. [34].....	12
Figura 3 Proceso de angiogénesis [38].....	14
Figura 4 Energías relativas de orbitales enlazantes y antienlazantes en orbital P.....	23
Figura 5 Representación de energía de los orbitales HOMO y LUMO [3].....	24
Figura 6 Ilustración esquemática del LSPR [5].....	25
Figura 7 asdasdasd [5]. .....	26
Figura 8 Esquema del sistema físico .....	27
Figura 9 Esquema de espectrómetro Uv-Visible de doble haz [6].....	29
Figura 10 Diagrama de un A) SEM B) TEM construida de dos [7, 8].....	30
Figura 11 HRTEM de una NP de estaño [10].....	33
Figura 12 Interferencia constructiva en sistema cristalino [12].....	34
Figura 13 Esquema de un equipo de DLS [14].....	38
Figura 14 Intensidad de luz tomadad por detector y funcion de correlacion [15]. .....	39
Figura 15 Entre mayor sea el potencial de repulsión mayor será la estabilidad [17].....	44
Figura 16 Esquema de estabilidad estérica y por cargas [18].....	45
Figura 17 Esquema de la capa de Stern y el potencial zeta [19].....	46
Figura 18 Arreglo experimental de microscopio confocal [24].....	47
Figura 19 Diagrama de Jablonski para fluorescencia y fosforescencia [24]. .....	49
Figura 20 Esquema estructural de un difractor de monocristal [28]. .....	52
Figura 21 Reducción de MTT a sales de Formazan [1].....	58
Figura 22 Formación de cristales de formazan. ....	59
Figura 23 Producción de ROS debido a NPs [4]. ....	60
Figura 24 Espectro Uv-Visible del extracto del fruto de Vitex mollis.....	63
Figura 25 Dependencia de concentración del extracto en espectro Uv-Visible .....	64
Figura 26 Construcción de curva de calibración de concentración de extracto. ....	65
Figura 27 Absorbancia de AuNPs y AgNPs en función del tiempo. ....	66
Figura 28 Cinética de AuNPs Y AgNPs Normalizadas. ....	67
Figura 29 AgNPs y AuNPs respectivamente. ....	68
Figura 30 Síntesis inicial de NPs y tras limpieza.....	68
Figura 31 Espectros de absorción para AuNPs y AgNPs.....	69
Figura 32 a)-d)Micrografías de TEM de AgNPs en y e) la correspondiente distribución de tamaños. ....	70
Figura 33 Micrografías de TEM de AuNPs en a)-d) y e) la correspondiente distribución de tamaños. ....	72
Figura 34 Modo SEM y STEM respectivamente para a),b) AuNPs y c),d) AgNPs.....	73
Figura 35 EDS en AgNPs. ....	74
Figura 36 EDS en AuNPs .....	75
Figura 37 HRTEM para AuNPs.....	76
Figura 38 HRTEM para AgNPs.....	76
Figura 39 Comparación de espectro IR del ácido fítico y el extracto.....	78
Figura 40 Comparación de espectro IR del extracto y fructosa.....	78
Figura 41 Espectro IR del extracto de Vitex mollis, Acido Fítico (IP6) y Fructos0061 .....	79

Figura 42 Comparación entre nanopartículas y extracto. ....	80
Figura 43 Distribución de tamaños pesados por número para AuNPs y AgNPs respectivamente. ....	81
Figura 44 Gráfica de Potencial Zeta para AuNPs y AgNPs respectivamente. ....	82
Figura 45 Patrón de difracción de Rayos X para AuNPs y AgNPs respectivamente. ....	83
Figura 46 Ajuste de Gaussiana en pico principal de difracción para AuNPs y AgNPs respectivamente. ....	84
Figura 47 Controles de ensayos de viabilidad. ....	85
Figura 48 Ensayos de viabilidad para AuNPs y AgNPs .....	85
Figura 49 Especies reactivas de oxígeno a 24 horas a) y b) Control de células; c) y d) Células en presencia de AuNPs a 200 µg/ml; e) y f) Células en presencia de AgNPs a 12.5 µg/ml. ....	87
Figura 50 Bubbling en apoptosis.....	88
Figura 51 Célula HUVEC en presencia de AuNPs a 200 µg/ml con producción de ROS ..	89
Figura 52 Ensayos de ralladura en células HUVEC .....	91
Figura 53 Conteo de células en ensayo de ralladura .....	92

## Lista de tablas

Tabla 1 Grados de libertad para moléculas poliatómicas <b>[13]</b> .....	36
Tabla 2 Distancias interplanares.....	77
Tabla 3 Ajustes de Gaussiana en pico principal de difracción de rayos X y tamaño de cristalita.....	83
Tabla 4 Porcentaje de material metálico en AuNPs y AgNPs.....	84

## Resumen

La síntesis de nanopartículas (NPs) metálicas empleando extractos de plantas ha cobrado relevancia entre las propuestas de la química sustentable. Los compuestos bioactivos de los extractos actúan como agentes reductores en la reacción de síntesis y como estabilizantes al adsorberse sobre la superficie de los nanomateriales formando un composito con interesantes propiedades terapéuticas. En la presente tesis se describe el proceso para la síntesis de NPs monometálicas de oro y plata con extracto hidroetanólico del fruto de *Vitex mollis* como bioreductor. Las partículas se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis e IR y por microscopía electrónica. El plasmón de resonancia de los nanomateriales sintetizados se ubica en 429 nm para AgNps y 540 nm para AuNps. Los espectros IR de las NPs indican que moléculas provenientes del extracto están presentes en los materiales aún después del proceso de limpieza por lo que estos compuestos participan en la estabilización de las nanopartículas. Se determinó la distribución de tamaños de las NPs mediante microscopía electrónica (TEM y SEM) obteniéndose tamaños promedios de 23.2 nm para AuNps y 18 nm para AgNps. Adicionalmente se hace un estudio citotóxico de estas sobre la línea celular HUVECs (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) así como pruebas de migración celular que permitan establecer el potencial uso de estos materiales como agentes antiangiogénicos en tratamientos contra tumores cancerígenos.

## Introducción

En el contexto de la síntesis de nanomateriales, el uso de extractos provenientes de plantas se enmarca en los preceptos de la química sustentable donde se plantea el uso de reactivos biocompatibles que aminoren el impacto ecológico que puedan generar los reactantes. Esta vertiente presenta la ventaja de ser un método amigable al medio ambiente pues generalmente la reacción de síntesis de las NPs se efectúa a temperatura ambiente sin requerir de un aporte energético en el proceso y se lleva a cabo en un solo paso pues no requiere de moléculas estabilizantes adicionales a las presentes en el extracto dado que las mismas moléculas reductoras del extracto actúan como estabilizantes de las NPs formadas [1]. En el presente trabajo de tesis se plantea la síntesis de NPs monometálicas de oro y plata con un extracto del fruto de *Vitex mollis* y la evaluación de la citotoxicidad y efectos en migración celular sobre un modelo *in vitro* de cultivo de células HUVECs. La síntesis de las NPs se efectuó a partir de un extracto etanólico del fruto de *Vitex mollis* cuyo contenido reportado de ácido fítico o inositol hexafosfato (IP6) es cercano al 10% en peso [2]. La estructura de la molécula IP6 favorece el papel de agente bioreductor en la reacción oxido-reducción que da lugar a la formación de las NPs, además existen reportes de actividad anti-angiogénica de dicha molécula por lo que el complejo NP-IP6 puede trabajar sinérgicamente en la respuesta anti-angiogénica [3].

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y es conocida como una de las marcas distintivas asociadas a los procesos cancerosos [4]. Cabe señalar que la inducción de neovascularización no está asociada exclusivamente a los procesos de tumoración pues aparece en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos como los procesos de cicatrización, la maduración del cuerpo lúteo, la inflamación crónica y la hipersensibilidad retardada [5]. En 1971, Folkman propuso que el crecimiento de un tumor es dependiente en la angiogénesis pues es esencial para proveer los nutrientes y oxígeno al tumor, remover los desechos celulares y brinda la capacidad a los tumores de generar metástasis [6]. Sin angiogénesis las células cancerosas son incapaces de formar tumores mayores a 2 mm y mueren debido a la hipoxia, de tal

forma que bloquear la formación de nuevos vasos ha despertado el interés como una nueva estrategia en la terapia de cáncer. En este contexto recientemente se han reportado que NPs de metales nobles presentan efectos antiangiogénicos en estudios *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, Arvizu y colaboradores reportaron que NPs de oro internalizadas alteran procesos intracelulares bloqueando la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) lo cual inhibe metástasis vía interferencia con la transición epitelial-mesenquimal (EMT), el cual es un proceso celular caracterizado por la pérdida de adhesión celular y el aumento de la movilidad celular que confiere potencial metastásico a las células tumorales [7]. Balakrishnan y colaboradores usaron NPs de oro como vehículo liberador de Quercetina (un compuesto antioxidante presente en plantas y que actúa como agente anti-EMT) en un estudio de invasión celular de células metastásica de cáncer de mama (MDA-MB-231). Los resultados obtenidos señalan que el complejo AuNps-Quercetina es más efectivo que la Quercetina libre en la supresión de la migración e invasión de las células MDA-MB. Los autores propusieron que el complejo AuNps-Quercetina pueden inhibir la angiogénesis por la vía de la desregulación de la expresión del Receptor-2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFR-2) [8].

Así mismo, se ha reportado que las NPs de plata (AgNPs) presentan efectos antiangiogénicos en modelos *in vivo*. Gurunathan y colaboradores demostraron que AgNPs de 50 nm inhiben la formación de vasos sanguíneos en un modelo de implante de matrigel en ratones tratados con estreptozotocina e incluso, existen reportes de que AgNPs sintetizadas con extractos de la planta *Salvia officinalis* poseen actividad antiangiogénica en un modelo de embrión de pollo en forma dosis-dependiente [9].

## Referencias

- [1] Duan, H., Wang, D., & Li, Y. (2015). Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5778-5792.
- [2] Montiel-Herrera, M., Camacho-Hernández, I. L., Ríos-Morgan, A., & Delgado-Vargas, F. (2004). Partial physicochemical and nutritional characterization of the fruit of *Vitex mollis* (Verbenaceae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(2), 205-215.
- [3] Vucenik, I., Passaniti, A., Eggleton, P., & Shamsuddin, A. K. M. (2004). Antiangiogenic Activity of Inositol Hexaphosphate. *The Journal of Nutrition*, 134(12S), 3541S.
- [4] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- [5] Folkman J. (1984) Angiogenesis. In: Jaffe E.A. (eds) *Biology of Endothelial Cells. Developments in Cardiovascular Medicine*, vol 27. Springer, Boston, MA.
- [6] Hashemi Goradel, N., Ghiyami-Hour, F., Jahangiri, S., Negahdari, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., & Mirzaei, H. (2018). Nanoparticles as new tools for inhibition of cancer angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233(4), 2902-2910.
- [7] Arvizo, R. R., Saha, S., Wang, E., Robertson, J. D., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2013). Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6700-6705.
- [8] Balakrishnan, S., Bhat, F. A., Raja Singh, P., Mukherjee, S., Elumalai, P., Das, S., ... & Arunakaran, J. (2016). Gold nanoparticle–conjugated quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell proliferation*, 49(6), 678-697.
- [9] Bharara, M., Boulger, E., Grewal, G. S., Schoess, J. N., & Armstrong, D. G. (2014, July). Applications of angiosome classification model for monitoring disease

progression in the diabetic feet. In *Proceedings of the 2014 Summer Simulation Multiconference* (p. 34). Society for Computer Simulation International.

# Capítulo 1

## Antecedentes

### 1.1 Nanomateriales

En 1959 Richard Feynman propuso la posibilidad de construir objetos manipulando su fabricación átomo por átomo. Posteriormente el concepto formal de nanotecnología fue introducido por el investigador Norio Taniguchi en 1974 [1]. Actualmente, de acuerdo a la definición adoptada en el 2011 por la comisión de medio ambiente europea, se define como nanomaterial a “un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que, el 50 % o más de las partículas en la distribución de tamaños numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm (donde 1 nm equivale  $1 \times 10^{-9} m$  como se ilustra en la **Figura 1**)” [2]. Por su parte, la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI, por sus siglas en inglés), define a la nanotecnología como “el conocimiento y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm), donde los fenómenos únicos permiten novedosas aplicaciones” [3].

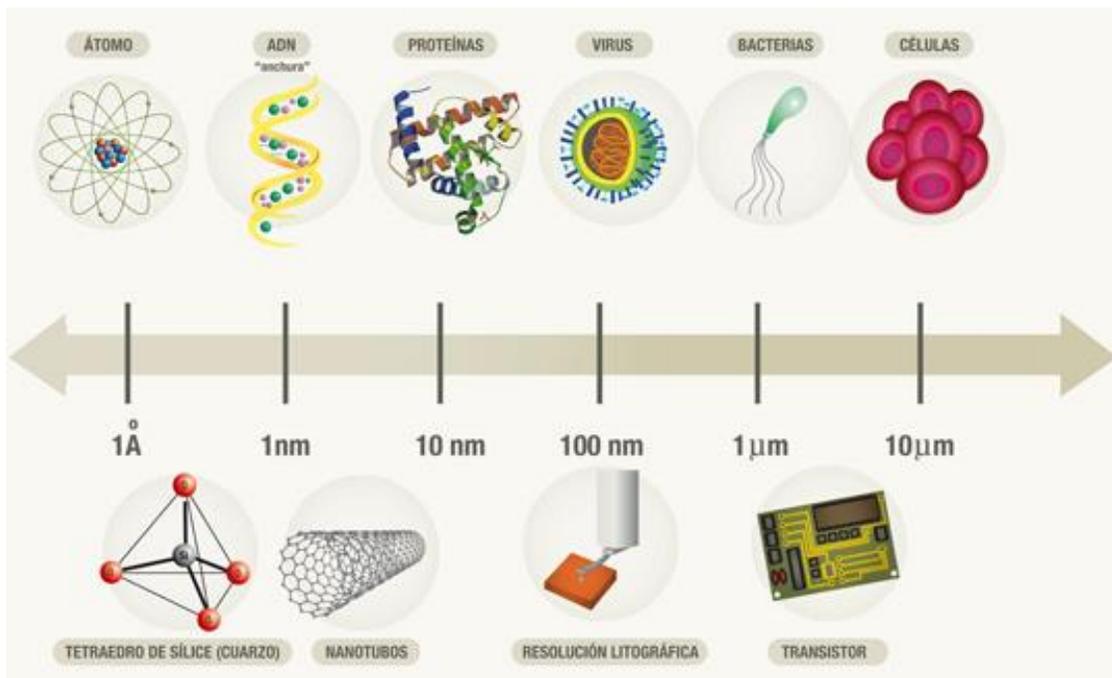


Figura 1 Nanoescala y comparación [4]

Existen varios tipos de materiales nanométricos, sin embargo, dado el enfoque del trabajo es importante enfatizar sobre las NPs metálicas. Este tipo de materiales es altamente recurrido debido a sus diversas características que dependen directamente de la ruta de síntesis, así como del material mismo. Por ejemplo, las NPs de plata (AgNPs) son ampliamente utilizadas debido a que presentan una gran respuesta microbicida, tanto en bacterias como hongos [4]. Por otra parte, se tiene el uso de AgNPs en células cancerosas, obteniendo un efecto toxico en estas [5].

Gracias al tamaño nanométrico, las partículas son capaces de viajar a través de los vasos sanguíneos por lo que se ha buscado la funcionalización de estos materiales, como las AuNPs funcionalizadas con gadolinio, para la detección de tumores por resonancia magnética [6], o bien llevar a cabo una terapia de hipertermia para la destrucción selectiva del tejido [7]. A la ventaja que tienen ciertas NPs de fungir tanto la función de diagnóstico como de terapia, se conoce como teragnosis [8].

## 1.2 Ruta de síntesis

Existen dos grandes rutas en la síntesis de NPs metálicas. La primera de ellas se lleva a cabo mediante la devastación química o física de un material de tamaño macrométrico hasta llevarlo a escala nanométrica, a este método se le conoce como *top-down* (en español arriba-abajo) lo que sugiere llevar de algo grande a algo pequeño [9]; el principal problema con esta ruta es que se presentan una gran cantidad de imperfecciones en la superficie de los productos, lo cual llega a repercutir directamente en las propiedades físicas así como en la respuesta catalítica del material. Según sea la vía por la que se lleve a cabo la síntesis en *top-down* existe una gran demanda energética ya que implican procesos prolongados de molienda, altas temperaturas, láseres de alta potencia, o bien, si se utiliza el método químico los ácidos presentan un riesgo tanto para el usuario como para el medio ambiente.

Por otro lado, tenemos lo que se conoce como *bottom-up* (en español abajo-arriba) que consiste básicamente en un método inverso al anterior, en el que se hace una construcción de una estructura nanométrica a partir de un autoensamblamiento de átomos, lo cual da lugar a la nanopartícula con menor cantidad de imperfecciones,

así como homogeneidad en tamaños **[10]**. El principal problema dentro de esta ruta es el uso de reactivos contaminantes al medio ambiente.

Si bien podemos dividir en dos grandes ramas la ruta de síntesis de NPs, estas de igual manera se subdividen en métodos físico y químicos. A continuación, se presentan ejemplos de los métodos físicos más utilizados.

*Ablación laser*: Este método permite la producción de NPs coloidales en una variedad de solventes. Consiste en aplicar un láser pulsado de alta potencia sobre un material, generalmente un metal puro, de modo que permita la liberación de sus átomos constituyentes dando lugar a la formación de *nanoclusters* y nanoestructuras. El proceso de ablación laser pulsada se efectúa generalmente en cámaras bajo condiciones de vacío o en la presencia de gases inertes y suelen agregarse surfactantes u otras moléculas poliméricas que actúan como estabilizantes, de tal manera que se puede tener un mayor control en el tamaño y la agregación de NPs lo cual está influenciado también por las características de la luz láser (longitud de onda y potencia), la duración del pulso y el tipo de solvente **[11]**.

*Sputtering*: se lleva a cabo una vaporización de átomos de un material sólido mediante el bombardeo de iones altamente energéticos causando el intercambio de momento sobre los iones y el material, de esta manera se puede crear una capa de NPs sobre otro material **[12]**.

*Molienda mecánica*: tal como su nombre lo indica, se trata de un molino que consiste en dos bolas de acero principalmente en ellas existe un gap muy pequeño por el que hace pasar el material macroscópico de modo que son soldadas en frío, aplanadas, fracturadas y re-soldadas en repetidas ocasiones. Este proceso al igual que la ablación por láser, es posible realizarse en seco o en presencia de líquido **[13]**.

A continuación, se presentan ejemplos de métodos químicos en la síntesis de NPs.

*Método de reducción química*: esta técnica contempla la reducción de los iones metálicos provenientes de las sales metálicas solubilizadas en solventes apropiados

y en presencia de algún agente reductor. Entre los compuestos reductores empleados en la síntesis de NPs destacan la hidracina, ácido ascórbico, borohidruro de sodio y los polioles que poseen grupos hidroxilos propensos a la desprotonación y posterior transferencia de carga a los iones metálicos para así formar las NPs metálicas. Este método permite controlar las características de las NPs sintetizadas como las formas, tamaños y dispersión de tamaños. Controlando las variables que regulan la síntesis como la razón molar del agente estabilizador respecto a la sal precursora metálica, así como la fracción del agente reductor con la sal precursora y parámetros como la naturaleza del solvente, pH y temperatura de la reacción, es posible obtener NPs con características altamente reproducibles [14].

*Micro-nanoemulsiones:* en el método de síntesis de NPs en micro y nanoemulsiones dos líquidos inmiscibles tales como el sistema agua-aceite forman una dispersión termodinámicamente estable en presencia de un surfactante adicionado para tal propósito. Si el componente minoritario es la fase polar entonces se tiene un sistema micelar inverso (agua en aceite) que funciona como un sistema de confinamiento donde la reacción oxido-reducción entre los precursores metálicos y los agentes reductores, así como la posterior formación de las NPs, se llevan a cabo en las micelas invertidas que funcionan como pequeñísimos reactores que acotan el tamaño de las partículas metálicas sintetizadas en su interior. Un ejemplo característico de un reductor polar no acuoso es el etilenglicol ( $C_2H_6O_2$ ) que ha demostrado ser un reductor eficiente en la síntesis de nanopartículas de plata, en el sistema micelar invertido no acuoso de AOT (dioctil sulfosucinato de sodio) – isoctano – etilenglicol [15, 16].

*Sol-Gel:* El método sol-gel proviene de dos palabras sol y gel, donde la primera sirve para describir a una suspensión coloidal de partículas sólidas en líquido. La fase dispersada en el sol es tan pequeña que solo existen entre ellas interacciones del tipo Vander-Waal. En el gel, la concentración de la fase sólida es mayor que el líquido por lo que se tiene una masa semi-rígida en la cual las partículas o iones que quedan después de la evaporación comienzan a formar una red continua, de tal manera que la combinación de estos dos procesos es a lo que se conoce como

método sol-gel. Este método consiste principalmente en dos reacciones principales, hidrólisis y condensación que en general implican procesos simples, económicos y eficaces para producir NPs mono y bimetálicas de buena calidad [17].

### 1.3 Métodos con bioreductores

Aparte de los métodos ya antes mencionados, como una subdivisión de los métodos químicos, se encuentran los que utilizan moléculas orgánicas con capacidad reductora, las cuales son obtenidas de organismos vivos. Entre dichas moléculas bio-reductoras abundantes en plantas podemos encontrar carbohidratos [18], aminoácidos [19] y polifenoles [20] entre otras, las cuales se caracterizan por su bajo impacto al medio ambiente por lo que se dice que esta ruta de síntesis es compatible con los preceptos de la química sustentable, Cabe mencionar que otras propuestas de síntesis aprovechan la propia biomasa de los sistemas biológicos como algas o microorganismos utilizándolos como bio-reactores para efectuar la síntesis de NPs *in situ* y posteriormente recuperar los productos sintetizados intra o extracelularmente. Particularmente se ha extendido el uso de bacterias, hongos y levaduras empleando bio-reactores para escalar la síntesis y producción de NPs y algunos trabajos han reportado que las plantas en contacto con soluciones precursoras metálicas son capaces de sintetizar intracelularmente NPs metálicas [21-24].

Entre las dos alternativas antes mencionadas, existe una mayor ventaja en el uso de extractos de plantas, ya que la utilización de los agentes biológicos como algas o microorganismos implican llevar un cultivo de los agentes lo que puede presentar un problema en cuanto a tiempos y costos de mantenimiento. Por otra parte, los extractos de plantas son fáciles de obtener por métodos que no requieren de inversión energética en el proceso como es la maceración y pueden ser almacenados para cuando sea necesario utilizar.

### 1.4 Síntesis con extractos de plantas

Los extractos de plantas utilizados como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas pueden provenir de distintas partes de la planta como las hojas, corteza, raíz e incluso del fruto de esta. La síntesis es bastante sencilla de llevar a

cabo pues simplemente se debe mezclar el extracto con el precursor metálico de tal modo que se lleve a cabo la reacción de oxidación reducción donde los iones metálicos pasan a un estado de valencia cero por la transferencia de electrones que la molécula reductora de extracto proporciona [25]. Con esto se produce una “semilla”, a este proceso se le conoce como nucleación, la cual da lugar al crecimiento del cristal metálico hasta llegar a un estado de equilibrio [26].

Es importante mencionar que, si bien es sencillo el proceso de síntesis, no es posible tener un control absoluto de la reacción. Sin embargo, es posible tener algún tipo de control, ya que las características de estos materiales como la forma, tamaño, geometría, etc. dependerá directamente de la naturaleza del extracto, la concentración de compuestos reductores en el extracto, el pH de la solución, el tipo de sales metálicas utilizadas y sus concentraciones entre otros parámetros [27].

La eficiencia de la síntesis dependerá principalmente de los grupos funcionales y biomoléculas que contenga el extracto, tales como grupos carbonilos, fenólicos, aminas, amidas, polisacáridos, monosacáridos, alcaloides, terpenoides, entre otros [28-30].

Dado que el presente trabajo trata de síntesis de NPs metálicas a partir de extracto hidroetanólico de una fruta, es de esperar que dentro de los componentes que lo constituyen, además del IP6, exista la presencia de fructosa de manera abundante, entre otros compuestos. Existe evidencia de la síntesis de NPs metálicas de oro y plata empleando monosacáridos tales como la glucosa y la fructosa [31]. Jung y colaboradores evaluaron la síntesis de NPs de oro a partir del precursor  $HAuCl_4$  empleando 8 distintos compuestos glicosídicos y establecieron que el sitio de oxidación en estas moléculas es  $C_1 - OH$ , el cual se oxida a grupos carboxílicos [32]. En este contexto, Castro y colaboradores lograron sintetizar NPs de oro empleando fructosa en su estado de fructofuranosa (**Figura 2 A**) como compuesto reductor y sugieren que la fructosa es oxidada a ácido fructurónico (**Figura 2 B**) en la reacción oxido-reducción con el precursor  $HAuCl_4$  [33], por lo que un mecanismo similar puede presentarse en la síntesis de NPs de Au y Ag donde la fructosa es uno de los compuestos abundantes en el extracto hidroetanólico de *Vitex mollis*.

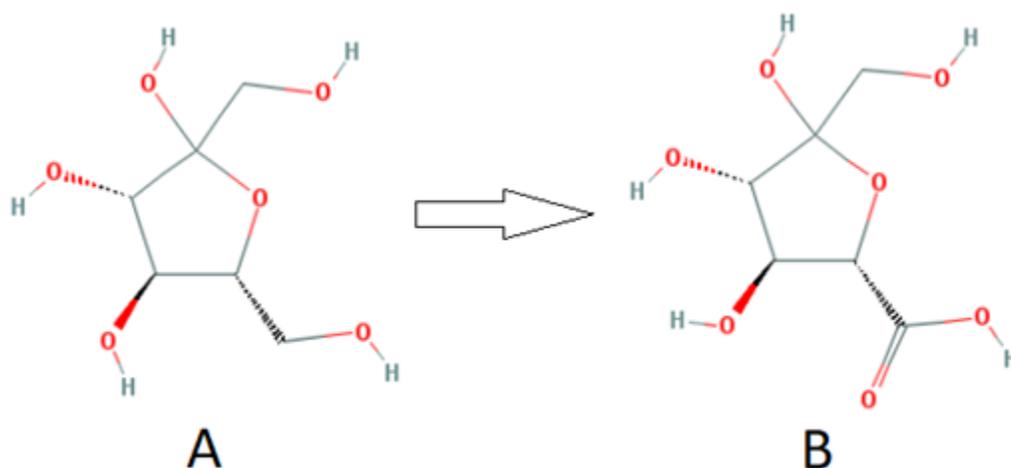


Figura 2 (A) Fructofuranosa (B) Ácido Fructurónico. [34]

Daizy Philip demostró la posibilidad de utilizar como bioreductor miel natural para la síntesis de NPs de oro, realizando un estudio de caracterización de los productos, como el espectro UV-Visible, TEM, difracción de Rayos-X entre otras. La miel está compuesta principalmente por carbohidratos en la forma de monosacáridos como la fructosa y glucosa, y disacáridos como sacarosa y maltosa entre otros, por lo que es interesante ver como utilizando la miel pura, sin necesidad de un proceso de extracción es posible obtener una síntesis de NPs metálicas [35].

Dentro de la fitosíntesis, existen muchas pruebas de síntesis utilizando extractos de todo tipo de plantas, así como frutos. Hay reportes de la síntesis de NPs de plata y oro utilizando extracto del fruto de la *Vitis vinifera* (Uva) [36-37]. Kaushik Roy reportó la síntesis de nanopartículas de plata usando el jugo del fruto de *Vitis vinifera* como agente reductor y encontró que estos nanomateriales presentan una importante respuesta antimicrobiana sobre *E. coli* [37].

### 1.5 Respuesta antiangiogénica

En los organismos adultos, la proliferación de vasos sanguíneos es importante para el crecimiento y funcionamiento de órganos reproductivos femeninos, como los ovarios y endometrio durante el ciclo menstrual, y durante el embarazo en la placenta y glándulas mamarias. Sin embargo, en la mayoría de los tejidos adultos la angiogénesis es altamente restringida, y el proceso de crecimiento capilar ocurre

solamente en procesos de regeneración de heridas y fracturas. En la **Figura 3** se ilustran las distintas etapas de la angiogénesis. Dicho proceso inicia por la producción de óxido nítrico debido a una hipoxia, la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y angiopoyetina-2, estos interactúan con la matriz celular (ECM) incrementando la permeabilidad y capilaridad. La desestabilización permite a la célula endotelial migrar y proliferar para la formación de túbulos, asistido por VEGF, angiopoyetina-2, moléculas de guía, factores de crecimiento, citoquinas y degradación de la ECM. La maduración de los nuevos vasos sanguíneos está acompañado por un incremento en la expresión de factores antiangiogénicos, varios de ellos como resultado de la proteólisis [38]. Nethi y colaboradores reportaron la síntesis de AuNPs utilizando como reductor extracto de hoja de la planta *Hamelia patens*, la cual es utilizada como medicamento en cicatrización de heridas [39]. En dicho trabajo realizaron pruebas de proliferación en células HUVEC, obteniendo como resultado un aumento en el número de células, además, afirman que no se tiene este mismo efecto sobre células cancerígenas. Adicionalmente llevaron a cabo pruebas de ralladura. Dicha prueba consiste en efectuar una ralladura sobre una región de células cultivadas previamente en placa con pozos, empleando una punta de pipeta que remueve todo el material de la región donde se efectúa la prueba para evaluar posteriormente la repoblación celular en la zona de interés. Los autores encontraron en sus ensayos de ralladura que al usar las AuNPs sintetizadas con extracto de *Hamelia patens* existe una mayor repoblación celular en comparación al control. Adicionalmente al ensayo de ralladura Nethi y colaboradores efectuaron un ensayo de angiogénesis en embrión de gallina observando una clara formación acelerada de vasos sanguíneos.

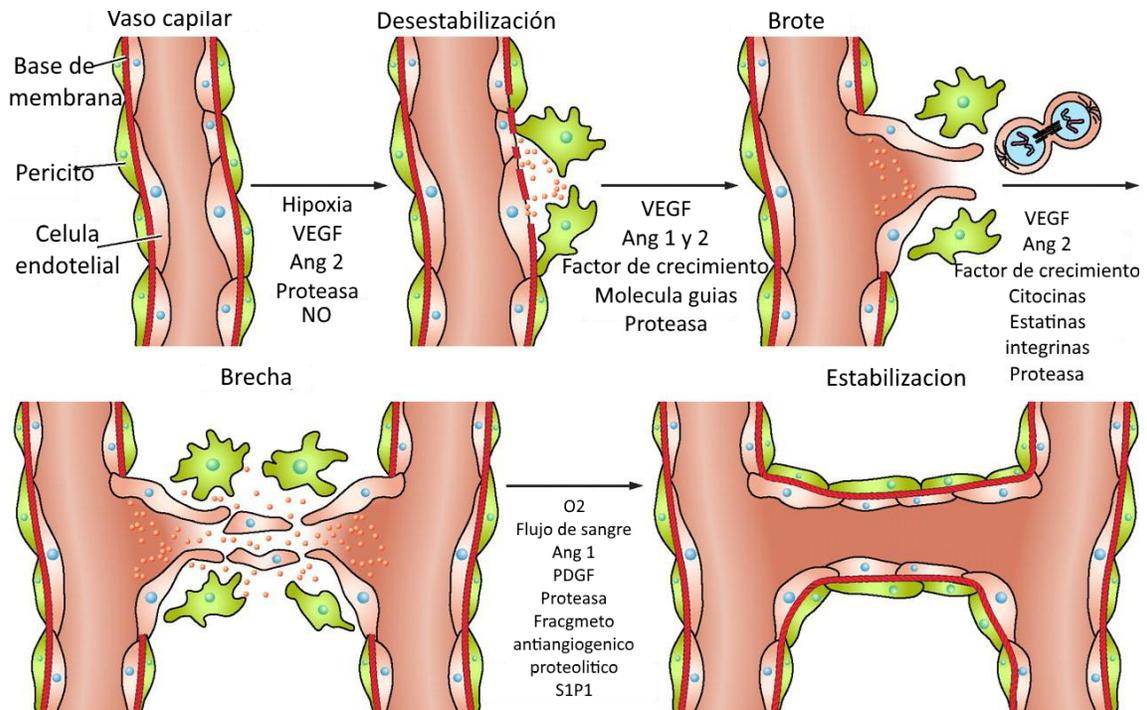


Figura 3 Proceso de angiogénesis [38]

Si bien la angiogénesis es un proceso natural del cuerpo, como en el desarrollo embrionario o cicatrización de heridas, este es fundamental en el desarrollo de los tumores ya que provee de nutrientes al tumor para su crecimiento, por lo que se tiene un interés en inhibir el proceso sin afectar a células sanas. Existen reportes que tanto las NPs de plata y oro como el IP6 tienen propiedades antiangiogénicas.

IP6: Ivana Vucenik y colaboradores mostraron que el inositol hexafosfato tiene un papel importante en la regularización del crecimiento y diferenciación de la célula endotelial vascular [40]. Ellos efectuaron pruebas *in vitro* formando tubos capilares en matrigel con células HUVEC dejando pasar 6 h para la formación rudimentaria de tubos, tras las cuales se sustituyó el medio con medio nuevo en presencia de IP6. Tras 24 h observaron que se ve reducida la cantidad de conexiones entre células al aumentar la concentración del compuesto. De igual manera se realizó estudios *in vivo* en las que se inyectaba al ratón con matrigel y los tratamientos a probar que incluían un factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) para promover el crecimiento de los vasos sanguíneos; tras 7 días se sacrificó la rata

para observar la formación de vasos obteniéndose que el IP6 inhibía la formación de estos.

AuNPs: Priyabrata y colaboradores [41] realizaron ensayos de proliferación en HUVEC utilizando factores de crecimiento (VEGF121 y VEGF165) con y sin AuNPs obteniendo un resultado bastante significativo a la hora de comparar las células con el VEGF165 y las células con AuNPs y VEGF165, habiendo un mayor efecto de inhibición en estas últimas. Por otra parte, en el ensayo de proliferación de HUVEC en presencia de AuNPs y VEGF121 no se observó diferencias en la proliferación respecto al control de células con VEGF121. Además de estas pruebas, los autores realizaron ensayos *in vivo* en los que se inyectaron AuNPs solas, VEGF solo y tanto VEGF como AuNPs en orejas de ratón para evaluar la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sus resultados indican que las AuNPs en presencia del VEGF suprimen la acción de neovascularización del VEGF obteniéndose poca formación de vasos sanguíneos. Por otra parte, Arvizo y colaboradores [42] mostraron una dependencia en la proliferación de las células HUVEC con el tamaño de las AuNPs, probando tamaños de 5, 10 y 20 *nm* obteniendo una mayor inhibición para las partículas de mayor tamaño.

AgNPs: Sangiliyandi y colaboradores [43] mostraron un protocolo de biosíntesis de NPs de plata con la ayuda de *Bacillus licheniformis*. Estas partículas fueron puestas a prueba en ensayos de proliferación, migración y formación de túbulos en células endoteliales de retina bovina (BRECs). Las partículas por si solas mataron aproximadamente la mitad de las células, pese a eso, mata menos que el factor derivado de epitelio pigmentado (PEDF) siendo esta un control de inhibición de proliferación y angiogénico. Por otra parte, las AgNPs en presencia de VEGF mantuvieron la cantidad de células a la par del control. Para la parte de migración se realizó la prueba de ralladura y por ultimo las pruebas en matrigel para la formación de túbulos, en los cuales tanto el PEDF como las AgNPs inhibieron el crecimiento de estas.

## 1.6 Migración Celular

La migración celular es un proceso importante en la angiogénesis ya que la movilidad de las células da paso a la formación de vasos sanguíneos, lo cual es fundamental en el desarrollo embrionario, así como en movilización para la cicatrización de heridas. Existen dos maneras en las que las células se movilizan, ya sea de manera individual o de manera colectiva. Para la primera se da mediante una transición epitelio-mesénquima (EMT) en la que se tiene un cambio de polaridad y adhesión celular; por otra parte, la colectiva no sucede de la misma manera, ya que mantienen características de las células epiteliales [44].

En cualquiera de los dos casos antes mencionados se adquiere una polaridad celular, de tal manera que se observa una asimetría espacial en la célula, dicha polarización se debe a señales externas, como estímulos quimiotácticos entre otros. por los cuales las células determinan la dirección de migración. Dado que se habla de una asimetría en la estructura de la célula, es inevitable no mencionar a la actina, ya que esta es un componente fundamental del citoesqueleto; por lo que es de esperar la señalización provoque el reordenamiento y movimiento de esta [45].

Por otra parte, se encuentra la cadherina, molécula transmembranal calcio dependiente, la cual es responsable de mantener la integridad de los tejidos. La citocina son biomoléculas que regula la comunicación intercelular, funciones tales como proliferación, quimioatracción, entre otras cosas; adicionalmente se tiene a los receptores de la familia de receptores de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) mismo que son parte importante en la señalización de la célula. Todo este conjunto de actores moleculares da lugar a la migración celular, lo que lleva a la pregunta inmediata de como las NPs afectan a alguno o todos estos mecanismos [46].

## Hipótesis

Las partículas monometálicas de oro y plata sintetizadas con el extracto del fruto de *Vitex mollis* presenta baja toxicidad en la línea celular de endotelio vascular, al mismo tiempo que retarda la migración celular.

## Objetivo General

Sintetizar y caracterizar NPs monometálicas de oro y plata sintetizadas con extracto de fruto de *Vitex mollis*, además de evaluar los efectos de las mismas en la viabilidad y migración celular en una línea celular de endotelio vascular (HUVEC).

## Objetivos específicos

1. Caracterización química parcial del extracto de *Vitex mollis* mediante técnicas espectroscópicas de UV-Vis, IR.
2. Estandarizar el método de síntesis de NPs de plata y oro utilizando como agente reductor un extracto del fruto de *Vitex mollis*.
3. Caracterizar los productos de nanomateriales obtenidos haciendo uso de técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR) y de caracterización estructural (SEM, TEM, HRTEM, EDS, XRD).
4. Evaluar el efecto de las NPs de oro y plata sintetizadas con *Vitex mollis* en la viabilidad y migración celular de células de endotelio vascular humano.

## Referencias

- [1] Tolochko, N. (2009). History of nanotechnology. Nanoscience and nanotechnology. Encyclopaedia of life Support Systems (EOLSS), Developed under the auspices of the UNESCO, SEolss Published, oxford, 3-4.
- [2] [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm)
- [3] Vidal Correa, L. E. (2016). Análisis comparativo de la regulación en Nanotecnología en Estados Unidos y la Unión Europea. Boletín mexicano de derecho comparado, 49(147), 277-301.
- [4] Químicas Tháí, Industrial Furniture And More Apply Our Differences <https://quimicasthai.wordpress.com/tag/nanoparticulas/>
- [5] Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... & Kim, Y. K. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- [6] Xu, R., Ma, J., Sun, X., Chen, Z., Jiang, X., Guo, Z., ... & Liu, J. (2009). Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells. *Cell research*, 19(8), 1031.
- [7] Debouttière, P. J., Roux, S., Vocanson, F., Billotey, C., Beuf, O., Favre-Réguillon, A., ... & Tillement, O. (2006). Design of gold nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Advanced Functional Materials*, 16(18), 2330-2339.
- [8] Letfullin, R. R., Joenathan, C., George, T. F., & Zharov, V. P. (2006). Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer.
- [9] Xie, J., Lee, S., & Chen, X. (2010). Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced drug delivery reviews*, 62(11), 1064-1079.
- [10] Mignot, A., Truillet, C., Lux, F., Sancey, L., Louis, C., Denat, F., ... & Antoine, R. (2013). A Top-Down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-Based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chemistry-A European Journal*, 19(19), 6122-6136.

- [11] Magasinski, A., Dixon, P., Hertzberg, B., Kvit, A., Ayala, J., & Yushin, G. (2010). High-performance lithium-ion anodes using a hierarchical bottom-up approach. *Nature materials*, 9(4), 353.
- [12] Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2014). Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31(7), 1105-1109.
- [13] Wender, H., de Oliveira, L. F., Feil, A. F., Lissner, E., Migowski, P., Meneghetti, M. R., ... & Dupont, J. (2010). Synthesis of gold nanoparticles in a biocompatible fluid from sputtering deposition onto castor oil. *Chemical communications*, 46(37), 7019-7021.
- [14] Tesis "Fabricación de nanopartículas de hierro por molienda mecánica con introducción de partículas metálicas", Junyi Gao, Universidad Politécnica de Catalunya.
- [15] Khan, A., Rashid, A., Younas, R., & Chong, R. (2016). A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles. *International Nano Letters*, 6(1), 21-26.
- [16] Ahmad, T., Wani, I. A., Ahmed, J., & Al-Hartomy, O. A. (2014). Effect of gold ion concentration on size and properties of gold nanoparticles in TritonX-100 based inverse microemulsions. *Applied Nanoscience*, 4(4), 491-498.
- [17] Sharma, G., Kumar, A., Sharma, S., Naushad, M., Dwivedi, R. P., ALOthman, Z. A., & Mola, G. T. (2017). Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: a review. *Journal of King Saud University-Science*.
- [18] Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941.
- [19] Selvakannan, P. R., Mandal, S., Phadtare, S., Gole, A., Pasricha, R., Adyanthaya, S. D., & Sastry, M. (2004). Water-dispersible tryptophan-protected gold

nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid. *Journal of colloid and interface science*, 269(1), 97-102.

[20] Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.

[21] Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in colloid and interface science*, 156(1-2), 1-13.

[22] Murugan, K., Benelli, G., Ayyappan, S., Dinesh, D., Panneerselvam, C., Nicoletti, M., ... & Suresh, U. (2015). Toxicity of seaweed-synthesized silver nanoparticles against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* and its impact on predation efficiency of the cyclopoid crustacean *Mesocyclops longisetus*. *Parasitology research*, 114(6), 2243-2253.

[23] Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... & Sastry, M. (2001). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters*, 1(10), 515-519.

[24] Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357-1361.

[25] Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 318.

[26] Song, J. Y., & Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(1), 79.

[27] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.

- [28] Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloevera* plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577-583.
- [29] Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* (англоязычная версия), 6(1 (20)).
- [30] Jung, J., Park, S., Hong, S., Ha, M. W., Park, H. G., Park, Y., ... & Park, Y. (2014). Synthesis of gold nanoparticles with glycosides: Synthetic trends based on the structures of glycones and aglycones. *Carbohydrate research*, 386, 57-61.
- [31] Castro-Guerrero, C. F., Morales-Cepeda, A. B., Hernández-Vega, L. K., & Díaz-Guillén, M. R. (2018). Fructose-mediated gold nanoparticles synthesis. *Cogent Chemistry*, 4(1), 1447262.
- [32] Philip, D. (2009). Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(4), 650-653.
- [33] Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Annadurai, G., & Kannan, C. (2013). Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera* and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 67.
- [34] Castro-Guerrero, C. F., Morales-Cepeda, A. B., Hernández-Vega, L. K., & Díaz-Guillén, M. R. (2018). Fructose-mediated gold nanoparticles synthesis. *Cogent Chemistry*, 4(1), 1447262.
- [35] Roy, K. (2012). 'Green' Synthesis of Silver Nanoparticles by using Grape (*Vitis Vinifera*) Fruit Extract: Characterization of the Particles & Study of Antibacterial Activity (Doctoral dissertation).
- [37] Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martinez De la Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews*, 89(4), 1177-1215.

[36] Nethi, S. K., Mukherjee, S., Veeriah, V., Barui, A. K., Chatterjee, S., & Patra, C. R. (2014). Bioconjugated gold nanoparticles accelerate the growth of new blood vessels through redox signaling. *Chemical Communications*, 50(92), 14367-14370.

[38] Vucenik, I., Passaniti, A., Vitolo, M. I., Tantivejkul, K., Eggleton, P., & Shamsuddin, A. M. (2004). Anti-angiogenic activity of inositol hexaphosphate (IP 6). *Carcinogenesis*, 25(11), 2115-2123.

[39] Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Wang, P., Wang, L., Basu, S., Nagy, J. A., ... & Soker, S. (2005). Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3530-3534.

[40] Arvizo, R. R., Rana, S., Miranda, O. R., Bhattacharya, R., Rotello, V. M., & Mukherjee, P. (2011). Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: role of nanoparticle size and surface charge. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 7(5), 580-587.

[41] Gurunathan, S., Lee, K. J., Kalishwaralal, K., Sheikpranbabu, S., Vaidyanathan, R., & Eom, S. H. (2009). Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 30(31), 6341-6350.

[42] Tesis "Mecanismos moleculares que regulan la migración celular colectiva", Cecilia Huertas Fernández-Espartero, Universidad Pablo de Olavide.

## Capítulo 2

### Técnicas experimentales

En este capítulo se abordarán las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización del sistema de NPs. La descripción se hará tanto del equipo como del principio físico en el que se rige cada una de estas técnicas.

#### 2.1 Espectroscopia UV-Visible

El equipo utilizado tiene un rango de longitudes de onda que abarcan de los 200 *nm* a los 900 *nm*. Mediante la excitación provocada por las longitudes de onda se pueden determinar transiciones electrónicas de un electrón en los orbitales  $\pi$  u orbitales no enlazantes en las moléculas de estudio. Es posible obtener información sobre sistemas de enlaces  $\pi$ , insaturaciones en el sistema (enlaces dobles o triples) así como compuestos aromáticos entre otros [1]. Para NPs se tiene un fenómeno distinto el cual se conoce como plasmón de resonancia de superficie, el cual se describe posteriormente.

##### 2.1.1 Transiciones electrónicas.

La energía total de una molécula está dada por la energía electrónica, rotacional, traslacional y vibracional. La absorción de la onda electromagnética se llevará a cabo solo si esta es suficiente para llevar a cabo la transición de un electrón a un nivel de energía mayor. La energía absorbida provoca un salto de parte de un electrón de un orbital  $\pi$  u orbital no enlazante a un orbital desocupado de mayor energía (de baja densidad electrónica) o también llamados de anti-enlace ( $\pi^*$ ,  $\sigma^*$ ) [1].

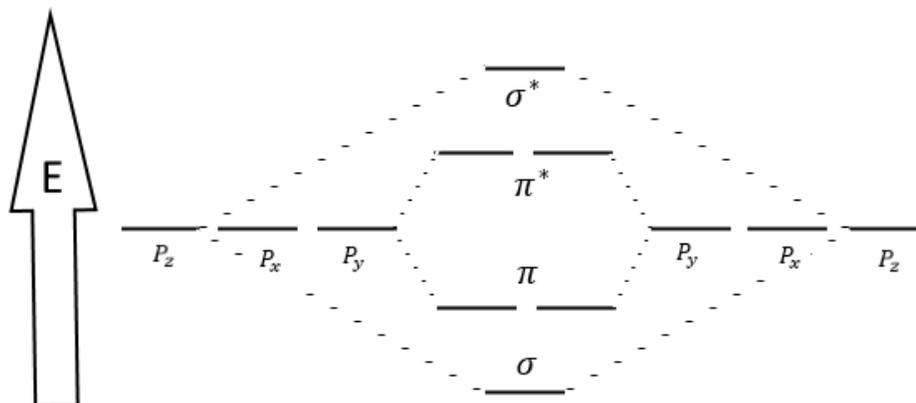


Figura 4 Energías relativas de orbitales enlazantes y antienlazantes en orbital P.

En compuestos orgánicos se pueden tener múltiples transiciones de esta naturaleza, estas tienen valores de energía asociados, debido a que los orbitales moleculares toman estados energéticos discretos, por lo que es posible asociar una transición a partes del compuesto. Haciendo un barrido en la longitud de onda del haz utilizado por el equipo favorece ciertas transiciones electrónicas a longitudes de onda específicas. No es posible observar picos discretos debido a que no se trata de un sistema ideal en el que las transiciones electrónicas son aisladas y ajenas a los átomos circundantes, en cambio, en el sistema existe interacción entre los átomos y moléculas del material lo que lleva a una modificación del gap de energía de las transiciones, lo que lleva a la observación de bandas.

Como se ha mencionado hasta el momento, podemos asumir que cualquier electrón puede llevar a cabo una transición a un estado de mayor energía, pero en la práctica no es así, ya que existen lo que se conoce como reglas de selección [2] que nos cuantifica la probabilidad de que suceda una transición a un estado de mayor energía. Dentro de la teoría de orbitales moleculares se le conoce como HOMO al orbital molecular de mayor energía ocupado (por sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) siendo este el más probable para llevar a cabo una transición al orbital de menor energía desocupado o también llamado LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), tal como se muestra en la **Figura 5**.

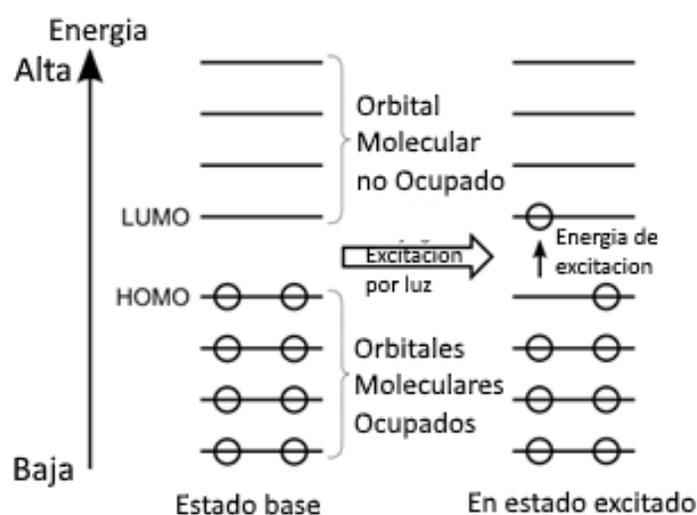


Figura 5 Representación de energía de los orbitales HOMO y LUMO [3]

### 2.1.2 Plasmón de resonancia de superficie localizado

Se conocen como plasmones de resonancia de superficie localizados a las oscilaciones colectivas de electrones de conducción en la superficie de nanopartículas metálicas que son excitados por la radiación electromagnética incidente. Para que este fenómeno ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente ( $a/\lambda < 0.1$ ). El campo eléctrico oscilante de la luz incidente induce un dipolo eléctrico en la partícula desplazando a una parte de los electrones móviles deslocalizados en una dirección lejos del resto de la partícula metálica, generando así una carga neta negativa en un lado de la partícula tal como se ilustra en la **Figura 6**. Como el resto de los núcleos y sus electrones internos no se han desplazado, constituyen una carga opuesta positiva que ejerce una fuerza atractiva sobre la nube electrónica formada por los electrones desplazados por el campo eléctrico lo cual da origen a la formación de dipolos eléctricos para el caso de nanopartículas menores a 30nm [4].

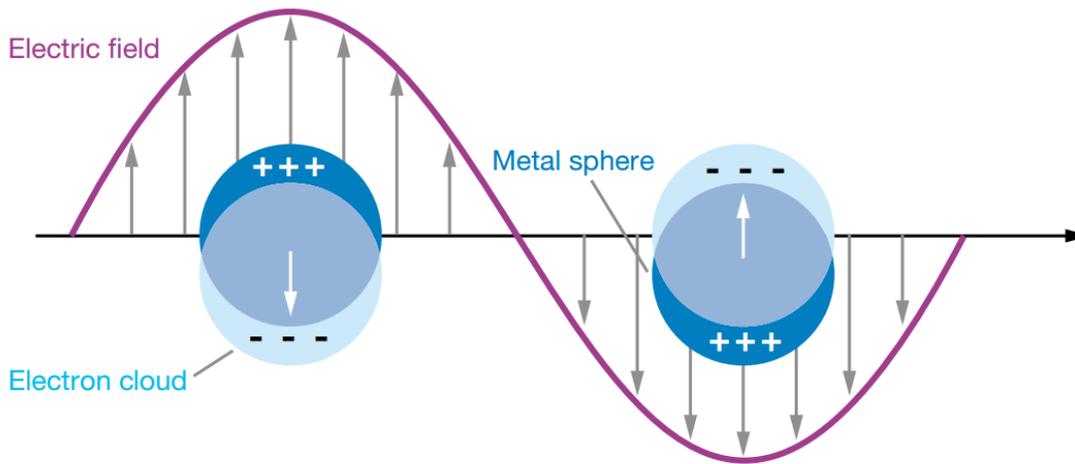


Figura 6 Ilustración esquemática del LSPR [5]

La energía de la luz para producir la banda de plasmón en una nanopartícula metálica depende de diversos factores: naturaleza del metal, tamaño y forma de la partícula y composición del medio circundante de la misma. Para entender la condición de resonancia para las nanopartículas consideremos un modelo donde tenemos una nanopartícula esférica de radio  $a$  que es irradiada por una luz polarizada en  $z$  y con longitud de onda  $\lambda$  donde se cumple la condición  $a/\lambda < 0.1$ .

En este límite la magnitud del campo eléctrico parece estático alrededor de la nanopartícula como se ilustra en la **Figura 7**, lo cual permite resolver las ecuaciones de Maxwell usando una aproximación cuasi estática [5].

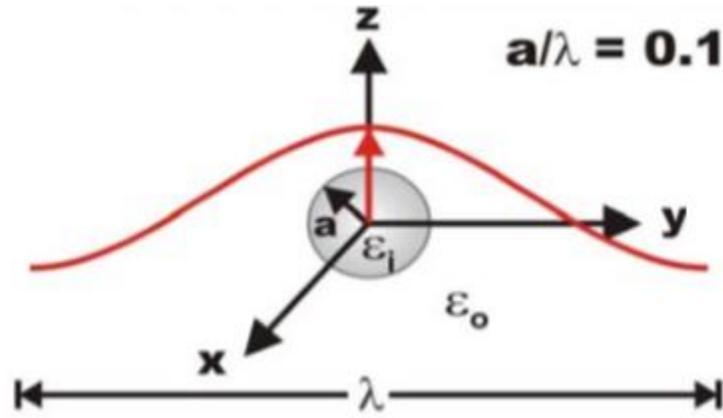


Figura 7 Campo alrededor de una NPs [5].

La solución resultante del campo eléctrico fuera de la partícula está dada por la siguiente ecuación:

$$E_{out}(x, y, z) = E_0 \hat{z} - \left[ \frac{\epsilon_{in} - \epsilon_{out}}{(\epsilon_{in} + 2\epsilon_{out})} \right] a^3 E_0 \left[ \frac{\hat{z}}{r^3} - \frac{3z}{r^5} (x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}) \right]$$

Donde,  $\epsilon_{in}$  es la constante dieléctrica de la nanopartícula metálica y  $\epsilon_{out}$  es la constante eléctrica del ambiente externo o solvente donde está dispersa la nanopartícula. Debido a que  $\epsilon_{in}$  es fuertemente dependiente de la longitud de onda, el denominador del primer término en corchetes es el que determina la condición de resonancia para la partícula. Cuando la constante dieléctrica del metal es muy próxima al valor de  $-2\epsilon_{out}$ , el campo eléctrico fuera de la nanopartícula se amplifica en relación al campo incidente. Si la frecuencia de la radiación a la que se obtiene la condición de resonancia coincide con la región visible del espectro electromagnético entonces la solución coloidal de nanopartículas tendrá algún color, tal como sucede con los colores característico de las soluciones coloidales de AuNps y AgNps.

### 2.1.3 Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer-Lambert relaciona el camino óptico que toma el haz de luz a través de la muestra, la intensidad inicial y final, relacionando la absorción de la luz con las propiedades del material.

Considerando la siguiente imagen (**Figura 8** Esquema del sistema físico) se derivará la ecuación de la ley.

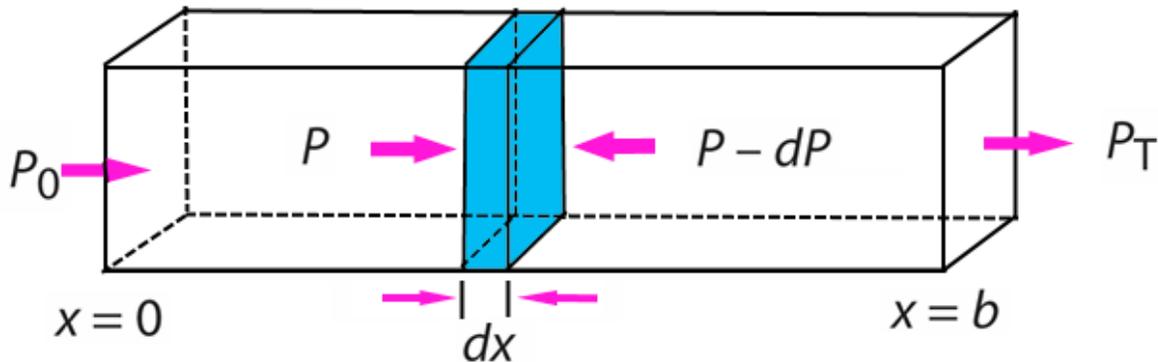


Figura 8 Esquema del sistema físico

De donde:

$P_0$ : Intensidad inicial

$P_T$ : Intensidad final

$dx$ : Diferencial de longitud

$b$ : Longitud de la celda (camino óptico)

De la ley de Beer-Lambert tenemos que el número de especies absorbentes son proporcionales a la concentración de la muestra por el diferencial de longitud.

$$-N \sim cdx$$

Lo que se traduce en intensidades como.

$$-dP = acPdx$$

Donde  $a$  es la constante de absorción del material. Integrando por separación de variable tomando como limite la intensidad inicial y final, así como la longitud de la celda.

$$-\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = ac \int_0^b dx$$

$$-\ln \frac{P}{P_0} = acb$$

Definiendo como transmitancia y absorbancia como.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T$$

Podemos reescribir la ecuación utilizando  $\log_b(y) = \frac{\ln(y)}{\ln(b)}$ , como

$$-2.3025 \log T = acb$$

Reacomodando términos.

$$A = \epsilon bc$$

Esta última es utilizada para conocer la concentración de una sustancia de interés **[1]**.

#### *2.1.4 Esquema de espectrómetro Uv-Visible.*

Se utilizó un espectrómetro que utiliza un doble haz (PerkinElmer UV-VIS Spectrometer Lambda 45), tal como muestra la **Figura 9**. Este equipo presenta la ventaja de que uno de los haces se utiliza solo para el blanco, de modo que, si todas las muestras contienen el mismo solvente, no será necesario cambiar este.

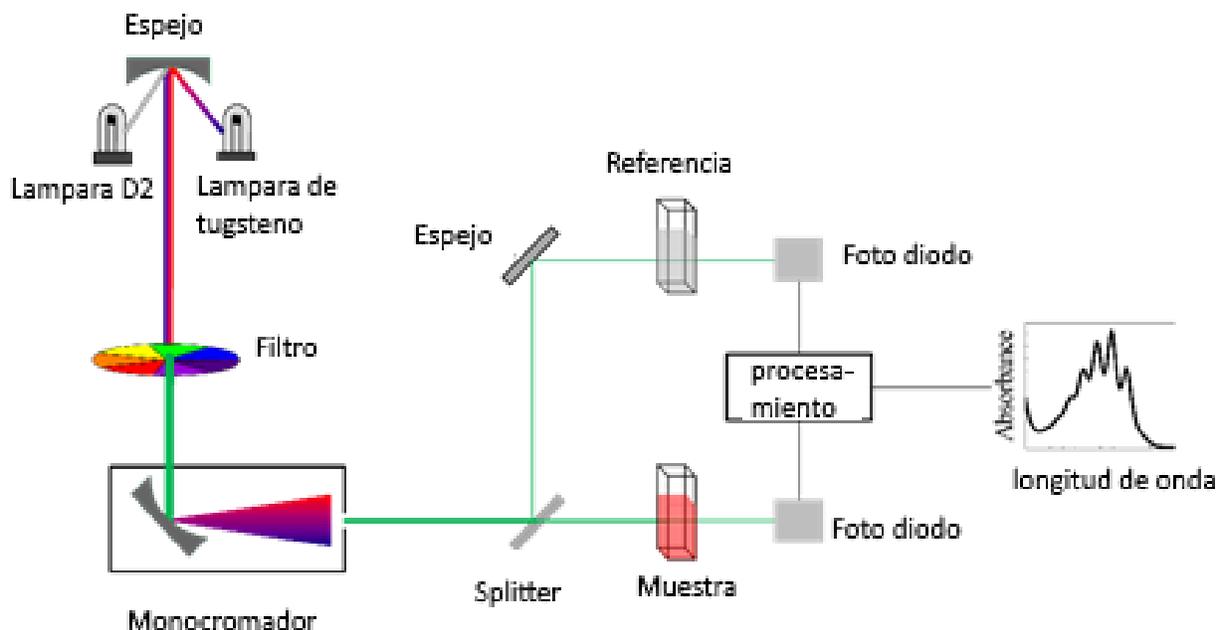


Figura 9 Esquema de espectrómetro Uv-Visible de doble haz [6].

**Fuente de luz:** por lo general se utilizan lámparas de deuterio y halógenas ya que tienen tiempos de vida prolongados, al igual que cubrir el rango de longitud de onda que requiere el equipo (190 – 1100 nm).

**Monocromador:** este componente tiene la tarea de descomponer la luz blanca proveniente de la lámpara, de modo que cada haz de luz resultante tiene diferentes caminos ópticos, logrando así, poder discriminar entre cada una de las longitudes de onda que se requieren y poder hacer un barrido de estas.

**Amplificador:** muchas veces, en los equipos puede perderse la intensidad de la señal, de modo que se utilizan componentes como este para amplificar la señal resultante.

## 2.2 Microscopia electrónica

Se abordarán las técnicas de microscopía electrónica, describiendo generalidades de las técnicas, así como las diferencias entre ellas.

### 2.2.1 Microscopia electrónica de transmisión y barrido

Las técnicas de microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) como sus nombres lo indican, a diferencia de la microscopia óptica convencional, se tratan de técnicas que utilizan electrones para la generación de la imagen. Gracias a esto, es posible obtener mejores resoluciones en la imagen, claro que hay varias implicaciones y limitantes.

Estas técnicas deben mantener un alto vacío, además de un generador de electrones con energías altas, lo cual limita el tipo de muestras que pueden analizarse, entre ellas las muestras biológicas húmedas.

La **Figura 10** muestra los componentes para los microscópicos electrónicos.

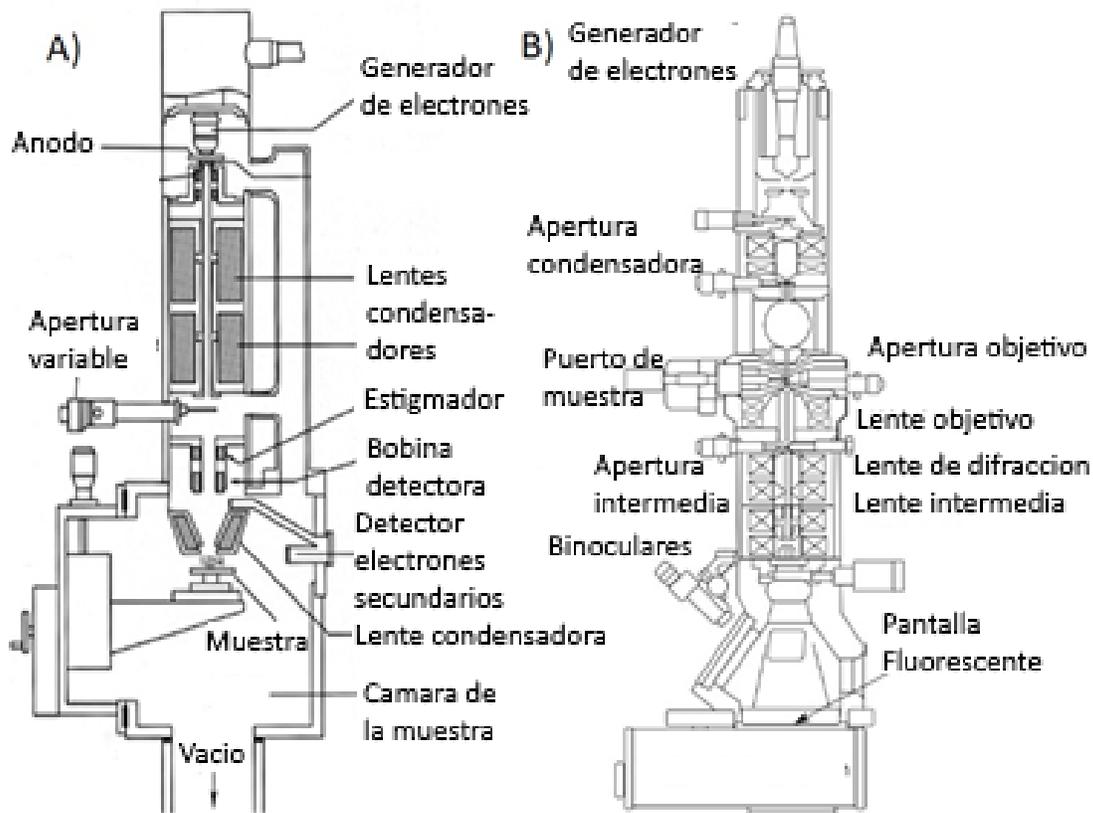


Figura 10 Diagrama de un A) SEM B) TEM construido de dos [7, 8].

Ambos microscopios tienen lentes condensadores que ayudan a dirigir el haz de electrones, para lo cual utilizan campos magnéticos, las cuales son generadas mediante corrientes eléctricas a través de bobinas. La principal diferencia radica en

la posición de la muestra, así como de los detectores. En TEM los electrones son de transmisión, es decir, atraviesan la muestra por lo tanto se coloca el detector debajo de esta. Por otro lado, se tiene el SEM en los cuales los electrones son dispersados por la muestra para lo cual se tiene el detector junto a ella.

Los microscopios electrónicos nos permiten analizar muestras con una mayor resolución, en comparación a un microscopio de luz. De acuerdo con el criterio de Rayleigh la resolución de un microscopio está dada por la siguiente ecuación.

$$\delta = \frac{0.51\lambda}{\mu \text{Sen}(\theta)}$$

Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación utilizada,  $\mu$  es el índice de refracción del medio (aire o el vacío) y  $\theta$  es el semiángulo de apertura numérica de la lente. Podemos tomar el denominador como uno de modo que tendremos que la máxima resolución para un microscopio es aproximadamente la mitad de la longitud de onda utilizada [9].

Para conocer la resolución de un microscopio electrónico es necesario utilizar la ecuación de Louis de Broglie, la cual nos muestra una relación entre el momento de un objeto, en este caso un electrón y la longitud de onda asociada a su movimiento.

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

Donde  $p = mv$  (ignorando efectos relativistas) y además se conoce que la energía cinética está dada por  $E = \frac{1}{2}mv^2$  de modo que podemos reescribir como

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mE}}$$

Sustituyendo los valores de la masa, así como de la constante de Planck en unidades de eV obtenemos la siguiente relación.

$$\lambda = \frac{1.22}{\sqrt{E}}$$

Donde la energía está dada en eV y  $\lambda$  en nm. De esta manera podemos concluir que entre mayor sea la energía de los electrones, mejor será nuestra resolución, pero hay algo que debe tomarse en cuenta, y es que, si bien hay una relación directa de la energía con la resolución, no es el único componente del microscopio que afecta a esta, en este caso, son los lentes electromagnéticos que tienen el trabajo de condensar el haz de electrones. Existen dos tipos de aberraciones que afectan a la calidad y la resolución de la imagen, las aberraciones esféricas y cromáticas.

Para la caracterización por TEM, así como SEM de las NPs dispersas en un solvente se toman con micropipeta 10 $\mu$ L de la dispersión coloidal de NPs y se depositan en una rejilla comercial de cobre de 3mm de diámetro con entramado entre 200-300 mesh. La muestra debe depositarse por el lado de la rejilla recubierta por una película de carbono que funge como soporte. La gota depositada se deja secar sobre la rejilla hasta evaporar el solvente para posteriormente analizar la muestra entre 12-24 h después de ser depositada. Las muestras deben ser lo suficientemente delgada para que pasen los electrones ( $< 100nm$ ). Existen rejillas de distintos metales como oro o níquel para situaciones donde se requiere de la cuantificación del contenido de ciertos elementos en la muestra que puedan coincidir con la rejilla.

### *2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y Análisis químico (EDS).*

La microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) permite obtener información respecto a la cristalinidad de las partículas. HRTEM es capaz de generar imágenes que revelan las distancias interplanares de los cristales como se muestra en la **Figura 11.**

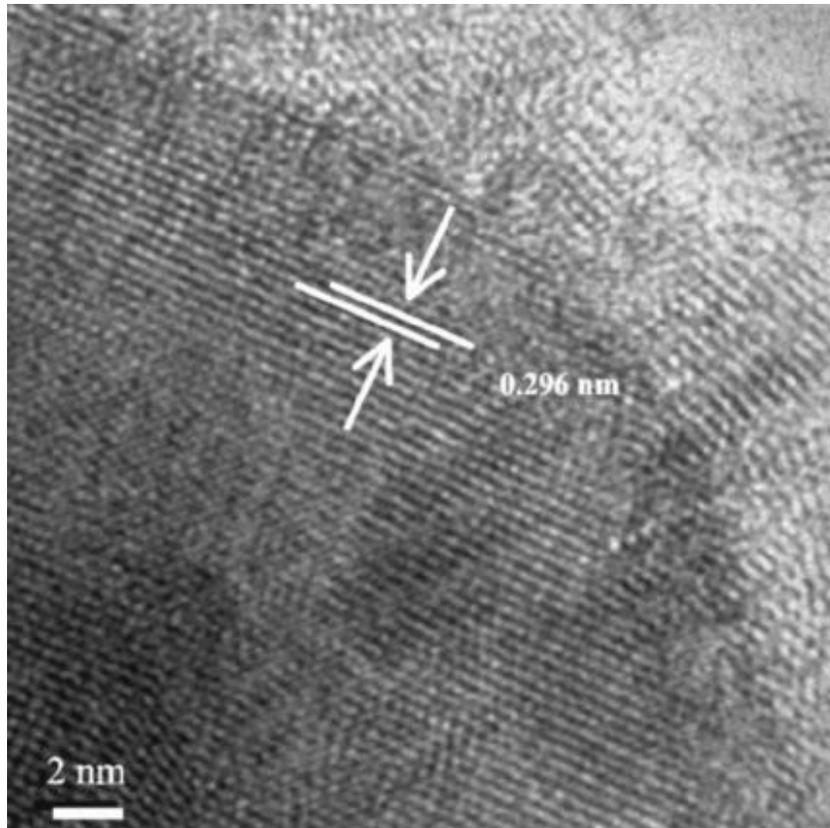


Figura 11 HRTEM de una NP de estaño [10]

La alta resolución solo permite trabajar con una sección reducida de la muestra acotándose a una sola NPs. A cada uno de los planos del cristal se efectúa una transformada de Fourier para reconstruir la imagen de planos cristalinos y obtener las distancias interplanares correspondientes para determinar los índices de Miller.

STEM es una variante de SEM, donde el microscopio se utiliza en modo transmisión. En SEM se cuenta con dos modalidades para observar el campo claro, siendo el modo de electrones secundarios y electrones retrodispersados.

*Electrones secundarios:* los electrones secundarios, con energías menores a 50 keV, provenientes de la muestra se capturan por un colector ubicado a un lado de la muestra y son dirigidos a un tubo centellador y la luz generada se amplifica en un tubo fotomultiplicador para su procesamiento [11].

*Electrones retrodispersados:* estos tienen una trayectoria recta y no son afectados por los campos electrostáticos, por lo que el detector debe estar montado en un

amplio ángulo sólido de recolección. Estos electrones son acelerados a energías mayores de 50 kV [11].

Dada la energía que presentan los electrones retrodispersados, solo se puede observar el material metálico o lo suficientemente denso. Por otro lado, las bajas energías de los electrones secundarios presentan no ser penetrantes, por lo que es posible observar material orgánico. Gracias a estas características es posible observar las topologías de la muestra.

La técnica de EDS en SEM realiza un análisis químico semicuantitativo en la muestra con la ayuda de las energías ionizantes de los electrones. Cada uno de los elementos tiene una estructura atómica única, por lo cual, cada uno de estos tiene emisiones electromagnéticas únicas, lo cual es aprovechado por la técnica de EDS.

### 2.2.3 Ley de Bragg

Un sistema cristalino es aquel que se construye a partir de una unidad básica llamada celda unitaria, la cual se repite indefinidamente. Para simplificar los cálculos se considera una red perfecta, obsérvese la **Figura 12**.

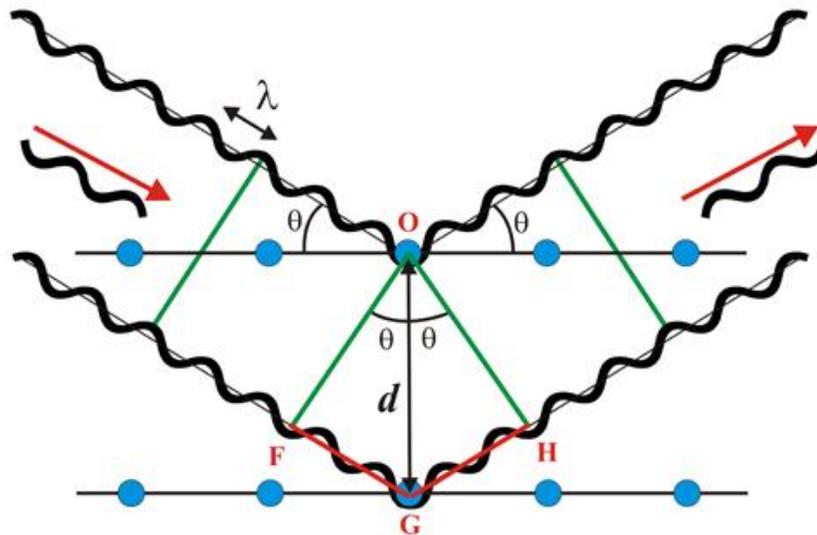


Figura 12 Interferencia constructiva en sistema cristalino [12].

Las ondas observadas son aquellas que interfieren de manera constructiva, lo cual ocurre solo cuando  $OF$  y  $OH$  son un múltiplo entero de la longitud de onda lo que se puede traducir a la siguiente expresión.

$$FG + HG = n\lambda$$

Considerando los triángulos  $OFG$  y  $OHG$  podemos decir que  $FG = HG$  además:

$$FG = d\sin(\theta)$$

Por lo tanto, tendremos:

$$n\lambda = 2d\sin(\theta)$$

Lo cual es conocido como la ley de Bragg. Mediante esta relación es posible determinar las distancias interplanares ubicando los ángulos correspondientes a los picos de difracción obtenidos en el difractograma de rayos x.

### 2.3 Espectroscopía infrarroja

La microscopia IR es recurrida habitualmente al momento de la determinación de grupos funcionales y compuesto. La longitud de onda va de 4000 a 500  $cm^{-1}$ .

Esta técnica se basa en la vibración atómica entre grupos funcionales presentes en una molécula. El espectro de infrarrojo es comúnmente obtenido haciendo pasar dicha radiación a través de la muestra y determinando que fracción fue absorbida y a que energía en particular. La frecuencia asociada a cada uno de los picos de absorción presentes en el espectro corresponde a la frecuencia de vibración de alguna parte de la molécula **[1]**.

Para que haya una absorción en infrarrojo es necesario que la molécula cumpla con la regla de selección la cual nos dice que es necesario la variación del momento dipolar eléctrico **[1]**, de otra manera no se dará el fenómeno de absorción, un ejemplo sencillo y a la vez importante de mencionar es el caso de una molécula diatómica, en el caso de tener núcleos diferentes será activa en infrarrojo ya que su momento dipolar magnético se verá afectado, pero en el caso de tener un molécula diatómica con el mismo núcleo el momento no cambiará, de modo que esta será una molécula no activa en infrarrojo.

Los enlaces en átomos son posible de representar en forma de osciladores armónicos, en este caso es posible hablar sobre modos normales de vibración, el cual es una frecuencia a la cual es posible hacer resonar dicho oscilador, esta frecuencia es característica del sistema lo cual es conveniente en el estudio de la espectroscopia infrarrojo, ya que al hacer resonar alguna molécula en el sistema de interés se tendrá esta como la molécula activa, mientras que las otras estarán inactivas para dicha frecuencia lo que ayuda a discriminar cada uno de los picos de absorción en el espectro.

Ahora bien, es necesario conocer el número de modos vibracionales de una molécula, como bien sabemos, tenemos diferentes grados de libertad ya sean traslacional, rotacional y vibracional. Tal como se mencionó antes, los que juegan un papel importante son los grados de libertad vibracionales.

Todas las moléculas tienen  $3N$  grados de libertad, donde  $N$  son el número de átomos que contiene, los cuales contienen asociados un cierto número a traslacional y rotacional dependiendo de si se trata una molécula línea o no lineal, la **Tabla 1** muestra la diferencias entre una y otra.

*Tabla 1 Grados de libertad para moléculas poliatómicas [13].*

<i>Tipos de grado de libertad</i>	<i>Lineal</i>	<i>No Lineal</i>
<i>Traslacional</i>	3	3
<i>Rotacional</i>	2	3
<i>Vibracional</i>	$3N - 5$	$3N - 6$
<i>Total</i>	$3N$	$3N$

Para conocer el modo normal de vibración de una molécula se utiliza de base la ley de Hooke, donde la rigidez del enlace se relaciona directamente con la constante de Hooke, mientras que para las masas se utiliza el concepto de masa reducida ( $\mu$ ) para facilitar cálculos. En el caso de dos átomos se tiene lo siguiente

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

De la ecuación diferencial de se tiene que

$$\omega^2 = \frac{k}{m}$$

De modo que el periodo está dado por  $\tau = \frac{\omega}{2\pi}$  y el inverso del periodo será la frecuencia ( $\nu$ ). Por lo tanto

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left( \frac{k}{m} \right)^{1/2}$$

A lo que el número de onda será

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \left( \frac{k}{m} \right)^{1/2}$$

Siendo este el modo normal de vibración la cual depende directamente de la masa de los átomos y el enlace de estos, a lo que podemos asumir que solo es posible que la molécula absorba dicha frecuencia en el espectro electromagnético.

Las vibraciones pueden involucrar ya sea estiramientos en los enlaces o modificación en los ángulos de enlace (flexiones). Los estiramientos pueden llegar a ser en fase (simétricos) o desfase (antisimétricos). En cualquier caso, entre mayor sea el cambio en el dipolo eléctrico mayor será la intensidad de la banda de absorción. Las moléculas simétricas tienen menor actividad en el infrarrojo que las asimétricas.

## 2.4 Dispersión Dinámica de Luz

Se abordará sobre lo que es la técnica de dispersión de luz, para ello se describirá el fenómeno de dispersión de luz, así como el montaje e interpretación de datos obtenido por la misma.

### 2.4.1 Montaje experimental

El equipo opera con luz laser, la cual se hace pasar a través de lentes y filtros con el fin de eliminar toda fuente de luz parasita. El haz se hace incidir sobre la muestra, la cual dispersara el haz en todas direcciones y es colectada por un detector a un ángulo  $\theta$  respecto a la incidencia del láser. La **Figura 13** muestra el arreglo esquemático del equipo.

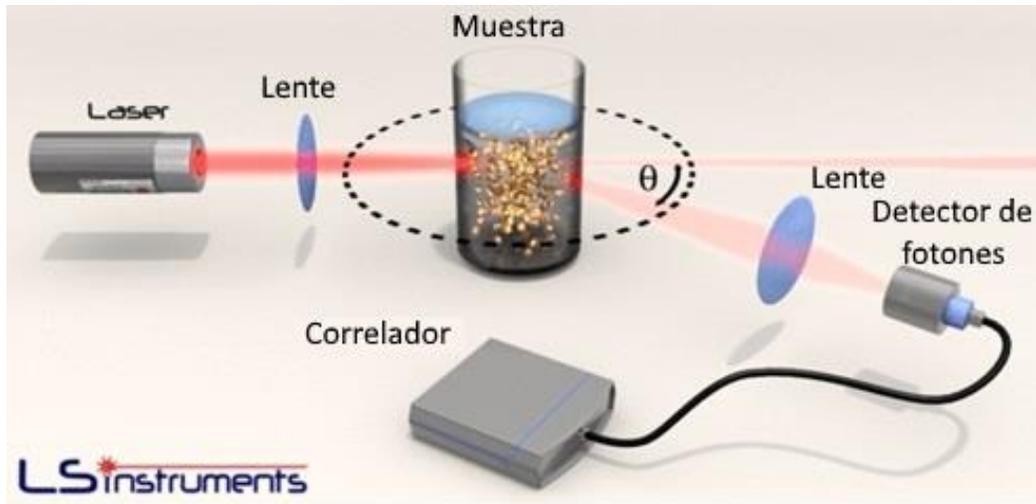


Figura 13 Esquema de un equipo de DLS [14]

#### 2.4.2 Obtención y procesamiento de datos

Al hacer incidir el haz de luz en la muestra, las cargas de eléctricas de las partículas son aceleradas lo que provoca una radiación por parte de estas, esta radiación corresponde a la luz dispersada que será detectada. Las partículas se desplazan por movimiento Browniano dentro del volumen de dispersión por lo que la señal de radiación electromagnética que llega al detector tendrá una dependencia temporal. En dichas fluctuaciones es donde tenemos información dinámica y estructural asociada a la muestra.

En la dispersión dinámica de luz se estudia la autocorrelación de la intensidad de la luz Enel tiempo de medición y a partir de ella se extrae la información correspondiente a los procesos difusivos en el sistema de estudio.

Antes de continuar es importante tomar las siguientes consideraciones lo siguiente.

1. Las NPs tienen un movimiento del tipo browniano, a lo que es posible asignar una densidad de probabilidad de la forma

$$P(r, t|0,0) = (4\pi Dt)^{\frac{3}{2}} \text{Exp}\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right)$$

2. Se toma la consideración de que las NPs utilizadas en el experimento son esféricas con diámetros pequeños, de igual manera se pide que sean monodispersas. Con esto es posible aplicar la relación de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

La función de autocorrelación de la intensidad de luz dispersada ( $g^{(2)}$ ) normalizada para un tiempo de medición  $\tau$  es la siguiente

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Donde  $I$  es la intensidad de la luz dispersada dependiente del tiempo, las cuales son promediadas en el tiempo.

La función de autocorrelación del campo eléctrico dispersado ( $g^{(1)}(\tau)$ ) se escribe como

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t + \tau) \rangle}{\langle E(t)E^*(t) \rangle}$$

Donde  $E$  son los campos eléctricos dispersados y  $\beta$  un factor que depende de la geometría del arreglo experimental.

La función de autocorrelación  $g^{(2)}$  puede expresarse en términos de la función  $g^{(1)}(\tau)$  tal como sigue

$$g^{(2)}(\tau) = 1 - \beta [g^{(1)}(\tau)]^2$$

En la **Figura 14** se observa el comportamiento de la intensidad de luz tomada por el detector y así como la función de correlación de esta.

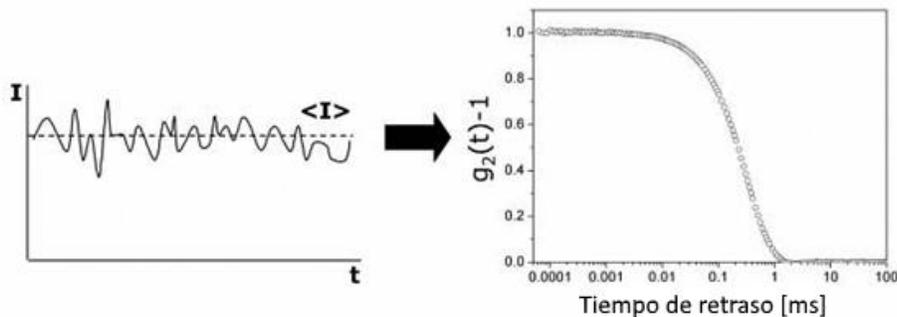


Figura 14 Intensidad de luz tomadad por detector y funcion de correlacion [15].

Para partículas monodispersas en solución la función de correlación es caracterizada por una exponencial negativa

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}[-\Gamma\tau]$$

Con una razón de decaimiento  $\Gamma = Dq^2$  donde  $D$  es el coeficiente de difusión y  $q$  es la magnitud del vector de onda. Como se mencionó antes, es posible utilizar la relación de Stokes-Einstein, despejando para el radio hidrodinámico, tenemos

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

Con  $k_B$  como la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura dada en Kelvins,  $\eta$  el coeficiente de viscosidad dinámica y  $R_h$  el radio hidrodinámico.

En caso de tener una polidispersidad en las partículas se considera que por cada tamaño existe una  $g^{(1)}(\tau)$  con diferentes pesos probabilísticos y tiempos de decaimiento. Con esto dicho se toma la suma de cada una de ellas

$$g^{(1)}(\tau) = \int G(\Gamma)\text{Exp}[-\Gamma\tau]d\Gamma$$

Donde  $G(\Gamma)$  es la función de distribución de tiempos de decaimiento.

Dado que la  $g^{(1)}(\tau)$  es posible de obtener mediante la medición del experimento, lo que resta es conocer la  $G(\Gamma)$ , para lo cual se utilizara el método de cumulantes; primero se reescribe el termino exponencial de la siguiente manera

$$\text{Exp}[-\Gamma\tau] = \text{Exp}[\Gamma_p\tau]\text{Exp}[-(\Gamma - \Gamma_p)\tau]$$

Con  $\Gamma_p = \int \Gamma G(\Gamma)d\Gamma$ . Por lo tanto

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}[\Gamma_p\tau]\int G(\Gamma)\text{Exp}[-(\Gamma - \Gamma_p)\tau]d\Gamma$$

Utilizando la expansión en serie de la función exponencial, se tiene

$$\text{Exp}[-(\Gamma - \Gamma_p)\tau] = \frac{\sum_{n=0}^{\infty} (-1)^n}{n!} (\Gamma - \Gamma_p)^n \tau^n = 1 - (\Gamma - \Gamma_p)\tau + \frac{1}{2}(\Gamma - \Gamma_p)^2 \tau^2 - \dots$$

Por lo que podemos escribir

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}[\Gamma_p \tau] \int G(\Gamma) \left[ 1 - (\Gamma - \Gamma_p) \tau + \frac{1}{2} (\Gamma - \Gamma_p)^2 \tau^2 - \dots \right] d\Gamma$$

Desarrollando

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}[\Gamma_p \tau] \left\{ \int G(\Gamma) d\Gamma - \tau \int G(\Gamma) (\Gamma - \Gamma_p) d\Gamma + \frac{\tau^2}{2} \int G(\Gamma) (\Gamma - \Gamma_p)^2 d\Gamma - \dots \right.$$

Reescribiendo a los momentos centrales de la distribución, como

$$\mu_n = \int G(\Gamma) (\Gamma - \Gamma_p)^n d\Gamma$$

Se obtiene

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}(-\Gamma_p \tau) \left[ 1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \tau^3 + \dots \right]$$

Multiplicando por  $\left(\frac{\Gamma}{\Gamma}\right)^n$  según la potencia del término  $\tau$  en la ecuación

$$g^{(1)}(\tau) = \text{Exp}(-\Gamma_p \tau) \left[ 1 + \frac{\mu_2}{2! \Gamma^2} (\tau \Gamma)^2 - \frac{\mu_3}{3! \Gamma^3} (\tau \Gamma)^3 + \dots \right]$$

De la ecuación anterior si observamos el término cuadrático, veremos que corresponde con la varianza normalizada de  $G(\Gamma)$ , esta es la medida de la desviación estándar de la exponencial simple. Este término se conoce como índice de polidispersidad.

Para hacer el análisis de datos, reescribimos  $g^{(2)}$  como

$$\begin{aligned} \ln(g^{(2)} - 1)^{\frac{1}{2}} &= \frac{1}{2} \ln(\beta [g^{(1)} \tau]^2) = \frac{1}{2} \ln(\beta) + \ln(g^{(1)}(\tau)) \\ &= \frac{1}{2} \ln(\beta) - \Gamma_p \tau + \ln \left[ 1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \tau^3 + \dots \right] \end{aligned}$$

Utilizando la aproximación  $\ln(1+x) \approx x - \frac{x^2}{2} + \frac{x^3}{3} - \dots$  obtenemos

$$\frac{1}{2} \ln(g^{(2)} - 1) = \frac{1}{2} \ln(\beta) - \Gamma_p \tau + \frac{1}{2!} \mu_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \mu_3 \tau^3 + \dots$$

La siguiente ecuación es utilizada por el software.

$$\ln[C(\tau)] = \ln(\beta) - 2\Gamma_p\tau + \mu_2\tau^2 - \frac{1}{3}\mu_3\tau^3 + \frac{1}{12}[\mu_4 - 3\mu_2^2]\tau^4 - \dots$$

Es posible hacer un ajuste de los datos de  $g^{(2)}(\tau) - 1$  (para tamaños monodispersos) con un desarrollo del estilo

$$a - b\tau + c\tau^2 - d\tau^3 + \dots$$

De modo que el ajuste para el coeficiente "b" corresponde a  $\Gamma_p$  utilizando la relación de Stokes-Einstein, resultando

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta\Gamma} q^2$$

Con

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Por lo tanto

$$R_h = \frac{8\pi}{3} \frac{k_b T \eta}{\lambda^2 \Gamma} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

## 2.5 Potencial Zeta

El equipo utilizado (Zetasizer-nano ZS) calcula el potencial zeta determinando la movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) usando la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\epsilon z f(ka)}{3\eta}$$

Donde  $z$  denota el potencial zeta ( $\zeta$ ),  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio,  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $f(ka)$  es la función de Henry. Dos valores son utilizados generalmente como aproximación de  $f(ka)$  siendo 1.5 o 1.0. La determinación electroforética de  $\zeta$  es comúnmente hecha en solventes acuosos y concentración electrolítica moderada [16].

El potencial zeta es una propiedad física que tiene cualquier partícula en suspensión. Esta puede ser utilizada para optimizar la formulación de la suspensión o emulsión ya que este potencial al ser una relación entre un potencial atractivo y uno repulsivo entre las mismas partículas, es posible inferir que tan estables son.

### *2.5.1 Coloides y su estabilidad*

Bajo ciertas condiciones las partículas tienden a adherirse una a otras formando agregados y, por lo tanto, aumentando de tamaño el cual tendera a sedimentar. Los coloides contienen una carga eléctrica, ya sea positiva o negativa, por lo que se espera que si la carga es lo suficientemente elevada no tiendan a formar agregados.

La teoría DVLO explica la tendencia de los coloides a aglomerarse o permanecer separados, propuesta por los científicos Derjaguin, Verwey, Landau y Overbeek, la cual sugiere que la estabilidad de las partículas dependa de un potencial total el cual tiene la siguiente forma

$$V_T = V_R + V_A + V_S$$

Donde  $V_R$  es el potencial de repulsión,  $V_A$  el potencial de atracción y  $V_S$  un potencial debido a la solución el cual en comparación a los dos restantes no tiene mucho peso en la ecuación ya que solo se ven sus efectos cuando se encuentran dos partículas a distancias nanométricas entre ellas, en cambio el potencial de repulsión y atracción tienen efectos a mucho más grandes distancias.

Para el potencial de atracción tenemos

$$V_A = -\frac{A}{12\pi D^2}$$

Donde  $A$  es la constante de Hamaker y  $D$  la separación entre partículas. Por otra parte, para el potencial de repulsión.

$$V_R = 2\pi\epsilon\alpha\xi^2\text{Exp}[-\kappa D]$$

Donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio,  $\xi$  el potencial zeta y  $\kappa$  es una función de la composición iónica. Por lo tanto, un valor elevado de potencial zeta indica

estabilidad en el coloide. En la **Figura 15** muestra la competencia entre ambos potenciales.

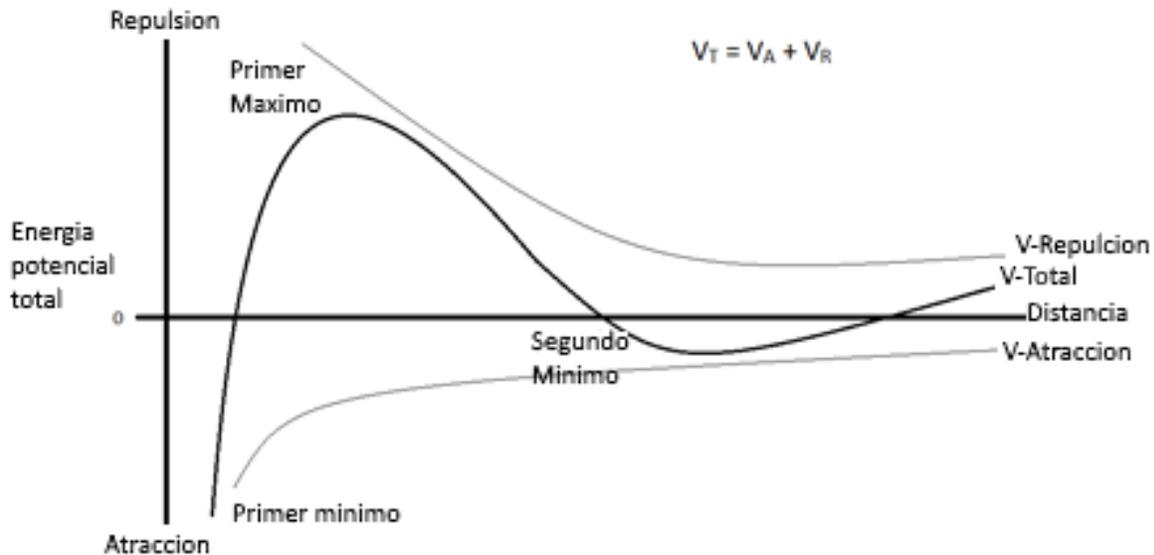


Figura 15 Entre mayor sea el potencial de repulsión mayor será la estabilidad [17].

Si el potencial de atracción es mayor al de repulsión existen dos posibles casos. El primero donde las NPs forman aglomerados inseparables, lo que en la **Figura 15** se presenta como primer mínimo. La otra posibilidad es que el potencial zeta disminuya de tal manera que se formen aglomerados posibles de separar mediante agitación, tal como se muestra en la **Figura 15** como segundo mínimo.

Existen dos mecánicas fundamentales para ayudar la estabilidad de la solución:

- Repulsión estérica: lo que se hace es agregar polímeros que se adhieran a las partículas (ver **Figura 16**), de tal manera que formen una capa externa alrededor de estas evitando el acercamiento entre ellas mismas, reduciendo el efecto del potencial de Van der Waals. Es claro que afectara el tamaño hidrodinámico de las partículas, además podría llegar a afectar el uso principal que se le quiere dar a las partículas, sea positiva o negativamente.
- Estabilización por carga: lo que se hace es modificar las cargas en el coloide (ver **Figura 16**), de modo que mejore la efectividad del potencial zeta.

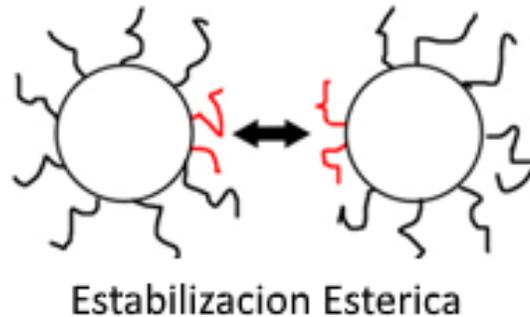
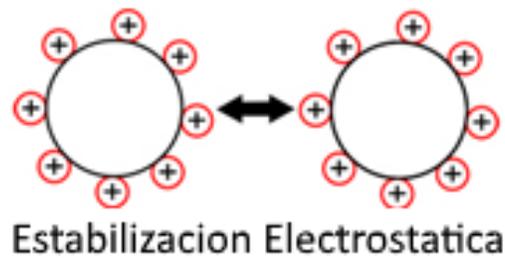


Figura 16 Esquema de estabilidad estérica y por cargas [18]

### 2.5.2 Doble capa

Se utiliza este modelo para entender la atmosfera iónica alrededor de cada una de las partículas y explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas. Tal como se mencionó antes, los coloides por si solos tienen algún tipo de carga, ya sea positiva o negativa; suponiendo el coloide tenga carga negativa, esta atraerá cargas contrarias que se encuentran en la solución, formando una capa alrededor del coloide de iones positivos, conocido como capa de Stern, llegando a un punto de saturación ya que a pesar de que siga atrayendo cargas positivas, la capa de Stern comenzará a repeler estas nuevas cargas, a esta última capa se le conoce como capa difusa (ver **Figura 17**). El grosor de la doble capa dependerá directamente de la concentración de iones en la solución.

La magnitud del potencial zeta, entre mayor sea, independiente de sea positiva o negativa, tenderán a repelerse entre ellas. Se considera estable un coloide si la magnitud del potencial zeta es  $\geq 30 \text{ mV}$ .

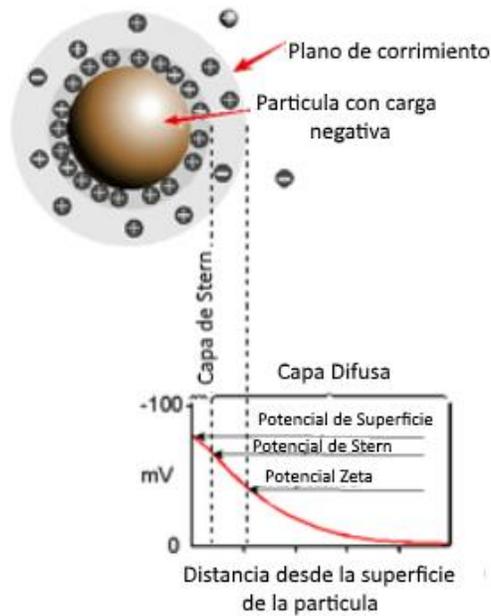


Figura 17 Esquema de la capa de Stern y el potencial zeta [19]

### 2.5.3 Factores que afectan el potencial zeta

Existen varios factores que pueden modificar el potencial zeta, siendo esto:

- pH: Este es uno de los factores más importantes que pueden modificar esta propiedad. Considerando un coloide con potencial zeta negativo si se agrega una solución alcalina tendera a adquirir mayor número de iones negativos, en cambio, si agregamos una acida las cargas tenderán a neutralizarse, es decir, agregara cargas positivas. En otras palabras, en solución acida el potencial tendera a subir positivamente y en soluciones alcalinas bajara negativamente [20].
- Conductividad: El grosor de la doble capa dependerá de la concentración de iones en la solución y puede ser calculada con la fuerza iónica, entre mayor sea la fuerza menor será el grosor de la capa [21].
- Concentración de la formulación del componente: El método de síntesis seleccionado puede favorecer o perjudicar la estabilidad del coloide. Por lo

que es posible modificar la formulación para aumentar el grosor de la doble capa [21].

## 2.6 Microscopía confocal de fluorescencia

Este tipo de microscopios es altamente recurrido en áreas biológicas principalmente, ya que, además de su alta resolución, cuenta con la funcionalidad de observar fluorescencia lo que permite la utilización de técnicas como la recuperación de fluorescencia después de foto-blanqueo (FRAP) [22,23], perdida de fluorescencia en el foto-blanqueo (FLIP) [23], e incluso cuenta con la capacidad de hacer una reconstrucción 3D. Además de esto el microscopio puede controlar la profundidad de campo, reducir o eliminar la información de fondo fuera del plano focal.

En esta sección se abordará sobre el principio del funcionamiento, así como del fenómeno de fluorescencia.

### 2.6.1 Sistema óptico

Este microscopio cuenta con una fuente de luz láser el cual se encuentra dentro del mismo lente objetivo, por lo que el microscopio obtiene la imagen por luz reflejada.

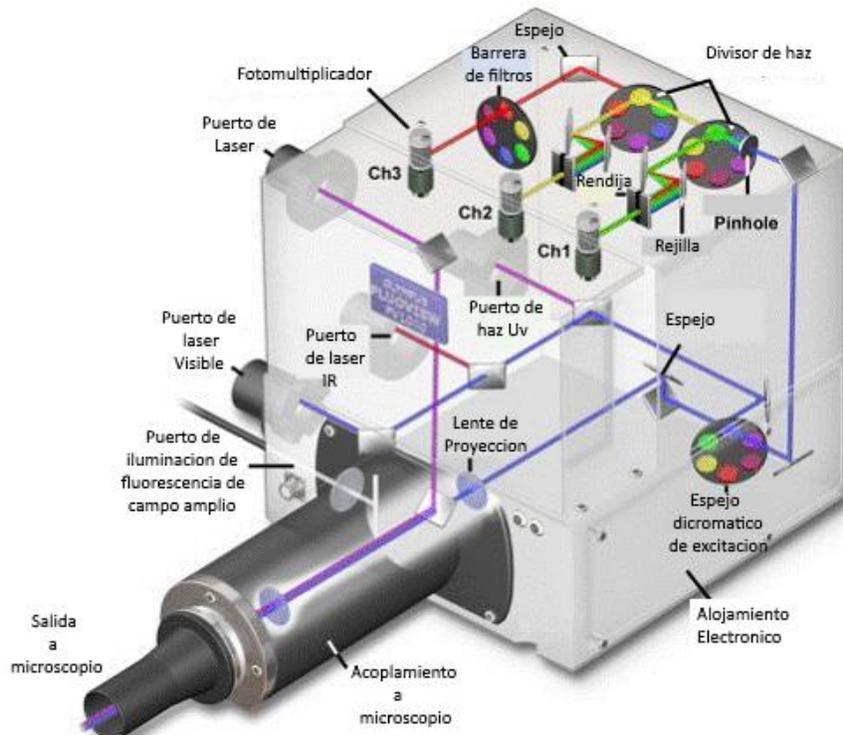


Figura 18 Arreglo experimental de microscopio confocal [24].

Este tipo de microscopios tienen la gran ventaja de observar fluorescencia es por eso mismo que se utilizan láseres como fuente de luz, ya que es necesario excitar los fluorocromos para poder observar la señal de fluorescencia. En la **Figura 18** se muestra el esquema del microscopio confocal.

Se cuenta con tres láseres de excitación los cuales son seleccionados según la necesidad de los fluorocromos, debido a que cada uno de estos tienen una mayor eficiencia en la respuesta de fluorescencia a longitudes de onda determinados. Adicionalmente se utilizan filtros para discriminar fluorescencias no deseadas, así como la autofluorescencia. En biología celular se utilizan fluorocromos de tinción líquida y anticuerpos, los cuales tiñen componentes específicos de la estructura celular

### *2.6.2 Teoría de fluorescencia, diagrama de Jablonski*

La generación de luminiscencia a través de la excitación de una molécula por fotones de luz UV o visible es un fenómeno denominado fotoluminiscencia, el cual es formalmente dividido en las categorías de fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la configuración electrónica del estado excitado y del proceso de des-excitación que da origen a la emisión. La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas para absorber luz de una longitud de onda particular y posteriormente emitir luz de una longitud de onda mayor después de un breve intervalo denominado tiempo de vida de la fluorescencia. Los procesos de la fosforescencia ocurren en una manera similar a la fluorescencia, pero con un tiempo de vida del estado excitado mucho mayor. La fluorescencia está gobernada por 3 importantes eventos que acontecen con muy distintos tiempos de duración. La excitación de una molécula susceptible a fluorescer por la incidencia de un fotón acontece en femtosegundos ( $10^{-15}$  s) mientras que la relajación vibracional de los electrones de un estado excitado a otro nivel más bajo de energía sucede en picosegundos ( $10^{-12}$  s). El proceso final, la emisión de un fotón de una longitud de onda mayor y el consecuente retorno de la molécula a su estado base ocurre en periodos de tiempo relativamente largos de nanosegundos ( $10^{-9}$  s).

El diagrama de energía de Jablonski (**Figura 19**) permite representar los distintos niveles de energía involucrados en la absorción y emisión de luz por una molécula fluorescente. En la figura 18 se ilustra un típico diagrama de Jablonski donde se representa el estado base singulete  $S_0$  y el primer y segundo estado singulete excitado  $S_1$  y  $S_2$ , respectivamente. Las transiciones entre los estados se ilustran como líneas rectas u onduladas, dependiendo de si la transición está asociada con la absorción o emisión de un fotón (línea recta) o si resulta de un proceso de relajación vibracional o no radiativa (línea ondulada). Con luz UV o luz visible cercana al UV muchas de las moléculas fluorescentes pueden excitarse por arriba de los estados vibracionales de mayor energía de los estados singuletes excitados  $S_1$  y  $S_2$ .

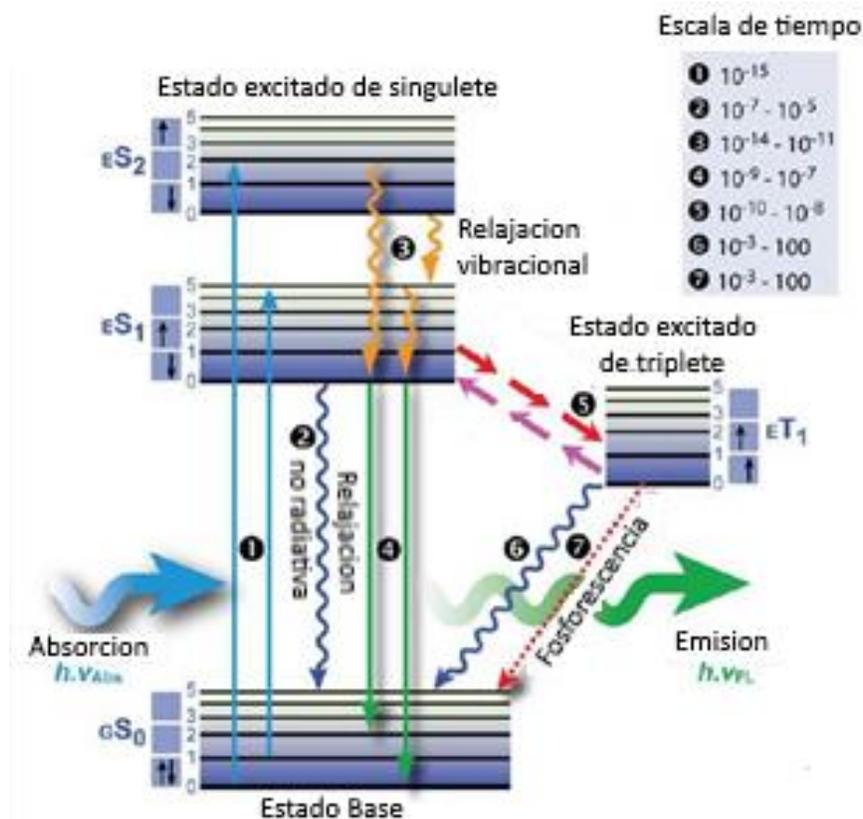


Figura 19 Diagrama de Jablonski para fluorescencia y fosforescencia [24].

Una de las transiciones de excitación presentes en la figura 18 ocurre desde el nivel vibracional más bajo del estado excitado  $S_0=0$  y hasta el estado excitado  $S_2=2$ . Una

segunda transición de excitación es representada desde el estado vibracional del estado base  $S_0=2$  hasta el mayor estado vibracional del primer estado excitado  $S_1=5$ . Inmediatamente después de la absorción de un fotón y la posterior promoción del electrón a estados energéticos excitados varios procesos pueden ocurrir, pero el más probable será la relajación a el nivel de energía vibracional más bajo del primer estado excitado ( $S_1=0$ ). Este proceso es conocido como conversión interna o relajación vibracional y generalmente ocurre en un picosegundo o menos. Una molécula excitada permanece en el estado excitado  $S_1$  por períodos del orden de nanosegundos antes de relajarse hacia el estado base. Si la relajación es acompañada por la emisión de un fotón entonces el proceso se denomina como fluorescencia.

Existen otras rutas de relajación que pueden acontecer con distintas probabilidades y que compiten con el proceso de la relajación por emisión fluorescente. Por ejemplo, la energía en el estado excitado puede ser disipada no radiativamente como calor o la molécula fluorescente excitada puede colisionar con otra molécula y transferir energía en un proceso no radiativo. Otra alternativa es fenómeno conocido como “intersystem crossing” (cruzamientos intersistemas) donde la molécula transita del estado excitado  $S_1$  al estado triplete excitado  $T_1$  como se ilustra en el lado derecho de la figura 18 con líneas cortas de color rojo. Las transiciones desde el estado triplete excitado  $T_1$  al estado base  $S_0$  son prohibidas, lo que da como resultados constantes de velocidades para la emisión de triplete  $T_1$  a  $S_0$  que son varios órdenes de magnitud menores que las de fluorescencia. Este último evento es relativamente raro, pero finalmente origina la emisión de un fotón a través de la fosforescencia. La baja probabilidad del proceso de cruzamiento intersistemas surge del hecho de que las moléculas deben experimentar primero la conversión de espín para producir electrones con espines desapareados, un proceso que resulta desfavorable [25].

## 2.7 Difracción de rayos x

Otra manera de identificar a un cristal es dado que existe una unidad básica denominada celda unitaria, la cual se repite indefinidamente hacia todas direcciones formando la red cristalina. La existencia de una red cristalina es posible de ver a

nivel macroscópico, ya que forma paredes planas en direcciones definidas, un ejemplo claro de esto es el diamante [26].

Existen dos tipos de difracción de rayos x que depende de la disposición del cristal, siendo estas, difracción de polvos y monocristal.

- Difracción de polvos: Tal como su nombre lo indica, la muestra debe estar en polvo, por lo general molida en un mortero. La gran desventaja de esta técnica es que se necesita una cantidad grande de muestra, sin embargo, la ventaja es que es posible evaluar policristales, es decir, diferentes tipos de estructuras cristalinas obteniendo los picos de difracción en un mismo difractograma; con ayuda de una base de datos es posible de determinar los elementos ahí presentes, así como su estructura cristalina, distancia interplanar y tamaño de cristalita.
- Difracción de monocristal: esta técnica es solo aplicable para estructuras monocristalinas, pese a eso es una técnica bastante recurrida, ya que la ventaja que tiene sobre la difracción de polvos es que se necesita una cantidad mínima de muestra, de tamaños milimétricos, lo cual es totalmente deseable en la caracterización de nanomateriales.

### *2.7.1 Principio de funcionamiento*

El principio físico de esta técnica es la ya antes mencionada ley de Bragg, donde los átomos que forman una red cristalina difractan los rayos x. Para que exista una difracción es necesario que la longitud de onda de estos sea similar al espaciamiento interplanar del cristal.

Los rayos x son generados por rayo de tubo catódico, los cuales son filtrados para obtener una radiación monocromática a lo que sigue colimar para concretar el haz y dirigirlo a la muestra.

Dado que las NPs monometalicas forman monocristales, se utilizó un difractómetro de monocristal, cuyo esquema se muestra en la **Figura 20**. La muestra se coloca en aguja, generalmente de vidrio adherida con aceite; la muestra se hace rota en

tres direcciones distintas con la finalidad de hacer incidir el haz en toda la superficie, al mismo tiempo el detector se encuentra en movimiento barriendo los ángulos que observamos en el difractograma [27].

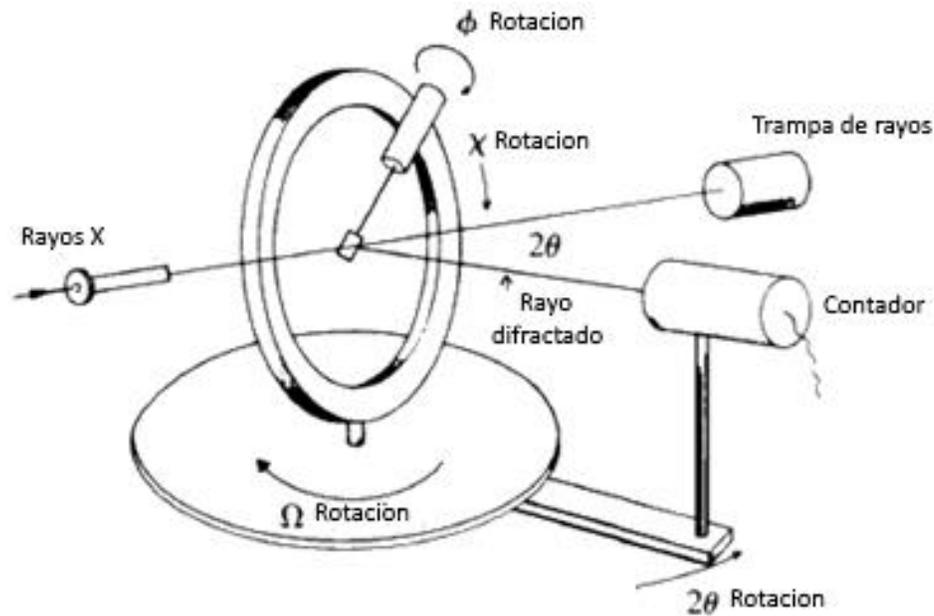


Figura 20 Esquema estructural de un difractómetro de monocristal [28].

### 2.7.2 Ecuación de Scherrer

Esta es utilizada para conocer el tamaño de cristalita, en este caso, el tamaño de nanopartícula. La ecuación tiene la siguiente forma

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Donde  $k$  es la constante de Scherrer dependiente de la morfología de la partícula,  $\lambda$  la longitud de onda del haz utilizado para la difracción,  $\beta$  el ancho medio (adimensional) del pico de difracción con mayor intensidad y  $\theta$  la mitad de la posición del centro de este mismo. Como toda expresión teórica se tiene varias suposiciones, tal como asumir que la red cristalina es perfecta y la forma de las NPs es homogénea, tomando la constante  $k$  un valor de 0.9 [29].

## 2.8 Absorción atómica

Esta técnica es utilizada para conocer la concentración de algún elemento en solución, pudiendo llegar a detectar por debajo de la unidad en partes por millón, lo que cual es una gran ventaja en caso de tener cantidades mínimas del material en solución.

Se debe contar con las lámparas adecuadas para el equipo, ya que su funcionamiento se basa en la absorción y emisión de los átomos del elemento, por lo que se utiliza una longitud de onda tal que el átomo pueda absorber para luego ser emitida y detectada por el equipo.

Átomos de distintos elementos absorben una longitud de onda característica lo que significa que analizar una muestra para conocer si contiene un elemento en particular debe utilizarse preferencialmente una lámpara de dicho elemento.

Antes de realizar una medición se debe calibrar el equipo con estándares del metal a medir, los cuales varían en concentración y sirven para construir una curva de calibración. Es necesario que la muestra se encuentre en forma de iones. Esta debe ser atomizada y ser expuesta a la radiación de lámpara, absorbiendo una parte, por lo tanto, entre mayor sea el número de iones presentes en la muestra mayor será la radiación absorbida **[30]**.

## Referencias

- [1] Atkins, P. and de Paula, J., Physical Chemistry, 7th Edn, Oxford University Press, Oxford, UK, 2002. [373]
- [2] introduction to quantum mechanics with application to chemistry por Linus Pauling and E. Bright Wilson pag 299
- [3] By Tomgally (creator and/or uploader)Parutakupiu (vectorized version) - Original uploader's own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9028674>
- [4] Cruz, D. A., & Rodríguez, M. C. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. Avances en Ciencias e Ingeniería, 3(2), 67-78.
- [5] Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. Annu. Rev. Phys. Chem., 58, 267-297.
- [6] AAVOS International, UV-VIS-spectrometry, <https://aavos.eu/glossary/uv-vis-spectrometry/>
- [7] The University of Iowa, <https://cmrf.research.uiowa.edu/scanning-electron-microscopy>
- [8] ResearchGate, Discover scientific knowledge, and make your research visible, [https://www.researchgate.net/publication/263849645\\_Synthesis\\_and\\_Analysis\\_of\\_ZnO\\_Nanowires?\\_sg=sBF3FjclrZnFT5HLPOV64zhR5HJft81OOI-mmlnY4b3eMH5ftYrXcCY2MW8AuMU8afXTpWygw](https://www.researchgate.net/publication/263849645_Synthesis_and_Analysis_of_ZnO_Nanowires?_sg=sBF3FjclrZnFT5HLPOV64zhR5HJft81OOI-mmlnY4b3eMH5ftYrXcCY2MW8AuMU8afXTpWygw)
- [9] Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control
- [10] Tin Nanoparticles Formed in the Presence of Cellulose Fibers Exhibit Excellent Electrochemical Performance as Anode Materials in Lithium-Ion Batteries
- [11] Reimer, L. (2013). Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis (Vol. 45). Springer.

- [12] Department of Crystallography and Structural Biology, [http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_05\\_5-en.html](http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_5-en.html)
- [13] LS Instruments, <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls/>
- [14] Modern Infrared spectroscopy, Stuart, B., ACOL series, Wiley, Chichester, UK, 1996
- [15] Universität Potsdam Institut für Chemie, [https://www.chem.uni-potsdam.de/groups/kolloid/3\\_lehre/mops/e02\\_dls.pdf](https://www.chem.uni-potsdam.de/groups/kolloid/3_lehre/mops/e02_dls.pdf)
- [16] Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (Rumex hymenosepalus extracts). *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 318.
- [17] University of Brighton, Studentfolio, <https://folio.brighton.ac.uk/user/lc355/dlvo-theory>
- [18] Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Barbara Stuart, 2004 John Wiley & Sons.
- [19] Zeta Potential: An Introduction in 30 minutes
- [20] Ramesh, Dinesh & Prasad, Giri & Raaj, Abhishek. (2015). THERMAL CONDUCTIVITY ENHANCEMENT TECHNIQUES AND THERMAL AGING OF NANOFLUIDS-A REVIEW.
- [21] Seiffert, S., & Oppermann, W. (2005). Systematic evaluation of FRAP experiments performed in a confocal laser scanning microscope. *Journal of microscopy*, 220(1), 20-30.
- [22] Claxton, N. S., Fellers, T. J., & Davidson, M. W. (2006). Laser scanning confocal microscopy. *Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, Florida State University, Tallahassee*, <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>.
- [23] Zeta Potential an Introduction in 30 Minutes, Malver Instruments

- [24] Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., & Drummen, G. P. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques—Frap, Flip, Flap, Fret and flim. *Molecules*, 17(4), 4047-4132.
- [25] Introduccion A La Mecanica Cuantica por Luis de la Peña 3ra edición 2012
- [26] Monshi, A., Foroughi, M. R., & Monshi, M. R. (2012). Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2(3), 154-160.
- [27] SERC, the Science Education Resource Center at Carleton College, [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SXD.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SXD.html)
- [28] Welz, B. (1976). *Atomic absorption spectroscopy*. Verlag Chemie.
- [29] *Single-Crystal X-Ray Diffraction*, Christine M. Clark, Eastern Michigan University, Barbara L. Dutrow, Louisiana State University.
- [30] *Difracción de Rayos X*, Universidad Autónoma de Cartagena.
- [31] *Dynamic Light Scattering -Theory and Practice*, Barbara Frisken, June 21, 2001
- [32] *Thermal and Rheological Measurement techniques for nanomaterial characterization*, Vol 3, Sabu Thomas, y colaboradores, ELSELVER 2017
- [33] *Dynamic Light Scattering*, Marta Sartor, University of California, San Diego
- [34] Tesis de licenciatura: “Fotosíntesis y Caracterización de Nanopartículas Nucelo@Coraza Au@Ag empleando extracto de *Rumex hymenosepalus*”, Jesus Mauro Adolfo Villalobos Noriega, Universidad de Sonora, 2017
- [35] Information about zeta potential, K. Khosnevisan, M. Barkhi, Institute of Agricultural Biotechnology, Nano department, Karaj, Tehran, Iran
- [36] *Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 Minutos*, Zeta-Meter, Inc.
- [37] *Confocal Microscopy*, Denis Semwogerere, Erick R. Weeks, Emory university, Atlanta, Georgia, U.S.A.

[38] Handbook of Microscopy for Nanotechnology, Nan Yao, Zhong Ling, Kluwer Academic Publisher, 2005

[39] The Basics of Confocal Microscopy, Vineeta Rai and Nrisingha Dey, Institute of Life Science, India, 2011

[40] Atomic Absorption Spectrometry, Royal Society of Chemistry

[41] Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry, second edition, Richard D. Beaty and Jack D. Kerber, 1993, Perkin Elmer Corporation

## Capítulo 3

### Evaluación Celular

En este capítulo se abordarán las técnicas utilizadas en el manejo de líneas celulares humanas, las cuales se utilizaron para evaluar la citotoxicidad de las NPs.

#### 3.1 Determinación de viabilidad con MTT

Este reactivo se utiliza para ensayos de colorimetría, a diferencia del azul de tripano, el cual es utilizado para observar la integridad de la membrana celular, este observa la actividad metabólica de la célula. Este es un método sencillo y rápido, el cual se lleva a cabo en placas de 96 pozos, sembrando a una densidad de 5000 células/pozo.

Las células viables a través de la mitocondria son capaces de reducir el MTT, formando sales de formazan en forma de cristales (**Figura 21**), lo cual indica que la célula es metabólicamente activa, por cual se puede inferir que es viable. Las células se dejan interaccionar con el MTT por 4 h.

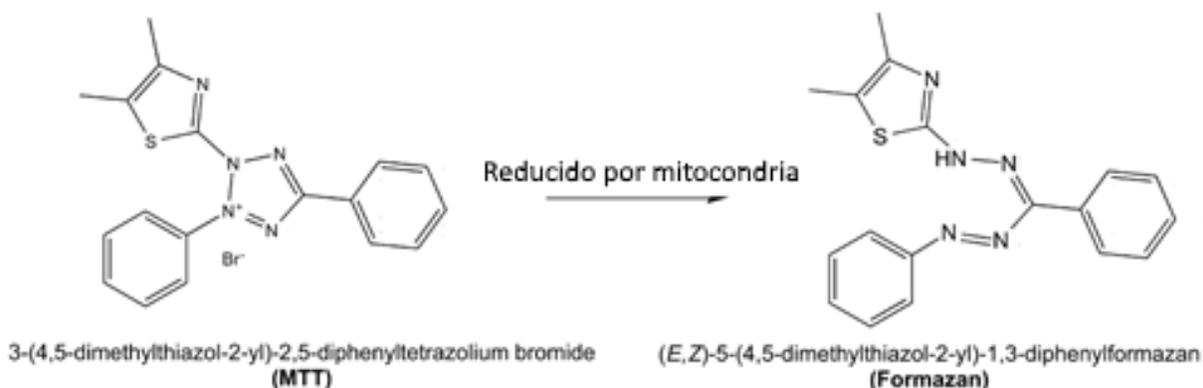
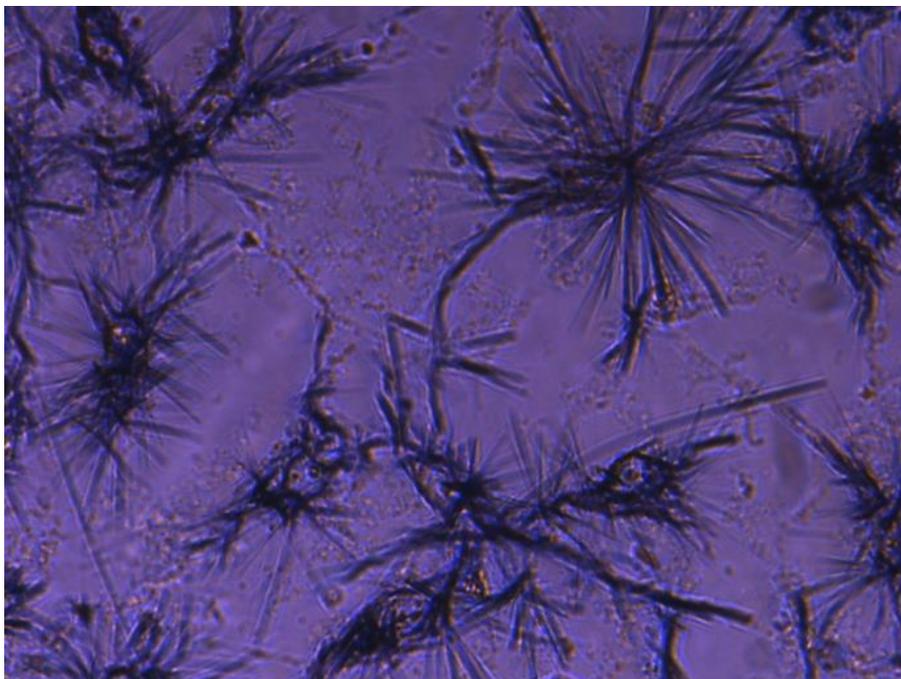


Figura 21 Reducción de MTT a sales de Formazan [1].

Una vez transcurrido el tiempo de incubación el sobrenadante de la placa se retira, donde lo siguiente es disolver los cristales (**Figura 22**) formados utilizando DMSO en una incubación de 30 min a 37 °C.

Una vez disueltos, la placa es colocada en la lectora de placas ELISA midiendo a 570 nm. La viabilidad de las células se mide en base a la absorbancia registrada, por lo que entre mayor sea esta, mayor será la viabilidad de las células.



*Figura 22 Formación de cristales de formazan.*

### 3.2 Producción de especies reactivas de oxígeno

Las células por si solas son capaces de formar radicales libres de oxígenos, tales como superóxidos, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilos, en la fosforilación oxidativa, proceso importante en la formación de ATP. Estos radicales tienden aparearse, tomando electrones de la membrana celular, lo que lleva a un daño en la membrana, oxidando proteínas y ADN. [2].

Hay mecanismos asociados a las NPs por los cuales tienden a producir estas especies de reactivas (**Figura 23**). Abdal y colaboradores asocia la toxicidad de las NPs en función al tamaño, siendo las NPs de menor diámetro las que presentan mayor estrés oxidativo en la célula debido a que cuentan con una mayor área superficial, lo que se refleja a un mayor número de sitios reactivos en la superficie de NP [2]. Por otra parte, también menciona la capacidad de las AgNPs de despolarizar la membrana mitocondrial e interferir con la cadena de transporte de electrones a través de la activación de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) la cual produce superóxido.

La presencia de radicales libres en la célula no está asociado a la muerte inminente de esta, ya que cuenta con mecanismos para combatir la presencia de estos radicales. La presencia de antioxidantes, así como de enzimas tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa permiten la eliminación de estos radicales [3].

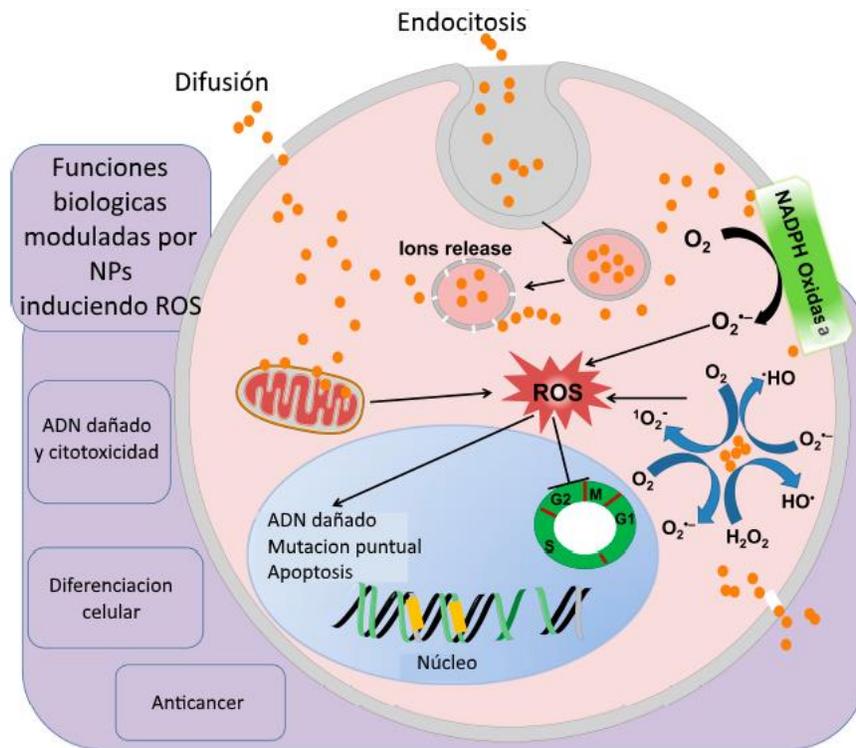


Figura 23 Producción de ROS debido a NPs [4].

Utilizando un microscopio confocal y el reactivo 2', 7'-Diclorohidrofluoresceína diacetato se puede rastrear las especies reactivas de oxígeno, ya que el reactivo se vuelve fluorescente en la presencia de estos [5].

### 3.3 Ensayos de migración en ralladura

En angiogénesis es muy importante la migración celular, ya que las células que forman los vasos sanguíneos se desprenden entre ellas, para así, formar un nuevo vaso sanguíneo [6, 7].

Para estudiar cambios en la migración celular se recomienda realizar ensayos de ralladura en la que se simula una lesión, donde las células tendrán que repoblar dicha área. Para este ensayo se dejó las células en ayuno en medio incompleto a 0.1% de suero fetal bovino (FBS) por un lapso mínimo de 12 horas. Pasado este tiempo se llevó a cabo la ralladura, la cual puede realizarse a cabo con una punta de micropipeta, se procedió a retirar el medio y lavar con un buffer fosfato salino (PBS) para así eliminar los restos celulares desprendidos. Después se agregó medio nuevo estéril agregando los tratamientos a evaluar, simultáneamente se debe tener un control para comparar los avances.

La migración celular se rastreó con un microscopio Leica invertido transcurridas 24 h. Se tomaron fotos con la cámara integrada del microscopio al inicio y al final del experimento. Haciendo uso del software Image J se contabiliza el número de células presentes en el área de interés **[8]**.

## Referencias

- [1] By Rogan Grant - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=35400804>
- [2] Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., ... & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 120.
- [3] Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- [4] Peiris, S., McMurtrie, J., & Zhu, H. Y. (2016). Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis. *Catalysis Science & Technology*, 6(2), 320-338.
- [4] Rastogi, R. P., Singh, S. P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(3), 603-607.
- [5] Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., ... & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 120.
- [6] Adair TH, Montani JP. *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Overview of Angiogenesis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>
- [7] Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653.
- [8] <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

## Capítulo 4

### Resultados

Tras haber explicado el principio de funcionamiento de las técnicas experimentales en este capítulo se verán los resultados obtenidos, así como la interpretación.

#### 4.1 Espectroscopia Uv-Visible

Los estudios correspondientes a la caracterización espectroscópica Uv-vis se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elemer Lamda 45. Todos los experimentos se efectuaron con apertura de slit 0.5, con velocidad de colecta de 480nm/min y a temperatura ambiente (25°C).

##### 4.1.1 Extracto

Antes de llevar a cabo la síntesis de NPs utilizando el extracto de *Vitex mollis*, se llevó a cabo una curva de calibración con el extracto, donde se fijó en una longitud de onda característica del extracto y se varía la concentración de este.

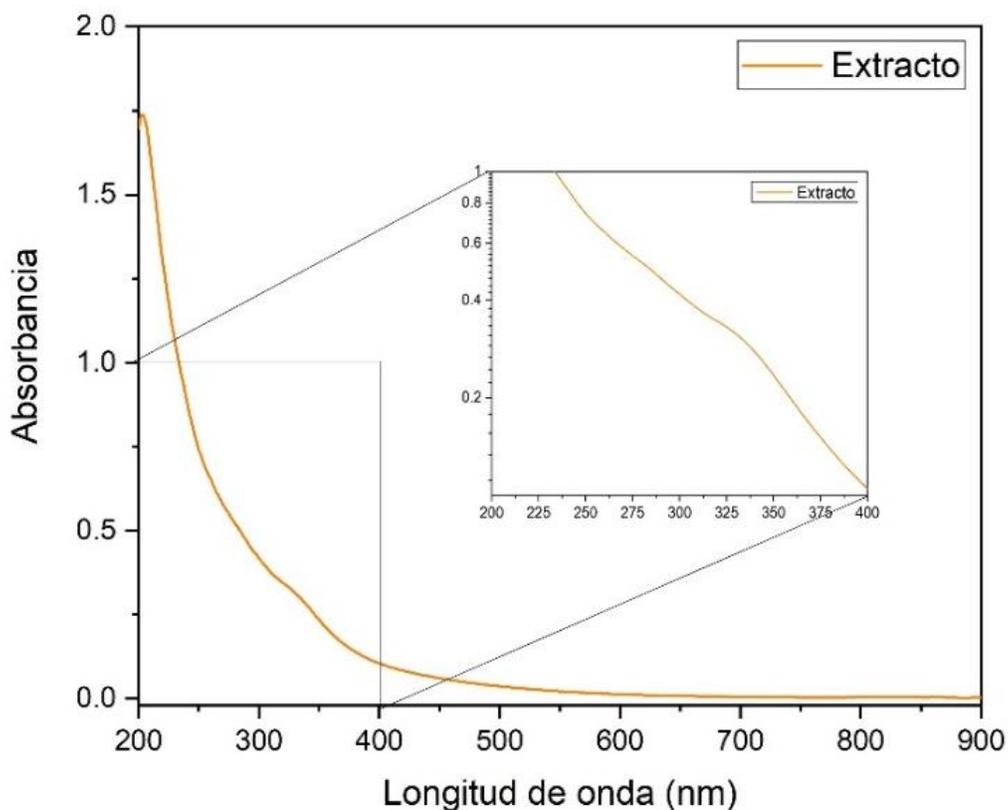
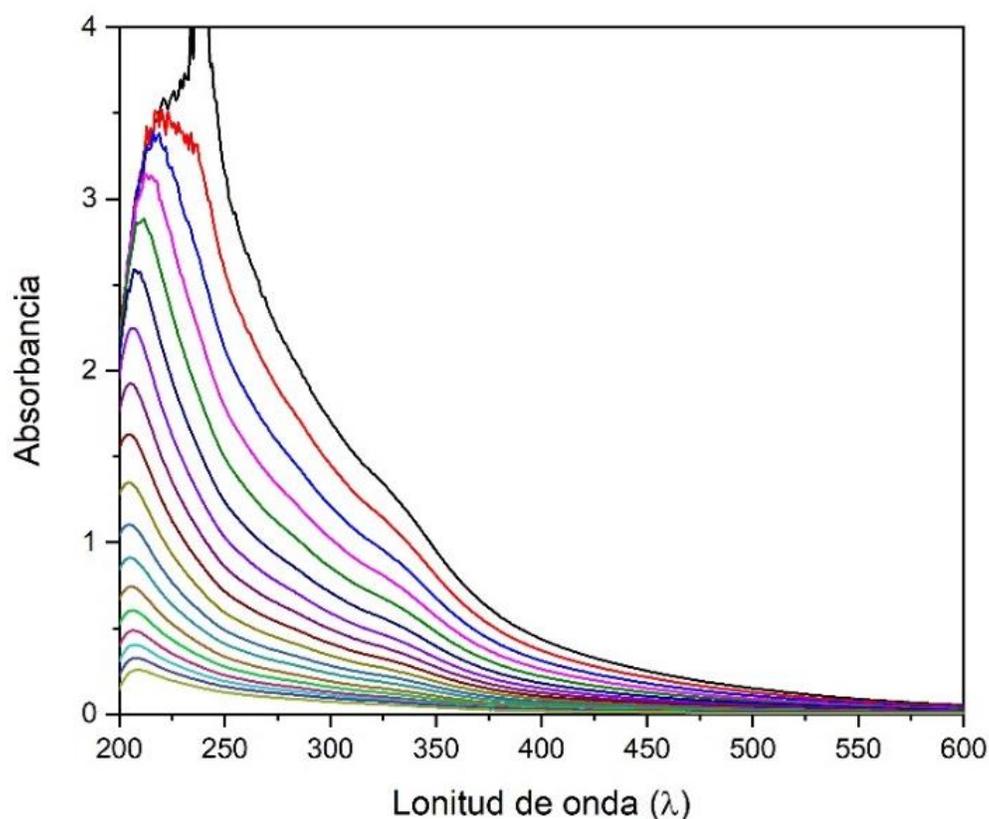


Figura 24 Espectro Uv-Visible del extracto del fruto de *Vitex mollis*.

En la **Figura 24** se muestra el espectro Uv-Visible para el extracto solo junto a un zoom en el rango de 200 a 400  $nm$  con la finalidad de mostrar la presencia de un hombro característico del extracto de la fruta de *Vitex mollis* en la longitud de onda de 330  $nm$ .

Se agrego un volumen de 500  $\mu L$  de extracto a una concentración de 10  $mg/mL$  en conjunto a 2.5  $mL$  de solvente (1:1 agua/etanol), llenando así la celda de cuarzo del espectrómetro Uv-Visible. Posteriormente se retiró 500  $\mu L$  de la solución, y agregando la misma cantidad de solvente para obtener una solución diluida, esto se llevó a cabo 17 veces (**Figura 25**).



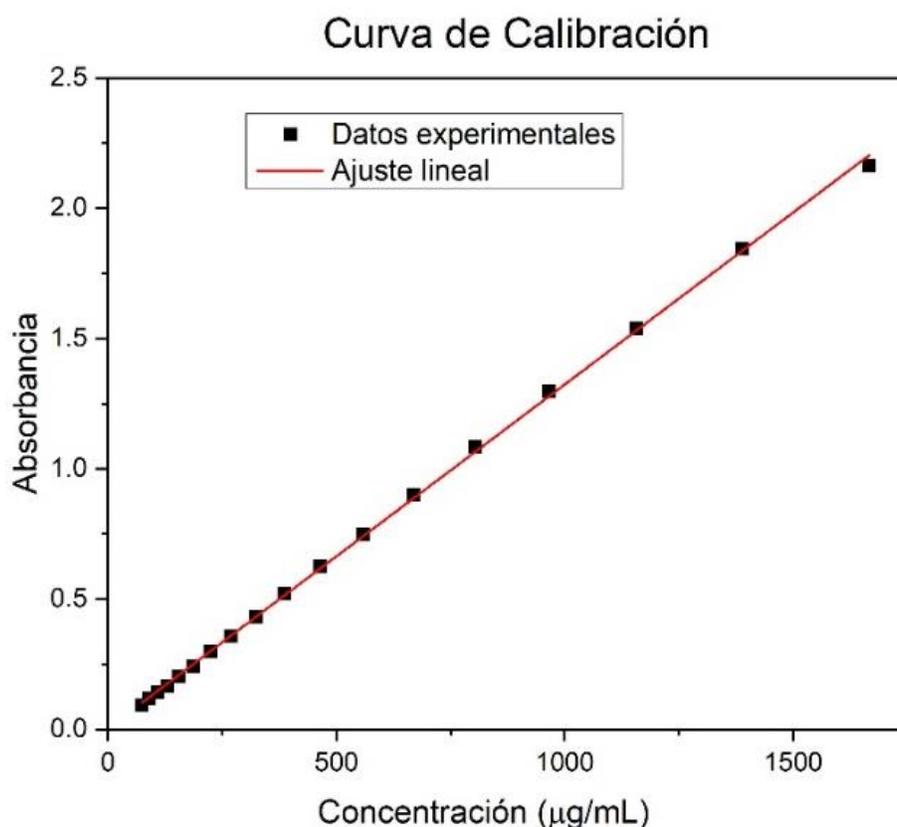
*Figura 25 Dependencia de concentración del extracto en espectro Uv-Visible*

La curva de calibración fue construida a partir de graficar la absorbancia medida a 330  $nm$  contra la concentración correspondiente de cada una de las mediciones, a

lo que se realizó un ajuste lineal de los datos, dando como resultado la siguiente ecuación

$$A = 0.00308 + 7.7671C$$

Donde  $A$  es la absorbancia y  $C$  la concentración, de esta manera podemos conocer la concentración real del extracto mediante la absorbancia aun cuando se trate de uno preparado posteriormente. Es importante mencionar que no debe sobrepasar el valor de absorbancia que se muestra en la **Figura 26** ya que el régimen superior deja de tener un comportamiento lineal, por lo que la curva de calibración deja de ser efectiva en dichos rangos.



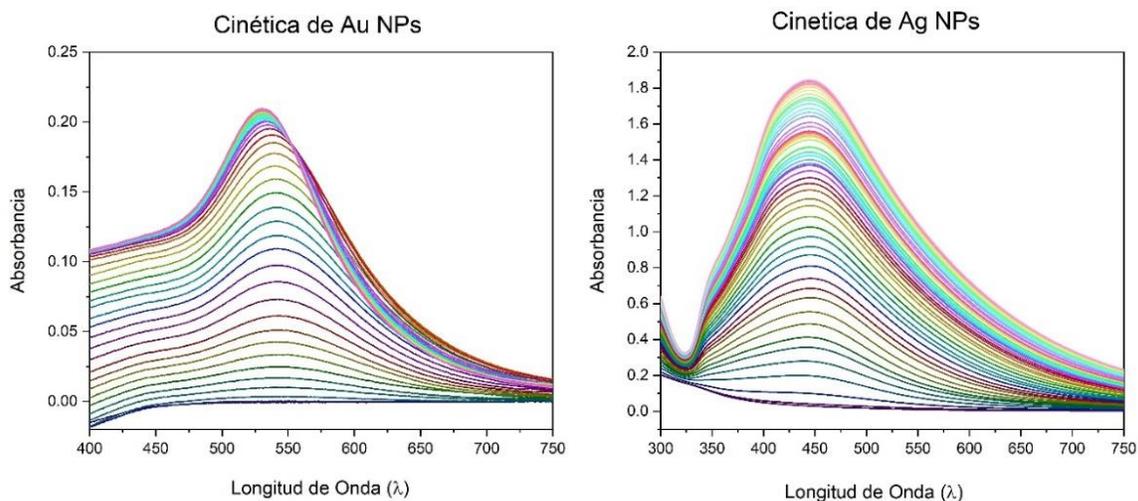
*Figura 26 Construcción de curva de calibración de concentración de extracto.*

#### 4.1.2 Nanopartículas

Al analizar las partículas sintetizadas por Uv-Vis se encontró que ambas partículas mostraban picos característicos, siendo el de 550 nm para las de oro y un pico de 450nm para las de plata.

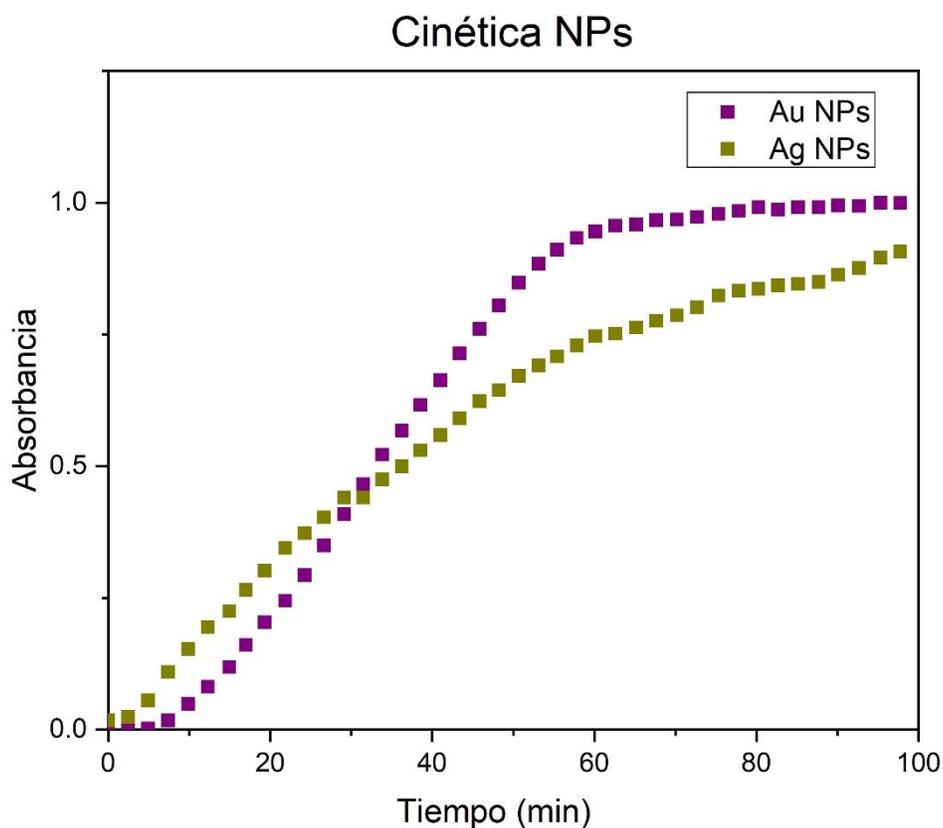
Es importante conocer el proceso de síntesis del nanomaterial, por lo que realizo una cinética de síntesis para ambos nanomateriales.

La síntesis se llevó a cabo dentro de la celda de cuarzo del espectrómetro Uv-Visible, donde se agregaron solvente, precursor y extracto a lo que sigue su medición. Tras la medición se colocó la celda en contacto con luz solar por 1 *min* a lo que deberá ser agitada para homogenizar y realizar una nueva medición (**Figura 27**).



*Figura 27 Absorbancia de AuNPs y AgNPs en función del tiempo.*

Se fijó la longitud de onda de 550 *nm* y 450 *nm* para AuNPs y AgNPs respectivamente, graficando la absorbancia en dicha longitud contra el tiempo de reacción.



*Figura 28 Cinética de AuNPs Y AgNPs Normalizadas.*

En la **Figura 28** se observa que la síntesis de las NPs de oro es mucho más rápida que las de plata e incluso se puede observar una asíntota para el caso de las AuNPs a partir de la primera hora mientras que para la síntesis de plata la reacción no llega al comportamiento asíntótico a los 100 min.

Se recomienda que la síntesis se lleve a cabo en presencia de luz solar, ya que, de no ser así, la síntesis toma tiempos mayores a 6 h en realizarse. Es notorio cuando la síntesis se lleva a cabo, ya que las AuNPs viran a un color morado mientras que las AgNPs a un tono café (Ver **Figura 29**).



Figura 29 AgNPs y AuNPs respectivamente.

Es de esperar que tras la síntesis “completa” de NPs queden residuos de los reactantes, ya sea de extracto o precursor metálico o ambos, por lo que es necesario someter a proceso de limpieza por centrifugación a 14,000 RPM por 1 h. Se descarta el sobrenadante y resuspende con ayuda de sonicación, el proceso se repitió 3 veces y finalmente es resuspendido en alcohol para su posterior secado.

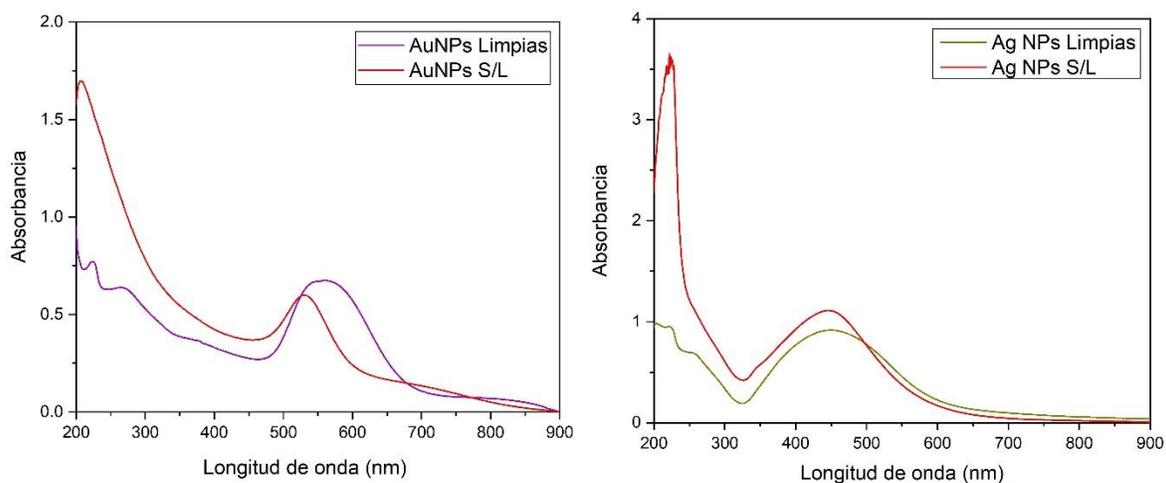
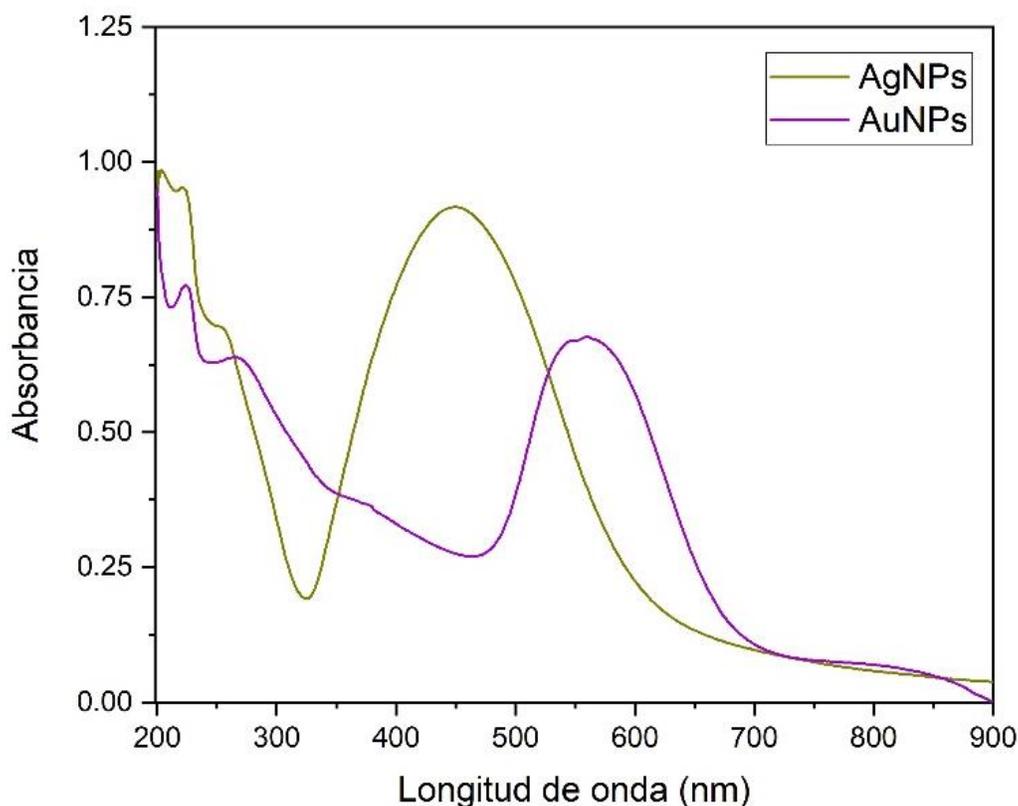


Figura 30 Síntesis inicial de NPs y tras limpieza

La **Figura 30** muestra el espectro Uv-Visible de las NPs de oro y plata antes y después del proceso de limpieza.

En ambos casos es posible ver como baja la banda entre 200 y 300 *nm* correspondiente al extracto, sin embargo, no es eliminada del todo, de lo que se puede inferir, se encuentra adicionada a las NPs (**Figura 31**).



*Figura 31 Espectros de absorción para AuNPs y AgNPs.*

La figura anterior muestra los plasmones tras la limpieza de las NPs, en ambos casos se tiene un el máximo de absorbancia en 200 *nm* siendo esta de 1. Se puede observar que ambas partículas cuentan con una parte del extracto aun presente.

## 4.2 Microscopía Electrónica

### 4.2.1 Determinación de Tamaños por TEM y caracterización por SEM

La caracterización de los tamaños y formas de las NPs se realizó por TEM usando un microscopio electrónico de transmisión de emisión de campo Jeol 2010 F operando a 200 keV y con cámara CCD Gatán acoplada al equipo. De las

micrografías de TEM se obtuvieron la distribución de tamaños y los tamaños promedio de las poblaciones de NPs para lo cual se utilizó el programa de análisis de imágenes Image J y el software Origin v8.0 para la determinación de los promedios de tamaños y para ajustar mediante gaussianas a las distribuciones de tamaños de las NPs. En la **Figura 32** a)-d) se muestran distintas micrografías de TEM para las NPs de plata y su correspondiente distribución de tamaños en e), obtenida con 665 NPs.

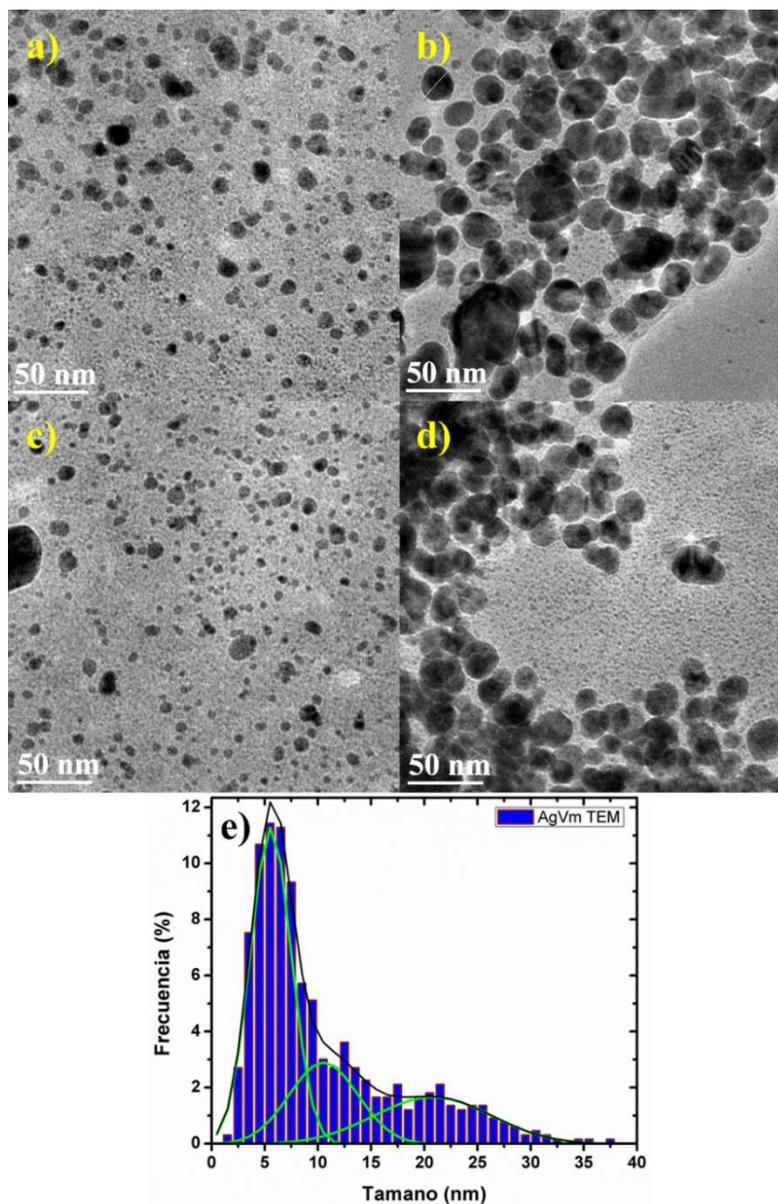


Figura 32 a)-d)Micrografías de TEM de AgNPs en y e) la correspondiente distribución de tamaños.

El tamaño promedio de todo el grupo de NPs de plata analizado es  $d_{AgNPs} = 10.4 \pm 7.3nm$  donde el valor relativo de la desviación estándar respecto al promedio indica una gran dispersión de tamaños tal como se observa en las micrografías. El ajuste por gaussianas de la distribución de tamaños en la **Figura 32 e)** indica que las poblaciones se agrupan alrededor de 3 tamaños promedios donde más del 60% de la población de NPs poseen tamaños menores a 10nm ubicándose dentro de la región de la gaussiana más estrecha (ancho medio = 3.8 nm) y de mayor altura, centrada en 5.5 nm. La morfología de las partículas de plata corresponde a formas cuasi-esféricas en su mayoría.

En la **Figura 33** se muestran micrografías de TEM de NPs de oro sintetizadas con el extracto hidroetanólico del fruto de *Vitex mollis*. Las micrografías 35 a) y b) corresponden a bajos aumentos donde es posible observar la heterogeneidad de formas que presentan las NPs de oro donde destacan partículas con geometrías regulares como triángulos, triángulos truncos, hexágonos icosaedros y cuasiesferas. La **Figura 33 c)** y d) corresponden a micrografías HRTEM de una nanopartícula de oro de 18 nm con forma de triángulo trunco donde los planos cristalinos se resuelven claramente y a una nanopartícula icosaédrica de 32 nm, respectivamente. En la **Figura 33 e)** se muestra el histograma correspondiente a la dispersión de tamaños de las NPs de oro construida con 400 partículas donde claramente las poblaciones se distribuyen en dos poblaciones centradas en 11.8nm y 22nm respectivamente. El tamaño promedio de todo el grupo de NPs analizado es  $d_{AuNPs} = 19.7 \pm 5.7nm$ .

Nuestros resultados indican que la síntesis de NPs monometálicas de plata y oro con extracto de fruto de *Vitex mollis* generan productos con tamaños que no exceden de 40nm lo cual los hace viables para aplicaciones biológicas [1], además a pesar de no ser monodispersas, las poblaciones se aglutinan en grupos bien definidos de tamaños como en otros reportes de fitosíntesis de NPs [2], esta propiedad permite ser recuperados por grupos de tamaños mediante técnicas apropiadas de separación como gradientes de densidades o lo diálisis.

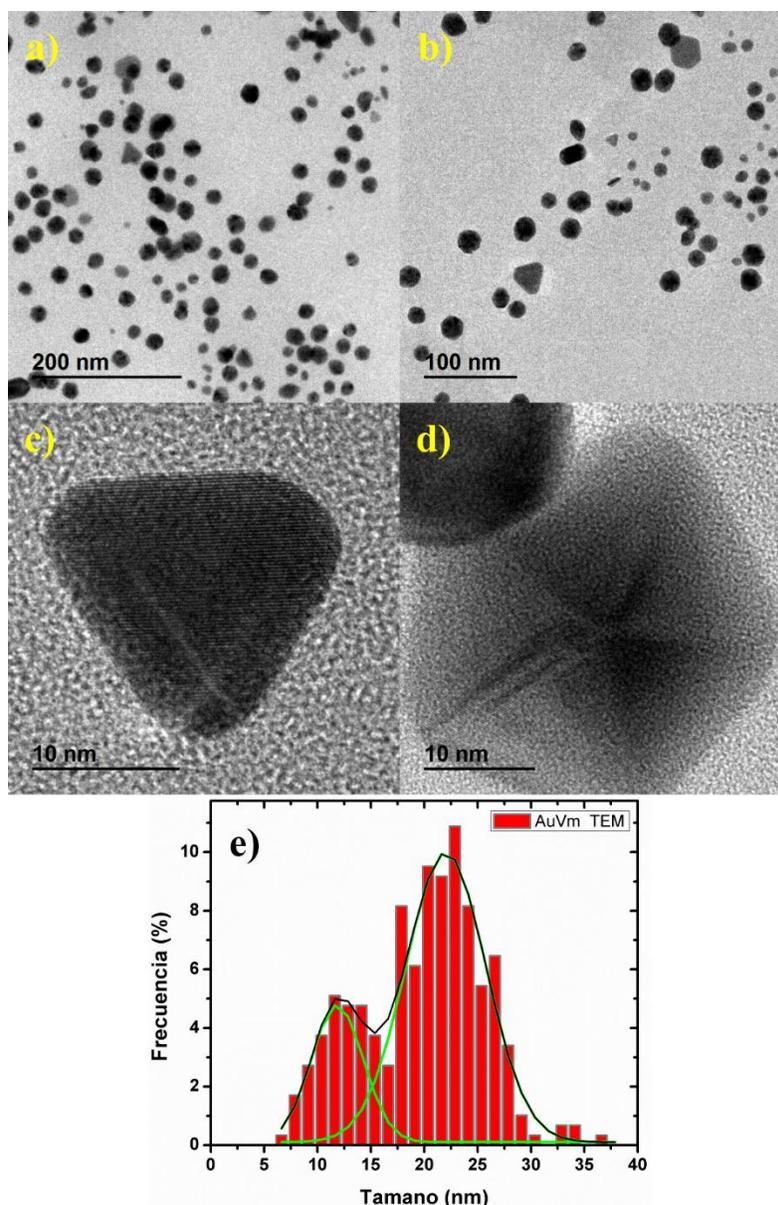
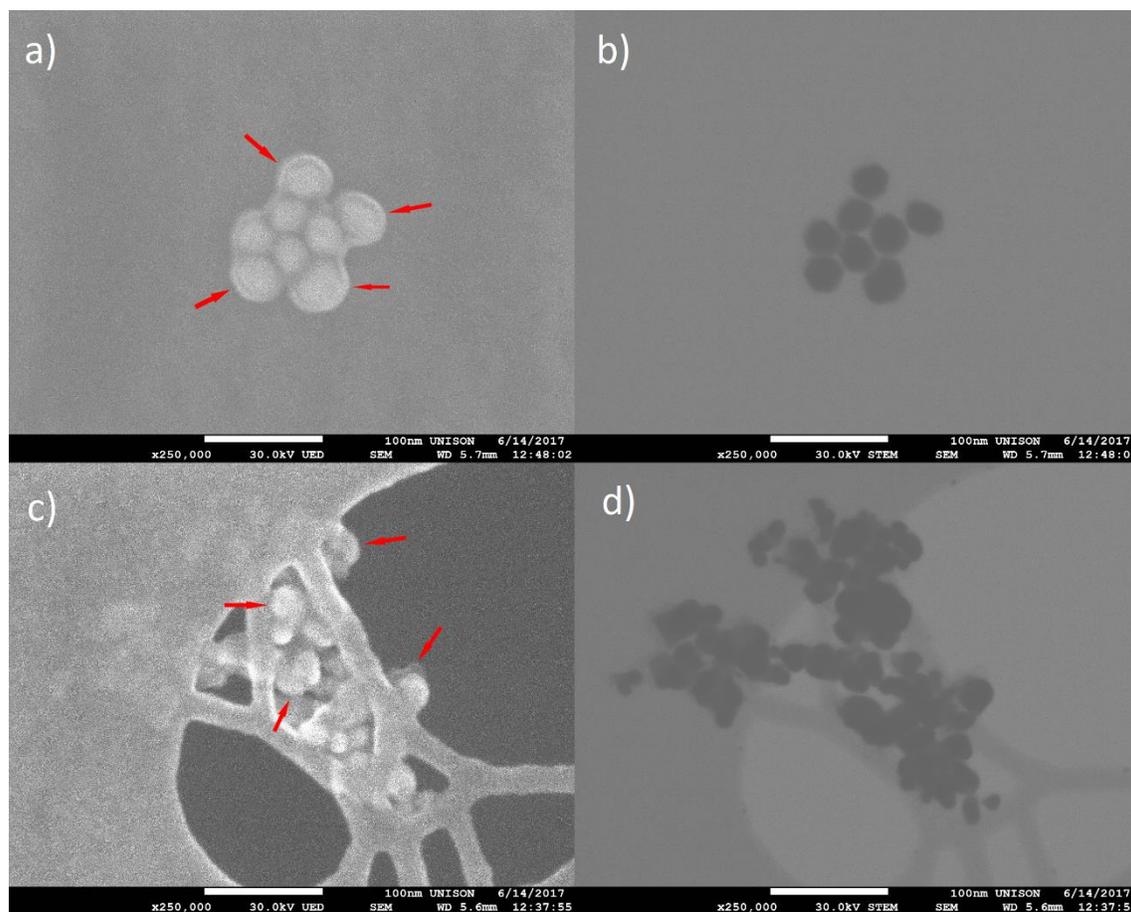


Figura 33 Micrografías de TEM de AuNPs en a)-d) y e) la correspondiente distribución de tamaños.

A diferencia de la microscopía de transmisión, con la microscopía de barrido es posible obtener información referente a la superficie de las NPs. La caracterización mediante microscopía electrónica de barrido se efectuó en un equipo SEM Jeol de Emisión de campo que cuenta con detectores de electrones secundarios, electrones transmitidos (STEM) y detector EDS, de tal forma que se puede apreciar tanto el material metálico de la nanopartícula como la capa de material orgánico que lo

rodea tal como se muestra en **Figura 34** la cual corresponde a un grupo de NPs de oro obtenidas de la síntesis con extracto de *Vitex mollis*.



*Figura 34 Modo SEM y STEM respectivamente para a),b) AuNPs y c),d) AgNPs*

Como se aprecia en la **Figura 34 a)** las partículas son rodeadas por una membrana muy uniforme de 5 nm de espesor señalada por las flechas rojas, la cual no es detectada cuando analizamos el mismo conjunto de partículas en modo transmisión (STEM) como se ilustra en la **Figura 34 b)** lo que permite suponer el carácter orgánico de esta cobertura; de igual forma se puede apreciar este efecto en las AgNPs en **c)** y **d)**. En el caso de la síntesis de NPs metálicas empleando extractos de plantas como agentes reductores se sabe que estos actúan como agentes estabilizantes al adsorberse a la superficie del nanomaterial formado [2] tal como observamos en nuestro caso. La naturaleza de estos agentes orgánicos estabilizadores puede establecerse mediante técnicas como espectroscopía IR o de masas.

#### 4.2.2 EDS

La composición química de las NPs se obtuvo mediante espectroscopía de dispersión de energías de rayos-x (EDS) empleando un detector Bruker Quantax 200 acoplado al microscopio de barrido. Esta técnica nos permite establecer la presencia de los metales correspondientes en las NPs monometálicas de plata y oro. La **Figura 35** corresponde al espectro EDS asociado al conjunto de AgNPs que se incluye como imagen insertada en el espectro. La señal característica de la plata proveniente de la transición  $L_{\alpha}$  en 2.98 keV confirma la presencia de la plata en las NPs y la pequeña señal del oxígeno puede asociarse a los compuestos orgánicos del extracto acomplejados con las NPs. El cobre y el carbono provienen de la rejilla en la que se depositó la muestra y la señal de aluminio del portamuestras del equipo de SEM.

La **Figura 36** corresponde al espectro EDS de las AuNPs incluidas en el inset. La señal del oro en el espectro proviene de las transiciones  $M_{\alpha}$  y  $L_{\alpha}$  ubicadas en 2.12 keV y 9.71 keV, respectivamente. Las señales bien definidas del oro nos confirman la naturaleza metálica de las NPs y al igual que en el caso de las partículas de plata se detectan señales asociadas al extracto (C y O), además de los picos del Cu y Al provenientes de la rejilla y el soporte, respectivamente.

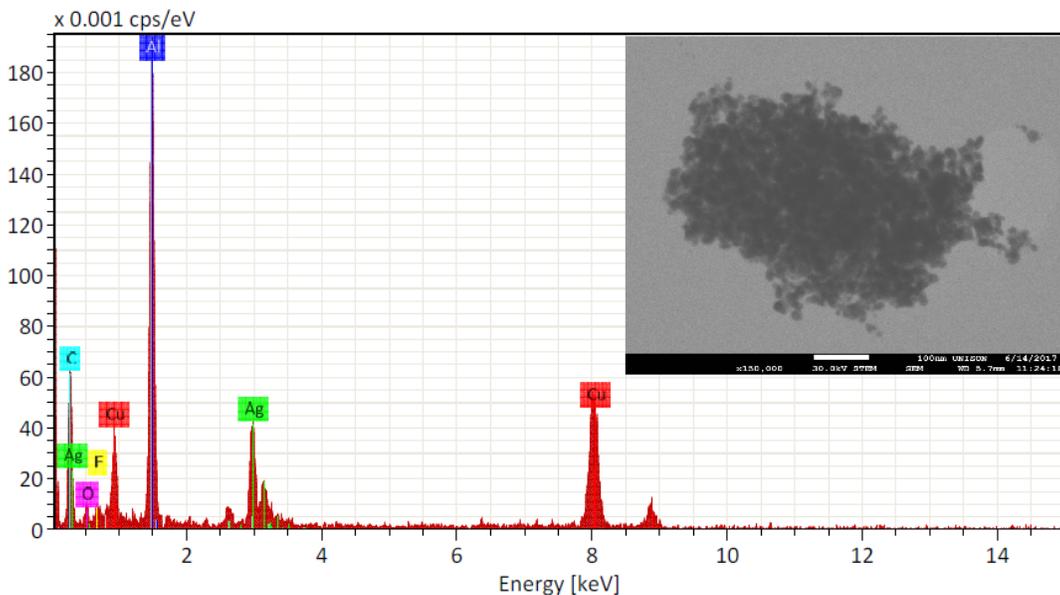


Figura 35 EDS en AgNPs.

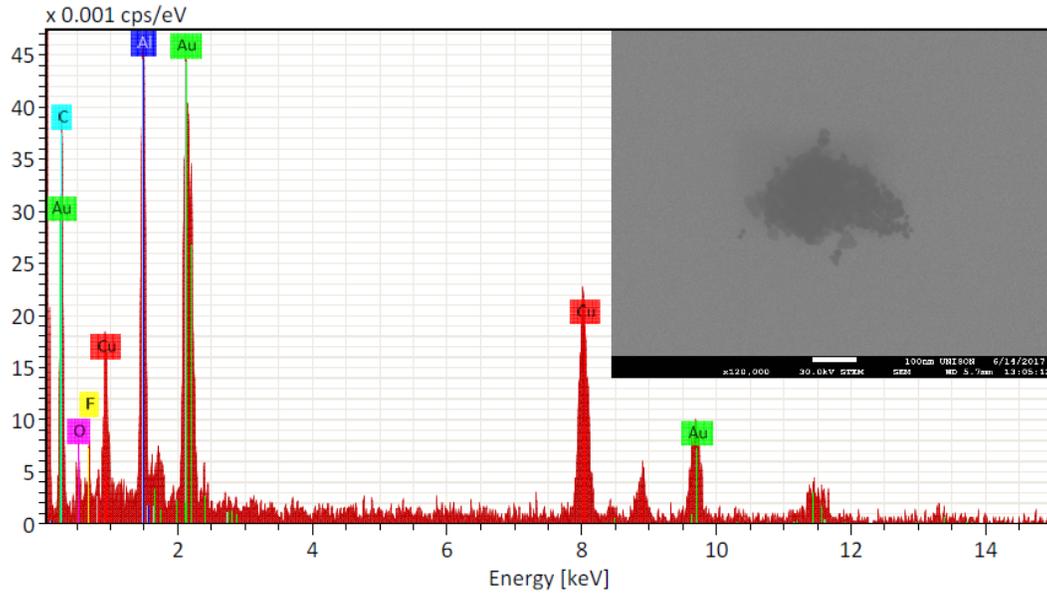


Figura 36 EDS en AuNPs

De la caracterización por EDS de nuestros sistemas de NPs podemos establecer que los nanomateriales corresponden a NPs metálicas monometálicas de plata y oro, donde el bajo contenido de oxígeno detectado permite suponer que las partículas de plata no se encuentran oxidadas lo cual deberá verificarse por HRTEM.

#### 4.3 HRTEM

Gracias a las imágenes de HRTEM en conjunto con el programa *Digital Micrograph* es posible conocer la fase cristalina del material al igual que la distancia interplanar de cada familia de planos.

Para el tratamiento de imágenes de HRTEM se debe de elegir un área de interés, en este caso alguna sección de la nanopartícula, lo siguiente es aplicar una transformada de Fourier rápida (FFT) para lo cual nos desplegará una imagen nueva de los patrones de difracción. Se debe elegir los puntos de difracción y aplicar una máscara para solo tomar en cuenta estos puntos, lo siguiente será aplicar una transformada inversa de Fourier rápida, la cual nos mostrará los planos referentes a los puntos de difracción de modo que ahora es posible calcular la distancia interplanar de esta imagen, tal como se muestra a continuación.

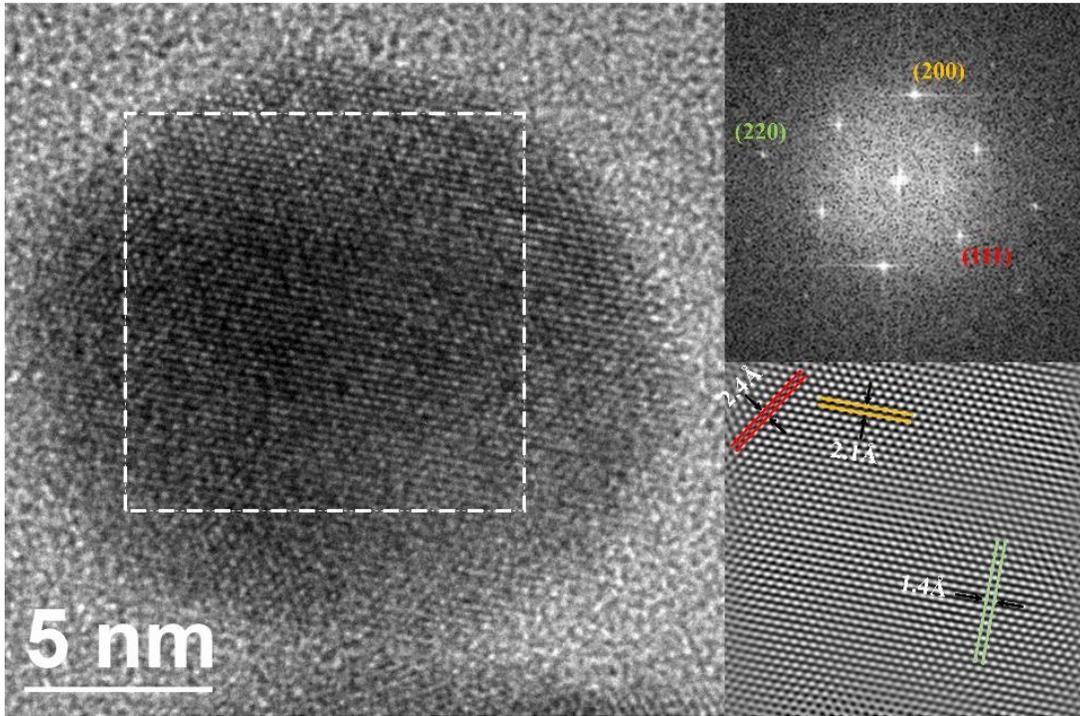


Figura 37 HRTEM para AuNPs

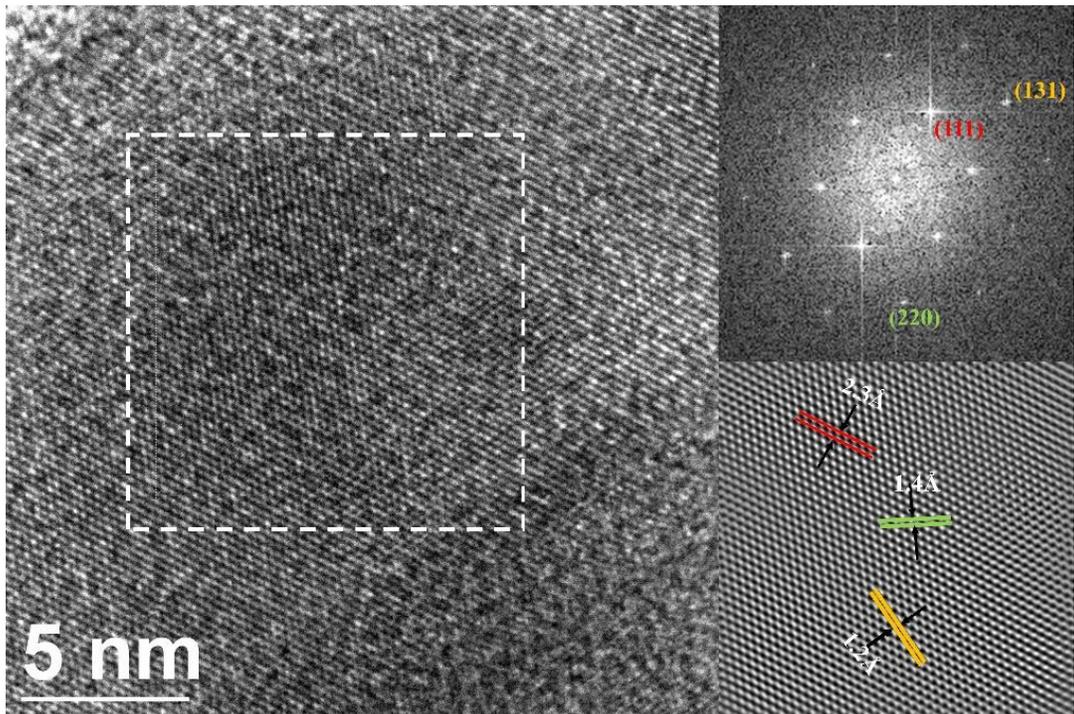


Figura 38 HRTEM para AgNPs

En la **Figura 37** se muestra una AuNPs a la cual se le aplicó el procedimiento antes mencionado, donde se pueden ver los patrones de difracción y por otro lado vemos las distintas familias de planos y sus respectivas distancias interplanares. Lo mismo se realizó para una AgNPs la cual se muestra en la **Figura 38**.

En la **Tabla 2** se muestran las distancias interplanares asociadas a los planos antes mencionados.

*Tabla 2 Distancias interplanares*

Nanopartículas	(111)	(220)	(200)	(131)
<b>AuNPs</b>	2.4 Å	1.4 Å	2.1 Å	–
<b>AgNPs</b>	2.3 Å	1.4 Å	–	1.2 Å

#### 4.4 IR

Esta técnica se utilizó para tener un registro de que la cubierta de las NPs es efectivamente el extracto, por lo que se tomó el espectro IR del extracto solo y de las partículas metálicas.

Dado que el compuesto de interés que se espera esté presente en las partículas es el ácido fítico (IP6) se hizo una comparación entre este compuesto y el extracto solo, tal como se muestra en la **Figura 39**.

Se puede apreciar la presencia de los picos de absorción de los grupos funcionales propios del ácido fítico [3-5] las bandas presentes en 1260 y 1050  $cm^{-1}$  corresponden al estiramiento de  $P = O$  y  $P - O - C$  respectivamente, sin embargo, se aprecia que contiene algunos otros componentes, puesto que se muestran varios picos de absorción que no corresponden a IP6, lo cual es de esperar, ya que proviene de un extracto. Al tratarse de una fruta, así como la textura pegajosa que posee el liofilizado del extracto se consideró pudiese tratarse de fructosa, por lo que se hizo la comparación entre estos dos mediante IR.

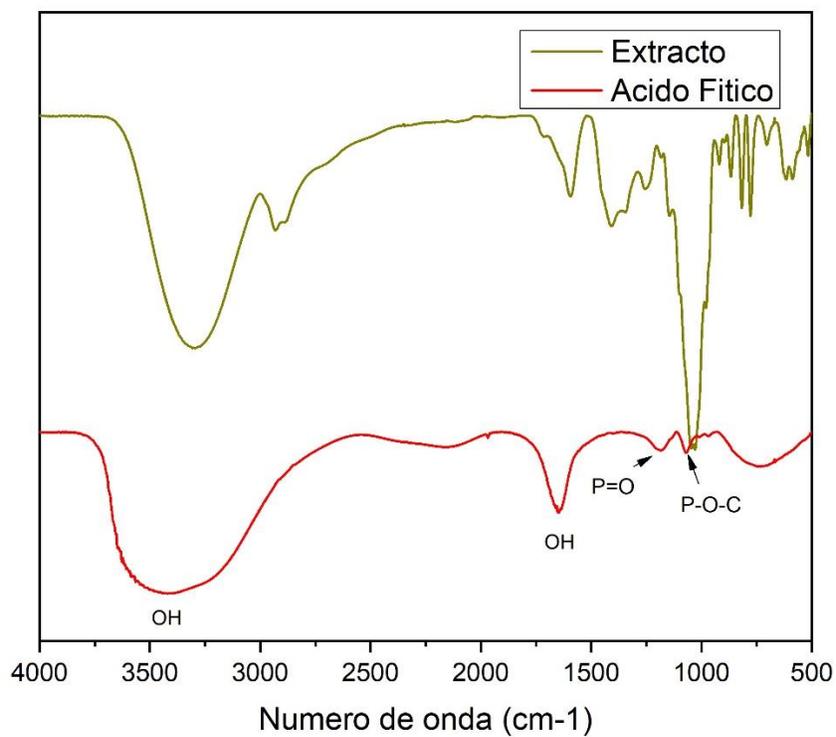


Figura 39 Comparación de espectro IR del ácido fítico y el extracto.

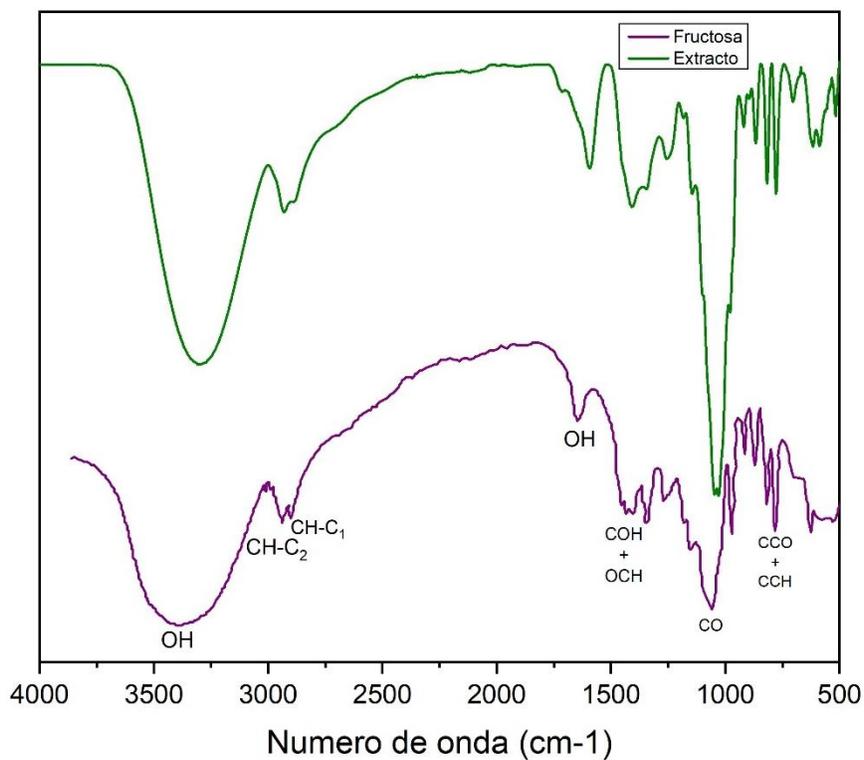
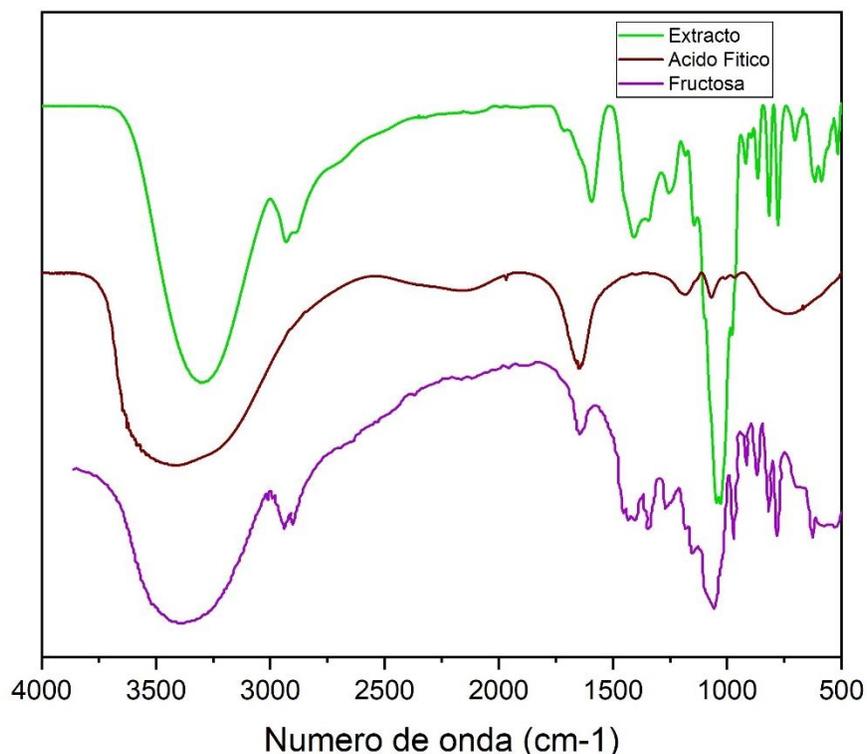


Figura 40 Comparación de espectro IR del extracto y fructosa

El espectro IR de la fructosa se obtuvo a partir de la digitalización del espectro obtenido por Ibrahim y colaboradores [6] mediante el software WebPlotDigitizer [7].

En la **Figura 40** se muestra la comparación del espectro digitalizado y el extracto de *Vitex mollis*. Se observa la similitud en varios de los picos de absorción como lo son en  $3393\text{ cm}^{-1}$  y  $1637\text{ cm}^{-1}$  asociados a la vibración del  $OH$ , en  $2933\text{ cm}^{-1}$  y  $2899\text{ cm}^{-1}$  para  $CH - C_2$  y  $CH - C_1$  respectivamente, la combinación de banda de  $COH + OCH$  en  $1402\text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones de  $CO$  en  $1057$  y la combinación de banda de  $CCO + CCH$  en  $780\text{ cm}^{-1}$  [6]

En la **Figura 41** se muestra la comparación entre el extracto de *Vitex mollis* con la fructosa y ácido fólico.



*Figura 41 Espectro IR del extracto de *Vitex mollis*, Acido Fólico (IP6) y Fructos0061*

En la **Figura 42** se muestra el espectro IR entre las NPs y el extracto, observando que mantiene similitudes entre ambas.

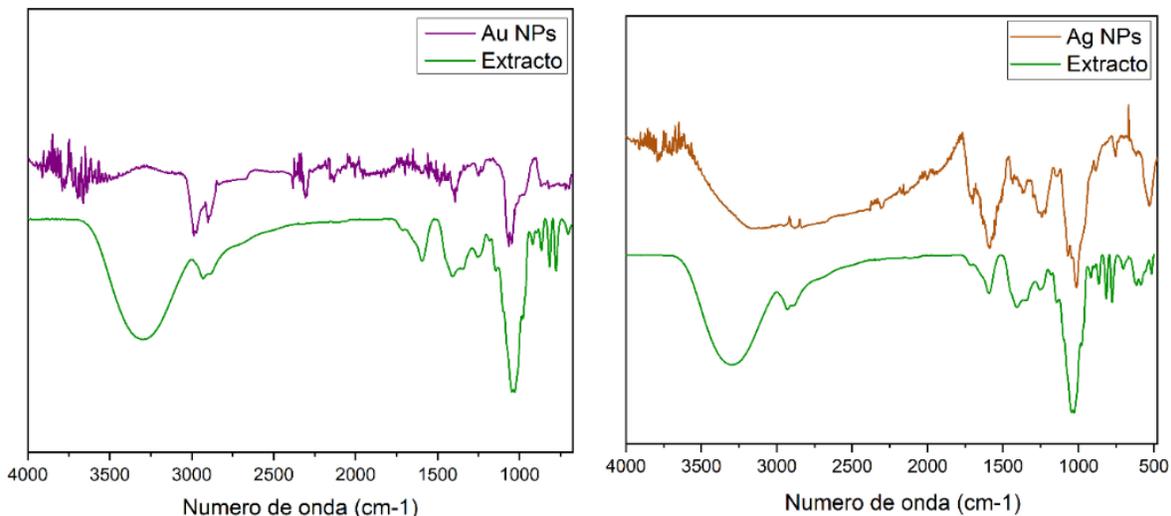


Figura 42 Comparación entre nanopartículas y extracto.

Es notorio que la banda de los  $OH$  en  $3250\text{ cm}^{-1}$  ha desaparecido ya que se las NPs se midieron en polvo, en cambio, si bien el extracto es liofilizado, aparte de ser hidrofílico, tomando en cuenta la textura es claro la presencia de agua en él. Fuera de esto se aprecian los picos característicos del extracto, así como del IP6 antes mencionados.

#### 4.5 DLS

El equipo DLS se utilizó para tener otra medición del tamaño de NPs, el equipo realiza varias mediciones y por último promedia, en caso de que se haya tenido variación amplia en las mediciones el equipo muestra un mensaje de que la medición no es confiable.

Se configuró para que el equipo realizara 5 experimentos con 15 repeticiones cada uno, dando un total de 75 mediciones por muestra. La **Figura 43**, muestra los resultados para los tamaños de las NPs.

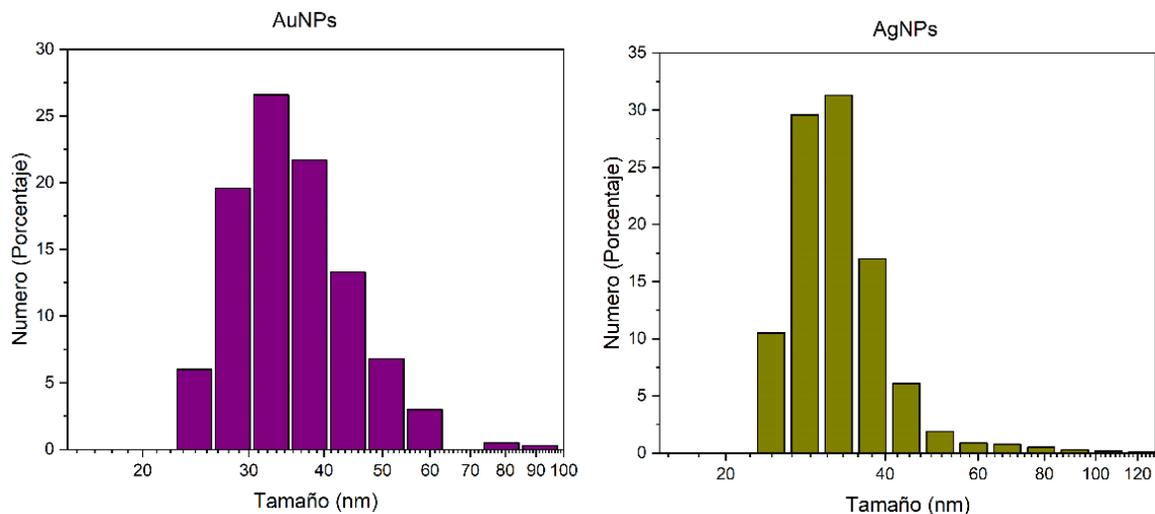


Figura 43 Distribución de tamaños pesados por número para AuNPs y AgNPs respectivamente.

La distribución de tamaños por DLS se realizó pesado por número, obteniendo tamaños de 32.7 nm y 50.7 nm para AuNPs y AgNPs respectivamente.

Estos resultados difieren a lo observado por STEM, esto se puede deber a las consideraciones que se toman en DLS explicadas en la sección 2.4.2.

#### 4.6 Potencial Zeta

El potencial zeta nos proporciona una medida de la estabilidad de un coloide, tomando como valor estándar de estabilidad un valor de potencial zeta de  $\pm 30 mV$  [8]. La Figura 44 muestra los resultados de la medición del potencial zeta realizados por el equipo.

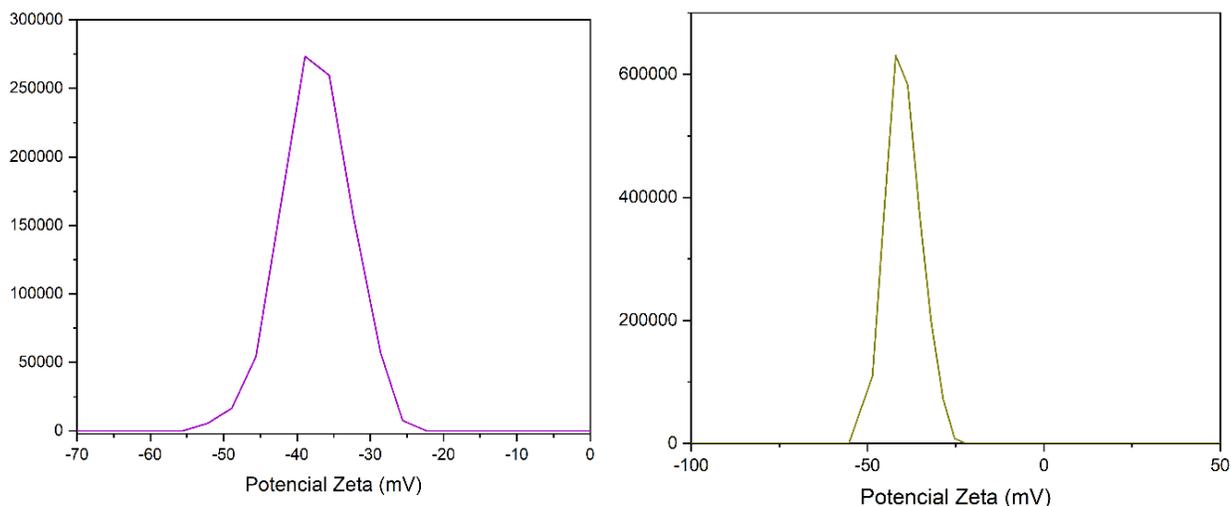


Figura 44 Gráfica de Potencial Zeta para AuNPs y AgNPs respectivamente.

Las gráficas están construidas por potencial zeta vs cuentas. Se obtuvo un promedio de  $-37.25 \pm 4.67mV$  para las AuNPs y  $-40.3 \pm 6.60mV$  para AgNPs de lo que se infiere que ambas son estables.

#### 4.7 Difracción de Rayo X

La caracterización de la estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados se efectuó en difractómetro de monocristal Bruker D8 QUEST a temperatura ambiente.

Los difractogramas obtenidos para AuNPs y AgNPs presentan picos de difracción ubicados en posiciones muy parecidas debido a que las estructuras cristalinas de estos metales presentan una celda unitaria tipo FCC (*face center cube*) donde las distancias interplanares son muy parecidas entre sí, por ejemplo las distancias para los planos (111) son  $2.39485 \text{ \AA}$  y  $2.38792 \text{ \AA}$  para Ag y Au, respectivamente, lo que equivale a una diferencia porcentual del 0.289%.

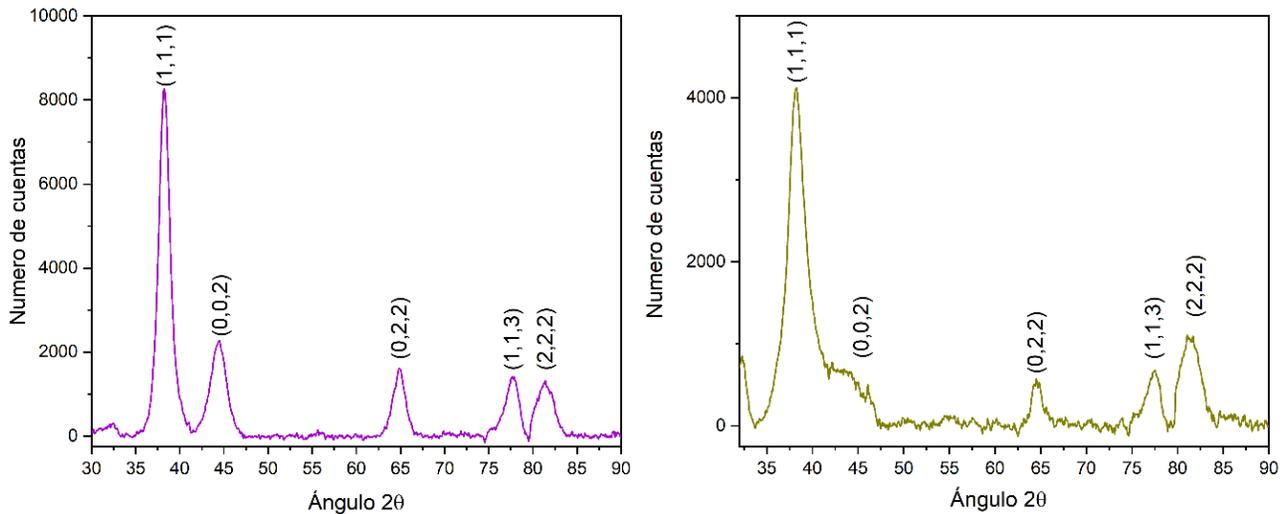


Figura 45 Patrón de difracción de Rayos X para AuNPs y AgNPs respectivamente.

Tomando solo en cuenta en ambos casos el pico asociado a la familia de planos (1,1,1) es posible conocer el tamaño de la cristalita con la ecuación Scherrer.

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

Para esto se utilizó el programa OriginLab, con el cual se ajustó una curva gaussiana de donde se extrajo el ancho medio del pico principal, así como su posición.

Los valores de la **Tabla 3** se obtuvieron utilizando la ecuación de Scherrer con los valores de  $k = 0.9$  [9] y  $\lambda = 1.544 \text{ \AA}$ . Debe tomarse a consideración que las NPs no son monodispersas y que la morfología de estas no es solo esférica. Otros factores como las imperfecciones de la red cristalina afectan la dispersión de rayos x, lo que se refleja en el ancho de banda, así como la posición del pico principal.

Tabla 3 Ajustes de Gaussiana en pico principal de difracción de rayos X y tamaño de cristalita.

Nanopartícula	Ancho (Rad)	$\theta$	Tamaño (nm)
AuNPs	0.025896846	19.12	5.68
AgNPs	0.040413796	19.16	3.64

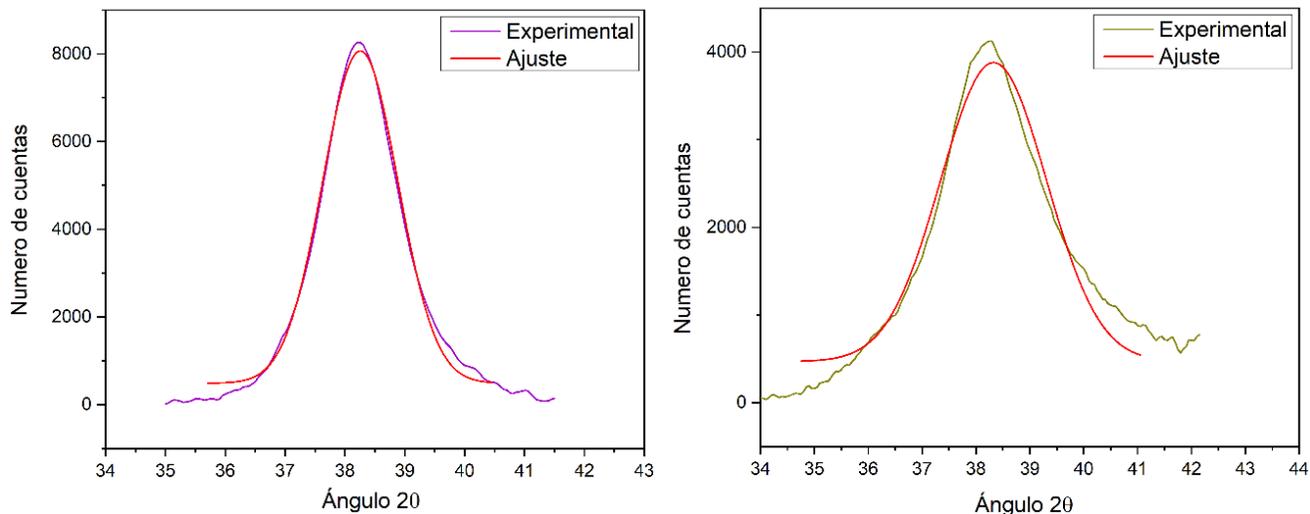


Figura 46 Ajuste de Gaussiana en pico principal de difracción para AuNPs y AgNPs respectivamente.

#### 4.8 Absorción atómica

Debido a que el peso de las NPs está conformado por el peso del metal y una cubierta de extracto, fue necesario utilizar esta técnica para conocer la concentración real de metal.

Para llevar a cabo la medición de las muestras, es necesario llevar a cabo una digestión acida, la cual eliminara la cubierta de extracto y pasara a iones las NPs.

La digestión se realizó en un vaso de precipitados de 50 mL en el cual se colocó 2 mL de NPs a una concentración de 200 µg/mL. Se agregaron 2.5 mL de ácido nítrico y 7.5 mL de ácido clorhídrico. El vaso se calentó a 90°C hasta reducir el volumen a 1 mL. Se agregó 20 mL de agua desionizada al vaso, el cual paso a calentarse a 90°C por 20 min. La muestra se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y completando el volumen con agua desionizada.

En la **Tabla 4** se presentan el porcentaje del peso debido al metal en las NPs

Tabla 4 Porcentaje de material metálico en AuNPs y AgNPs.

Nanopartículas	Porcentaje del metal
AuNPs	28.73%
AgNPs	22.125%

#### 4.9 MTT

El reactivo se utilizó a una concentración de 12 mM solubilizado en PBS. Se colocó 10  $\mu\text{L}$  por pozo en placas de 96 pozos.

La **Figura 47** se muestran los resultados del experimento, donde se observa que no existe un efecto adverso en las células HUVEC por parte del ácido fítico, extracto y el vehículo, el cual se conforma por agua ultra pura adicionado con 5% de DMSO.

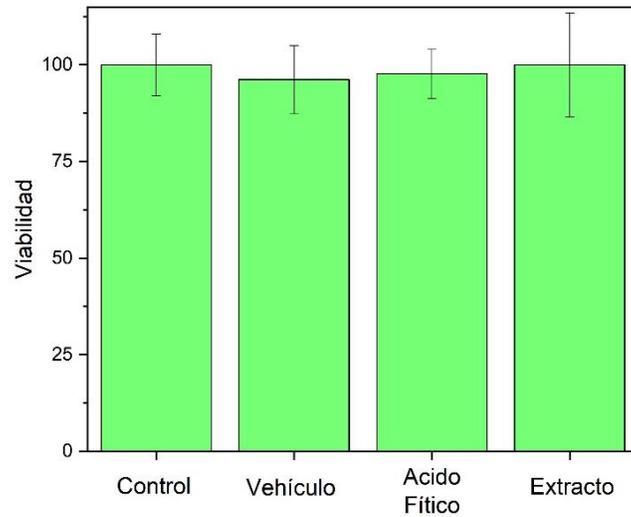


Figura 47 Controles de ensayos de viabilidad.

Por otra parte, en la **Figura 48** se tiene los resultados de viabilidad para diferentes concentraciones de AuNPs y AgNPs.

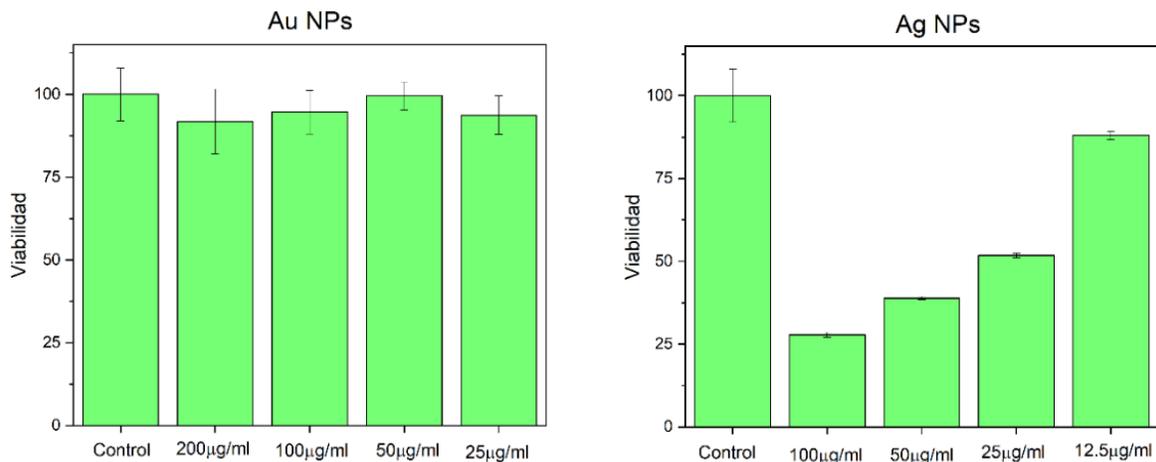


Figura 48 Ensayos de viabilidad para AuNPs y AgNPs

Las AuNPs no presentan toxicidad aun a la concentración de  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Por otra parte, las AgNPs presentan ser toxicas, inclusive a la concentración de  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  siendo esta la más baja en AuNPs.

La dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) para las AgNPs se encuentra entre la concentración de  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  y  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.10 ROS

Se utilizó el reactivo 2', 7'-Diclorohidrofluoresceína diacetato para mostrar la producción de radicales libres de oxígeno en las células debido a las NPs. Estos tienden llevar a estado apoptótico las células.

En la **Figura 49** a y b muestran las células control, las cuales no presentan fluorescencia por ROS. Los paneles c y d son células tratadas con AuNPs, en la cuales se observa la producción de ROS. Las células en presencia de AgNPs se muestran en e y f observando la presencia de ROS. Pese a que ambas presentan producción de radicales libres de oxígeno, por el ensayo de MTT se observó que las AuNPs presentan no ser toxicas.

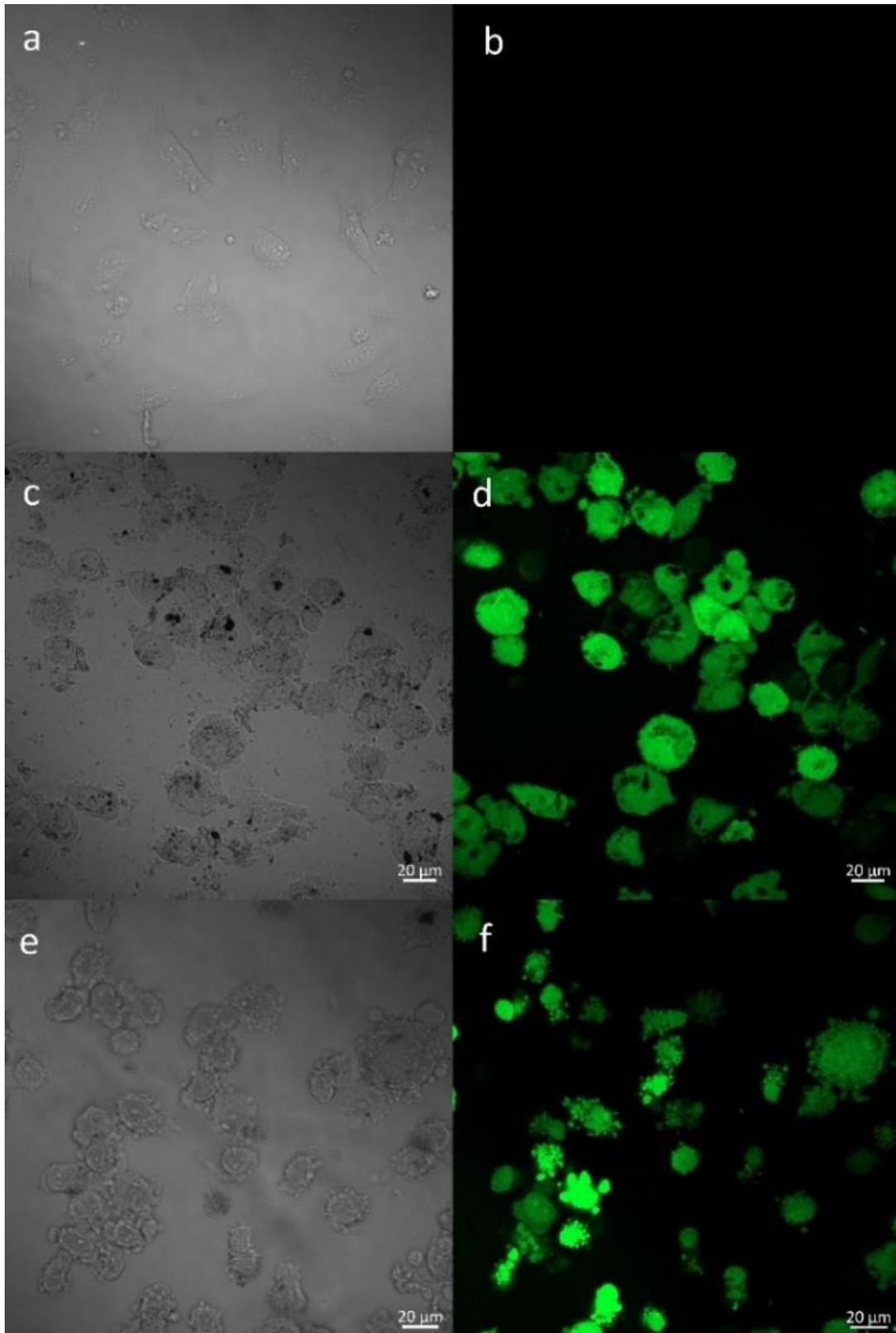
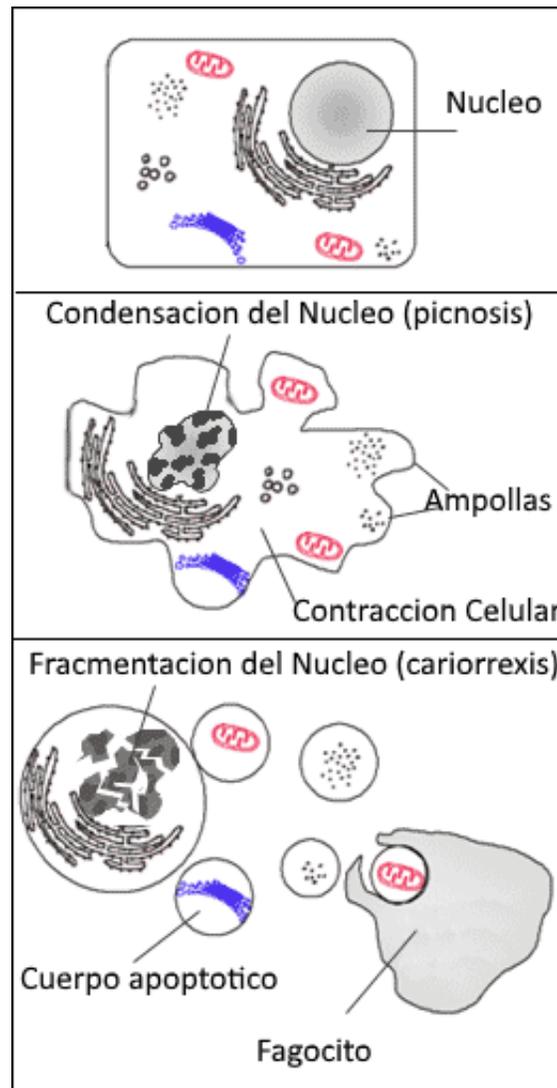
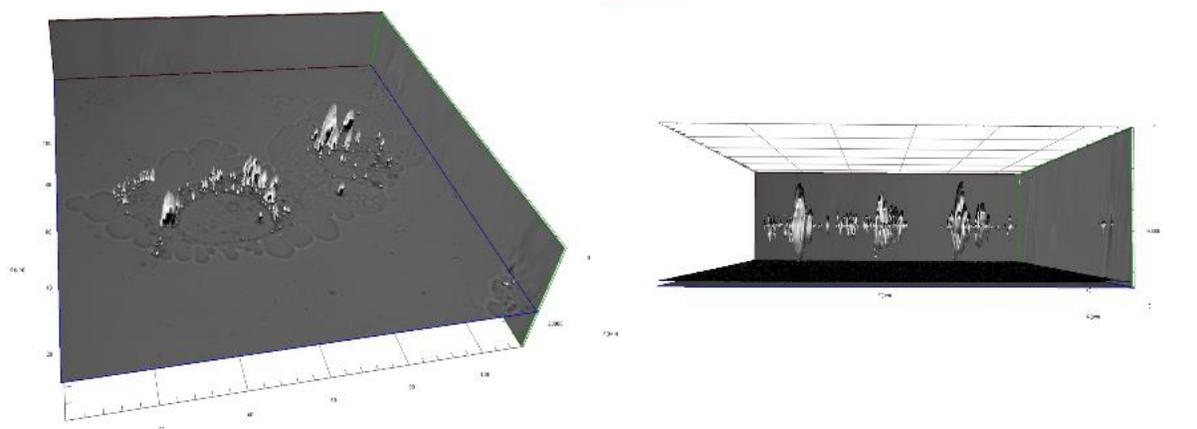
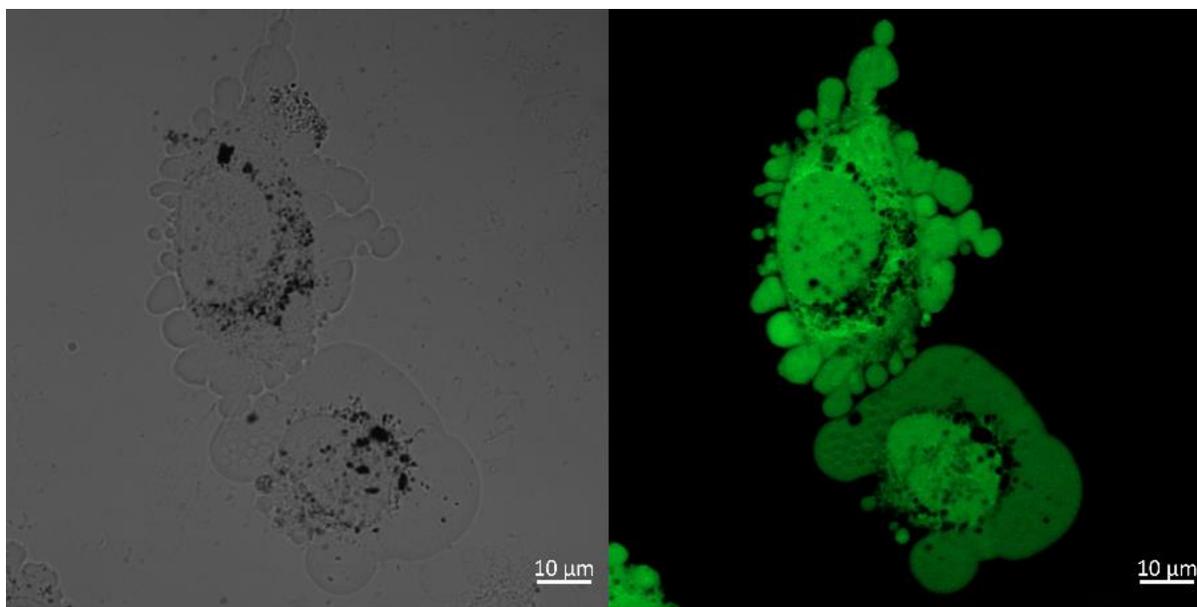


Figura 49 Especies reactivas de oxígeno a 24 horas a) y b) Control de células; c) y d) Células en presencia de AuNPs a 200  $\mu\text{g/ml}$ ; e) y f) Células en presencia de AgNPs a 12.5  $\mu\text{g/ml}$ .

Se observa una diferencia en la morfología de las células presentes en d y f. En f las células presentan el efecto de burbujeo (bubbling), característico del proceso apoptótico [10] (**Figura 50**). El efecto de burbujeo no es exclusivo de la apoptosis, puesto que las células la utilizan para la eliminación de metabolitos tóxicos.



*Figura 50 Bubbling en apoptosis*



*Figura 51 Célula HUVEC en presencia de AuNPs a 200 µg/ml con producción de ROS*

En la **Figura 51** se muestran dos células en proceso de apoptosis, mostrando un claro ejemplo de bubbling debido al efecto de las NPs de oro. Es posible observar puntos negros alrededor del núcleo de la célula a lo que suponemos sean las NPs aglomeradas, sin embargo, pese a que se trata de una imagen 2D no es posible distinguir si están dentro o por fuera de la célula por lo que con ayuda del microscopio confocal se hizo cortes en el eje Z de modo que se pudiera observar si efectivamente se encontraban dentro de la célula, a lo que resulto ser así, tal como se muestra en la figura anterior.

#### 4.11 Ralladura

Dado los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad, se puede discernir si los resultados de este ensayo se deben a un efecto de las NPs sobre la migración celular o el efecto se debe a la muerte de estas, como lo es el caso de las AgNPs.

Basados en los resultados de las pruebas de viabilidad, donde se obtuvo que las AgNPs resultaron citotóxicas en la línea celular HUVEC ( $DL_{50} \approx 25 \mu g/mL$ ), se estableció el rango de concentraciones de AgNPs para el ensayo de ralladura entre  $12.5 \frac{\mu g}{mL} - 50 \frac{\mu g}{mL}$ , mientras que para las AuNPs (que no presentan efectos citotóxicos en la línea celular HUVEC) el rango en el ensayo de ralladura se estableció entre  $25 \frac{\mu g}{mL} - 200 \frac{\mu g}{mL}$ . El rango de concentraciones empleados en el ensayo de ralladura para el caso del extracto de *Vitex mollis* se fijó entre  $17.5 \frac{\mu g}{mL} - 140 \frac{\mu g}{mL}$  teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas de absorción atómica que arrojaron un contenido cercano al 70% correspondiente al extracto en los productos finales de NPs. Finalmente, las concentraciones empleadas de IP6 en el ensayo de ralladura se establecieron entre  $4 \frac{\mu g}{mL} - 16 \frac{\mu g}{mL}$  tomando como referencia el trabajo publicado por Montiel y colaboradores [11] quienes reportaron un contenido de 8% en masa de este compuesto en los frutos de *Vitex mollis*.

En la **Figura 52** se muestran algunas de las imágenes correspondientes a los ensayos de ralladura obtenidas en microscopio invertido Leica (modelo DM IL LED), empleando un objetivo 4x. Las imágenes en a y b corresponden al control a 0 y 24 h; c y d corresponden al IP6 a  $16 \mu g/mL$ , e y f el extracto a  $140 \mu g/mL$ , g y h AuNPs a  $200 \mu g/mL$  y por último i y j AgNPs a  $25 \mu g/mL$

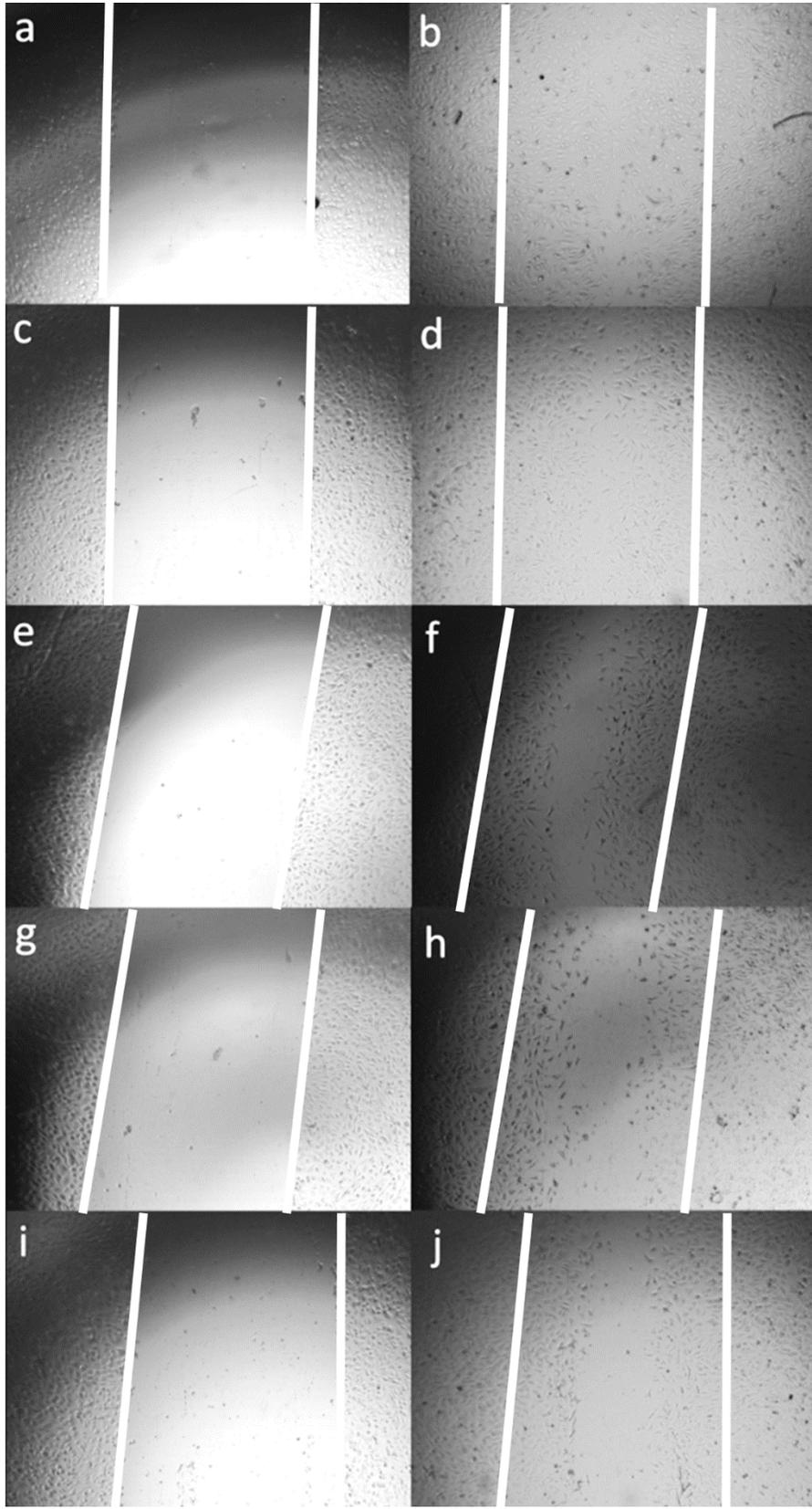
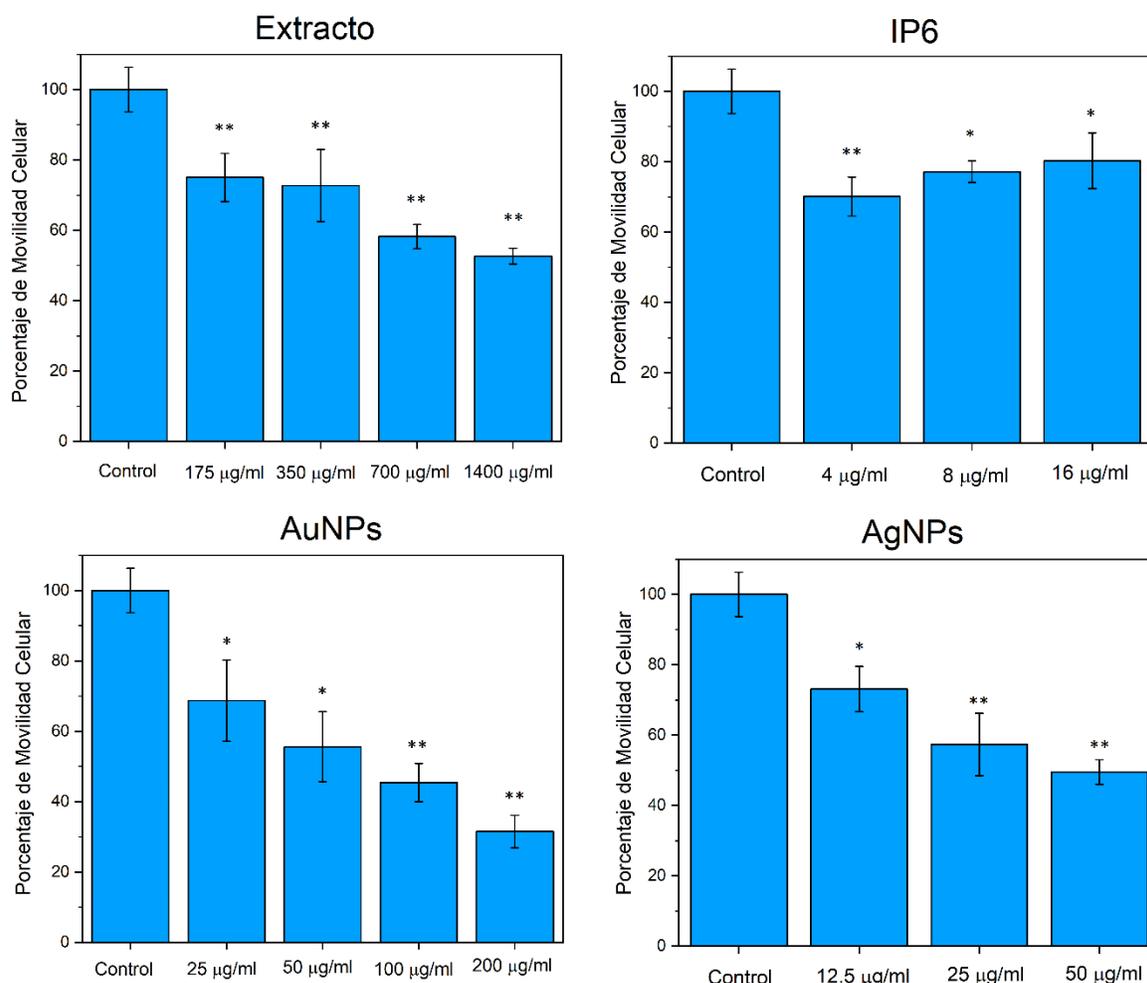


Figura 52 Ensayos de ralladura en células HUVEC

Se utilizo el software *Image J* para realizar el conteo de células. Los datos se procesaron y graficados, tal como se muestra en la **Figura 53**.



*Figura 53* Conteo de células en ensayo de ralladura

En la **Figura 53** se muestra el efecto de inhibición en la migración celular por parte del extracto, el cual aumenta conforme se incrementa la concentración de extracto. Caso contrario se observa para el IP6 el cual conforme aumenta la concentración incrementa la migración de las células. El efecto apreciable el efecto que tienen las AuNPs sobre la migración celular, puesto que aun a la concentración más baja de 25  $\mu\text{g/mL}$  se observa un efecto inhibitorio cercano a 35%; este efecto incrementa conforme se aumenta la concentración llegando a un aproximado 65% de inhibición para la concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Las AgNPs presenta de igual manera un

efecto inhibitorio aun en concentraciones bajas, sin embargo, comparando con la **Figura 48** se puede asociar este efecto a la muerte de las células.

## Discusión

Priyabrata y colaboradores mostraron el efecto de NPs de oro en células endoteliales, observando tanto proliferación como migración celular [12]. Las NPs sintetizadas en este trabajo mediante síntesis química tuvieron un tamaño de 5 nm. La concentración utilizada por Priyabrata y colaboradores fue de 670 nM de oro, lo que equivale a  $514 \frac{\mu g}{ml}$ . Observaron que las AuNPs sintetizadas resultaron no ser tóxicas en lo absoluto aun en concentraciones elevadas. En los ensayos de migración obtuvieron un efecto de inhibición del 80% con la concentración antes mencionada. Haciendo una comparación con la concentración más elevada trabajada en esta tesis, siendo de  $200 \frac{\mu g}{mL}$  de compuesto, que equivale a  $57.46 \frac{\mu g}{mL}$  de oro, siendo aproximadamente una décima parte de lo utilizado por Priyabrata. Pese a esto se obtuvo un porcentaje de inhibición del 67% lo que muestra tener una mayor eficiencia en la inhibición de la migración celular.

Sangiliyandi y colaboradores presentaron el efecto de AgNPs en células endoteliales, evaluando el efecto anti-angiogénico [13]. Ellos utilizaron NPs sintetizadas por *Bacillus licheniformis* de un tamaño promedio de 50 nm a una concentración de 500 nM de plata lo que equivale a  $208.081 \frac{mg}{mL}$ . Los ensayos de viabilidad mostraron que a esta concentración obtuvieron la  $DL_{50}$  es decir, la muerte de la mitad de la población de células. Comparando con las AgNPs sintetizadas con el extracto de *Vitex mollis*, se obtuvo la  $DL_{50}$  a una concentración de compuesto aproximado de  $25 \frac{\mu g}{mL}$  lo que equivale a  $5.53 \frac{\mu g}{mL}$  de plata, resultando ser mucho más tóxicas en comparación a las utilizadas por Sangiliyandi. Los ensayos de migración realizados por Sangiliyandi y colaboradores no cuantificaron el efecto de las NPs, simplemente mostraron imágenes del efecto de estas sobre las células. Dado que trabajan con concentraciones tan elevadas de NPs provocando una muerte de 50% de la población, no se puede discernir si es un efecto real de las partículas sobre la migración o simplemente se trata de la muerte provocada por las AgNPs.

Rho y colaboradores explicaron como las AuNPs tienen un efecto antiangiogénico [1]. Durante la angiogénesis la fosforilación de la quinasa señalizadora-reguladora extracelular (ERK), la proteína quinasa B (Akt) y la quinasa focal de adhesión (FAK) acciona la proliferación, sobrevivencia y migración en las células respectivamente, por lo que Rho y colaboradores observaron como las AuNPs inhiben la fosforilación de estas proteínas, proceso que puede estar relacionado en la inhibición de migración celular por parte de las AuNPs sintetizadas por medio del extracto de *Vitex mollis*. Por otra parte, Rho y su grupo mostraron que las AuNPs son capaces de inducir reorganización nanoestructural en el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) por lo que se ve afectada la señalización de la angiogénesis [14].

## Referencias.

- [1] Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Rsc Advances*, 4(8), 3974-3983.
- [2] Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 318.
- [3] Carli, L. D., Schnitzler, E., Ionashiro, M., Szpoganicz, B., & Rosso, N. D. (2009). Equilibrium, thermoanalytical and spectroscopic studies to characterize phytic acid complexes with Mn (II) and Co (II). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(8), 1515-1522.
- [4] Daneluti, A. L. M., & Matos, J. D. R. (2013). Study of thermal behavior of phytic acid. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 275-283.
- [5] Barahuie, F., Dorniani, D., Saifullah, B., Gothai, S., Hussein, M. Z., Pandurangan, A. K., ... & Norhaizan, M. E. (2017). Sustained release of anticancer agent phytic acid from its chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug-delivery system. *International journal of nanomedicine*, 12, 2361.

[6] Ibrahim, M., Alaam, M., El-Haes, H., Jalbout, A. F., & Leon, A. D. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Ecletica quimica*, 31(3), 15-21.

[7] <https://automeris.io/WebPlotDigitizer/>

[8] Zeta Potential an Introduction in 30 Minutes, Malver Instruments

[9] Monshi, A., Foroughi, M. R., & Monshi, M. R. (2012). Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2(3), 154-160.

[10] Chen, S. J., Lin, P. W., Lin, H. P., Huang, S. S., Lai, F. J., Sheu, H. M., ... & Chang, N. S. (2015). UV irradiation/cold shock-mediated apoptosis is switched to bubbling cell death at low temperatures. *Oncotarget*, 6(10), 8007.

[11] Montiel-Herrera, M., Camacho-Hernández, I. L., Ríos-Morgan, A., & Delgado-Vargas, F. (2004). Partial physicochemical and nutritional characterization of the fruit of *Vitex mollis* (Verbenaceae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(2), 205-215.

[12] Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Wang, P., Wang, L., Basu, S., Nagy, J. A., ... & Soker, S. (2005). Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 11(9), 3530-3534.

[13] Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153.

[14] Roh, Y. J., Rho, C. R., Cho, W. K., & Kang, S. (2016). The antiangiogenic effects of gold nanoparticles on experimental choroidal neovascularization in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(15), 6561-6567.

## Capítulo 5

### Conclusiones y perspectivas.

El extracto obtenido del fruto de la planta *Vitex mollis* resulto ser un agente reductor para la síntesis de AuNPs y AgNPs, estandarizando su síntesis tal como se muestra en el apéndice 3. Utilizando el espectrómetro Uv-Visible se pudo mostrar que aun tras los procesos de limpieza efectuados, se preserva la presencia del extracto en las NPs por lo que sugiere juegan un papel en la estabilidad de las nanopartículas, las cuales presentan un potencial zeta neto mayor a  $30\text{ mV}$ . La microscopia electrónica de barrido corroboró lo obtenido por la espectroscopia Uv-Visible, ya que fue posible observar una capa envolvente sobre las NPs, a la que se le asoció ser el extracto.

Mediante el uso del espectrómetro IR fue posible dilucidar la presencia de al menos fructosa e inositol hexafosfato en el extracto. Comparando estos espectros con los obtenidos para las AuNPs y AgNPs, muestra la presencia de al menos estos dos compuestos en las NPs.

Las AuNPs sintetizadas con el extracto obtuvieron un diámetro promedio de  $19.7 \pm 5.7\text{ nm}$ . Mientras que las AgNPs tienen un diámetro promedio de  $10.4 \pm 7.3\text{ nm}$ .

Los resultados de las pruebas de viabilidad sobre la línea celular HUVECs mostraron que las AuNPs no son tóxicas aun en concentraciones elevadas, sin embargo, las AgNPs resultaron ser altamente tóxicas en todas las concentraciones.

Los ensayos de ralladura mostraron resultados de inhibición tanto en el extracto como las NPs sintetizadas con él. Dada la toxicidad presentada por las AgNPs, se asocia este efecto inhibitorio en la migración celular a la muerte de las células. Por otra parte, las AuNPs resultaron tener el mayor efecto de inhibición sobre las células, sin afectar la viabilidad de estas.

Será necesario llevar a cabo pruebas biológicas *in vitro* realizando evaluación de angiogénesis en matrigel. De igual manera, ensayos *in vivo* empleando modelos de embriones de pollos u orejas de ratón estimulados con VEGF para promover la

angiogénesis, enfocando exclusivamente al estudio de los mecanismos biológicos mediados por las AuNPs, ya que resultaron no tóxicos.

## Apéndices

### Apéndice 1: Metodología de obtención de extracto

Para la extracción del fruto de la planta *Vitex mollis* (uvalama) se utilizó una concentración de 200 g/L de solución 70/30 en volumen de etanol-agua respectivamente. El fruto fue obtenido de árboles dentro de la misma universidad de Sonora; tras su recolección fueron lavadas e introducidas a un horno a 50°C durante 48 horas con el fin de deshidratarlas.

- Se pesó 200 g de uvalama deshidratada y agregó a un contenedor de vidrio color ámbar para proteger de la luz.
- Con la ayuda de una probeta, se midió 700 mL de etanol y depositó en el frasco, en seguida se midió 300 ml de agua ultra pura y agregó al frasco.
- Se guardó el frasco en un lugar sin luz y a temperatura ambiente (25°C) durante un mes.
- Pasado el tiempo se filtró la solución de la extracción con ayuda de filtros de papel Whatman 40 (8µm).
- Se almacenó el filtrado en recipientes estériles para evitar contaminación.
- Se rotovaporó el extracto filtrado a 40°C hasta eliminar gran parte del solvente, especialmente el alcohol.
- Se recuperó el extracto y colocó en envases de vidrio color ámbar.
- Se liofilizó el extracto hasta eliminar el agua en su totalidad (aproximadamente 24 h).
- Se guardó el extracto liofilizado protegiendo de la luz y la humedad.

### Apéndice 2: Preparación de precursores metálicos.

Solución de ácido tetracloroaurico a 0.01 M

- Se pesó 0.3398 g de  $HAuCl_4$  y colocó en un matraz aforado de 100 mL.
- Se completó el volumen con agua ultra pura.
- Se colocó un imán de agitación y cubrió el matraz con aluminio.
- Se colocó en placa agitadora a 700 rpm durante una hora a temperatura ambiente.

- Se transfirió la solución en frasco de vidrio estéril color ámbar para su almacenamiento.

#### Solución de nitrato de plata a 0.1 M

- Se pesó 1.6987 g de  $AgNO_3$  y colocó en un matraz aforado de 100 mL.
- Se completó el volumen con agua ultra pura.
- Se colocó un imán de agitación y cubrió el matraz con aluminio.
- Se colocó en placa agitadora a 700 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
- Se transfirió la solución en frasco de vidrio estéril color ámbar para su almacenamiento.

#### Apéndice 3: síntesis de NPs

##### AuNPs (100 mL)

- Se preparó un stock de 50 mL de extracto, disolviendo 0.5 g de extracto en 50 mL de solvente 50/50 en volumen de alcohol y agua ultrapura.
- Se preparó 85 mL de solvente 50/50 en volumen de alcohol y agua ultra pura en un recipiente con capacidad mínima de 100 mL.
- Se agregó a los 85 mL de solvente 10 mL del extracto en solución antes preparado.
- Se agregó 5 mL de la solución 0.01 M de  $HAuCl_4$  preparada en el apéndice 2.
- Para ayudar a la síntesis de las NPs se colocó el frasco en presencia de luz solar por al menos 1 h.

##### AgNPs (100 mL)

- Se preparó un stock de 50 mL de extracto, disolviendo 0.5 g de extracto en 50 mL de solvente 50/50 en volumen de alcohol y agua ultrapura.
- Se preparó 85 mL de solvente 50/50 en volumen de alcohol y agua ultra pura en un recipiente con capacidad mínima de 100 mL.

- Se agregó a los 85 *mL* de solvente 10 *mL* del extracto en solución antes preparado.
- Se agregó 5 *mL* de la solución 0.1 *M* de  $AgNO_3$  preparada en el apéndice 2.
- Para ayudar a la síntesis de las NPs se colocó el frasco en presencia de luz solar por al menos 1 h.

#### Apéndice 4: Limpieza de NPs.

- Se transfirió las NPs a limpiar a tubos falcon de 50 *mL* llevándolos a un máximo de 30 *mL* para evitar fuga.
- Se introdujo a la centrifuga a 1,400 rpm durante 1 h.
- Pasado el tiempo se retiró con cuidado el sobrenadante de las partículas, evitando tirar el precipitado.
- Se agregó 10 *mL* de solvente 50/50 en volumen de alcohol-agua.
- Se sonicó la solución hasta resuspender todas las NPs.
- Se repitió los últimos 4 pasos 2 veces más, solo que la última se agregó solo 10 *mL* de alcohol puro.
- Se retiró el sobrenadante evitando tirar las NPs.
- Se colocó los tubos falcon en un horno de secado por 24 horas a 45°C.
- Se recuperó y pesó el sólido para su almacenamiento.