



Universidad de Sonora

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

**Síntesis verde de nanopartículas bimetálicas
núcleo@coraza Au@Ag empleando extractos de
Rumex hymenosepalus: efecto citotóxico sobre células
de cáncer cérvico uterino (HeLa)**

Tesis

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias (Nanotecnología)

P R E S E N T A

Jesús Mauro Adolfo Villalobos Noriega

Hermosillo, Sonora, México

Agosto 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 la Universidad de Texas en San Antonio (UTSA) y al Dr. José Yacamán por el acceso y uso de los microscopios electrónicos de TEM y STEM.

-Al Laboratorio de Biomateriales por el apoyo en el uso del espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 45 y microscopio confocal de barrido laser Zeiss LSM800.

-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 se extienden agradecimientos 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.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Lista de figuras | IV |
| Lista de tablas | VI |
| Resumen | 1 |
| Introducción | 2 |
| Justificación..... | 4 |
| Hipótesis | 5 |
| Objetivo general..... | 5 |
| Objetivos específicos..... | 5 |
| Referencias | 6 |
| Capítulo 1: Antecedentes | 8 |
| 1.1 Definición de nanotecnología..... | 8 |
| 1.2 Nanopartículas Metálicas | 9 |
| 1.3 Síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas de nanopartículas metálicas .. | 10 |
| 1.4 Nanopartículas núcleo@coraza | 14 |
| 1.5 Biosíntesis de nanopartículas núcleo@coraza..... | 15 |
| 1.6 Síntesis de nanopartículas núcleo@coraza con extractos de plantas | 16 |
| 1.7 Aplicaciones de nanopartículas núcleo@coraza | 19 |
| 1.8 Descripción y propiedades de <i>Rumex hymenosepalus</i> | 20 |
| 1.9 Nanopartículas Au y bimetálicas Au-Ag en células HeLa | 21 |
| Referencias | 23 |
| Capítulo 2: Técnicas Experimentales | 31 |
| 2.1 Radiación electromagnética..... | 31 |
| 2.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) | 34 |
| 2.3 Espectroscopía infrarroja..... | 40 |
| 2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 51 |
| 2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 54 |
| 2.6 Difracción de rayos X (DRX)..... | 61 |
| 2.7 Microscopía confocal | 65 |
| Referencias | 67 |
| Capítulo 3: Resultados y discusión | 69 |

| | |
|--|------------|
| 3.1 Resultados de UV-Vis | 69 |
| 3.2 Resultados de espectroscopía IR | 74 |
| 3.3 Resultados de TEM | 75 |
| 3.4 Resultados de STEM y EDS..... | 80 |
| 3.5 Resultados de DRX | 89 |
| 3.6 Resultados de potencial Z..... | 94 |
| 3.7 Resultados de pruebas biológicas | 96 |
| Referencias | 108 |
| Capítulo 4: Conclusiones y perspectivas | 111 |
| Apéndices | 113 |
| Metodologías de síntesis de nanopartículas metálicas | 113 |
| Procedimientos de pruebas biológicas | 117 |

Lista de figuras

| Figura | Contenido | Página |
|--------|--|--------|
| 1.1.1 | Ubicación de la nanoescala | 8 |
| 1.3.1 | Catequinas del té verde | 12 |
| 1.3.2 | Reducción de iones plata por EGCG | 13 |
| 1.3.3 | Estabilización por EGCG | 14 |
| 1.4.1 | Variedades de nanopartículas núcleo@coraza | 15 |
| 1.6.1 | Trans-resveratrol glucosado | 21 |
| 2.1.1 | Tipos de ondas electromagnéticas y sus causas | 31 |
| 2.1.2 | Campos que componen a una onda electromagnética | 32 |
| 2.1.3 | Niveles de energía atómicos | 33 |
| 2.2.1 | Esquema energías y transiciones de moléculas orgánicas | 35 |
| 2.2.2 | Esquema LSPR | 37 |
| 2.2.3 | Esquema geometría de la ley de Beer - Lambert | 37 |
| 2.2.4 | Esquema espectrómetro UV – Vis doble haz | 39 |
| 2.2.5 | Ejemplo espectro UV – Vis | 40 |
| 2.3.1 | Ejemplo molécula activa en IR | 41 |
| 2.3.2 | Ejemplos de tipos de moléculas triatómicas | 43 |
| 2.3.3 | Tipos de vibraciones | 45 |
| 2.3.4 | Tipos de estiramientos | 45 |
| 2.3.5 | Tipos de flexiones | 46 |
| 2.3.6 | Esquema del interferómetro de Michelson | 48 |
| 2.4.1 | Interacciones electrones - muestra | 52 |
| 2.4.2 | Diagrama SEM | 54 |
| 2.5.1 | Diagrama TEM | 55 |
| 2.5.2 | Geometría HAADF | 59 |
| 2.5.3 | Nanopartícula Au@Ag vista en campo claro y HAADF | 60 |
| 2.6.1 | Celda unitaria cúbica centrada en las caras | 62 |
| 2.6.2 | Esquema de la ley de Bragg | 64 |
| 2.7.1 | Esquema del microscopio confocal | 66 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.1.1 | Curva de calibración de <i>Rh</i> liofilizado | 70 |
| 3.1.2 | Gráfica de la cinética d formación de nanopartículas Au | 71 |
| 3.1.3 | Gráfica del espectro UV – Vis de <i>Rh</i> | 72 |
| 3.1.4 | Espectros UV – Vis de todos los sistemas de nanopartículas | 73 |
| 3.2.1 | Espectro IR de <i>Rh</i> y nanopartículas monometálicas | 74 |
| 3.3.1 | Imagen TEM de sistemas Ag, Au y Au@Ag | 76 |
| 3.3.2 | Distribución de tamaños nanopartículas Au | 77 |
| 3.3.3 | Distribución de tamaños nanopartículas Ag | 78 |
| 3.3.4 | Distribución de tamaños de nanopartículas Au@Ag | 79 |
| 3.4.1 | Imágenes STEM y HAADF sistema Au@Ag | 80 |
| 3.4.2 | Imágenes STEM y cristalinidad del sistema Au | 81 |
| 3.4.3 | Imágenes STEM y cristalinidad del sistema Ag | 82 |
| 3.4.4 | Imágenes STEM y cristalinidad del sistema Au@Ag | 83 |
| 3.4.5 | Imágenes STEM – EDS sistema Au@Ag | 84 |
| 3.4.6 | Imágenes STEM – EDS sistema Au@Ag una partícula | 86 |
| 3.4.7 | Mapeo elemental STEM – EDS | 88 |
| 3.4.8 | STEM – EDS espectro y distribución sistema Au@Ag | 89 |
| 3.5.1 | Difractograma nanopartículas Au | 90 |
| 3.5.2 | Difractograma nanopartículas Ag | 91 |
| 3.5.3 | Difractograma nanopartículas Au@Ag | 92 |
| 3.5.4 | Comparación difractogramas | 93 |
| 3.6.1 | Gráfica potencial Z nanopartículas Au | 94 |
| 3.6.2 | Gráfica potencial Z nanopartículas Ag | 95 |
| 3.6.3 | Gráfica potencial Z nanopartículas Au@Ag | 96 |
| 3.7.1 | Histograma células HeLa + extracto <i>Rh</i> | 97 |
| 3.7.2 | Histograma células HeLa + nanopartículas Au | 98 |
| 3.7.3 | Histograma células HeLa + nanopartículas Ag | 99 |
| 3.7.4 | Histograma células HeLa + nanopartículas Au@Ag | 100 |
| 3.7.5 | Marcaje confocal control HeLa | 102 |
| 3.7.6 | Marcaje confocal HeLa + AuNps @ 1, 24 h | 104 |
| 3.7.7 | Marcaje confocal HeLa + AuNps @ 3, 6 y 12 h | 106 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.7.8 | Marcaje ROS control y HeLa + AuNps | 107 |
| 3.7.9 | Marcaje ROS HeLa + AgNps y HeLa + Au@Ag | 108 |

Lista de tablas

| Tabla | Contenido | Página |
|-------|--|--------|
| 1.3.1 | Nanopartículas monometálicas por síntesis de plantas | 11 |
| 1.5.1 | Nanopartículas bimetálicas Au – Ag por síntesis de plantas | 18 |
| 2.3.1 | Grados de libertad moléculas lineales y no lineales | 43 |
| 2.3.2 | Asignación de bandas IR a grupos aromáticos | 49 |
| 2.3.3 | Asignación de bandas IR a alcoholes y fenoles | 50 |
| 3.7.1 | Información del microscopio confocal y colorantes | 101 |
| 4.1.1 | Integración de resultados de las técnicas | 112 |

Resumen

En este trabajo abordamos la síntesis de nanopartículas monometálicas de oro y plata y bimetalicas de oro-plata empleando un extracto hidro-etanólico de la raíz de Rumex hymenosepalus como agente bioreductor. Las nanopartículas bimetalicas se sintetizan con estructura núcleo@coraza con el oro como núcleo recubierto con plata (Au@Ag) siguiendo un protocolo de síntesis secuencial donde primero se sintetizan las nanopartículas de oro y después de un proceso de limpieza para remover el extracto remanente se incorpora el precursor metálico de plata para formar la coraza. Las nanopartículas son caracterizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) con detector de Energías Dispersivas de Rayos X (EDS), Difracción de rayos X (DRX), Espectroscopía UV-VIS, Espectroscopía de Infrarrojo (IR) y potencial Z. Los resultados de TEM indican que las nanopartículas bimetalicas son principalmente cuasiesféricas con tamaños promedios de 35-40 nm, DRX indica que las nanopartículas pertenecen al sistema cristalino FCC con un tamaño de nanopartícula de 8.04 nm y STEM confirma la existencia de estructuras núcleo@coraza y tamaños de nanopartículas entre 1-10nm. Mediante UV-VIS se llevó a cabo la confirmación de la existencia de la banda de absorción características de las nanopartículas sintetizadas, mientras que IR confirmó la presencia de compuestos presentes en el extracto después del proceso de síntesis—lavado y mediante potencial Z se corroboró la estabilidad del sistema de nanopartículas en suspensión. El tratamiento a células HeLa con los materiales obtenidos a 24 horas no mostró citotoxicidad considerable, sin embargo, pruebas de marcaje celular indican la modificación de la forma y estructuras de soporte de las células, así como producción abundante de especies reactivas de oxígeno.

Introducción

En la actualidad los sistemas nanoparticulados de metales nobles se han implementado en diversos campos de la ciencia, entre ellos en la medicina, en la industria cosmética y alimenticia, entre otros. En la síntesis de nanopartículas recientemente se ha optado por vías que sean eco amigables, como lo es la síntesis verde. Este tipo de síntesis permite la producción de nanopartículas con un grado mayor de biocompatibilidad, a la vez que logra reducir el impacto ambiental causado, con el uso de reactivos menos agresivos. Gran parte de los trabajos desarrollados en la química verde se llevan a cabo utilizando compuestos extraídos de plantas, para la síntesis de partículas de oro, plata, paladio y platino [1, 2], incluso algunos de ellos se han utilizado para la síntesis de partículas bimetálicas [3, 4]. Las nanopartículas bimetálicas son de especial interés para los procesos de catálisis, ya que estas muestran respuestas catalíticas mayores que sus contrapartes monometálicas, esto debido al efecto sinérgico de los metales que constituyen a la partícula bimetálica [5]. De igual forma, se sabe que las propiedades ópticas de las nanopartículas bimetálicas de Au y Ag están fuertemente influenciadas por la morfología y tamaño de la partícula, así como de la relación molar entre los metales en el caso de aleaciones o bien de las relaciones de tamaño de núcleo-espesor de coraza en el caso de las partículas núcleo@coraza [6]. Por ejemplo, reportes recientes indican que la efectividad de las nanopartículas de aleaciones Au-Ag producidas por síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas tiene una respuesta microbicida mayor que las monometálicas sintetizadas con el mismo extracto [7].

En los últimos años el uso de nanopartículas de Au y Ag como agentes medicinales para aplicaciones teragnósticas en varias enfermedades como cáncer, diabetes, Parkinson, Alzheimer, SIDA entre otras ha sido ampliamente extendido debido a las propiedades ópticas y físico – químicas únicas de estos materiales [8].

El utilizar nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de cáncer ha sido un proceso largo donde se vuelve necesario estudiar las propiedades de los materiales, así como los efectos secundarios de estos para un tratamiento eficaz. Los nanomateriales metálicos han funcionado como acarreadores de fármacos, lo cual permite que el fármaco cargado entre y sea liberado con relativa facilidad, logrando así disminuir las concentraciones necesarias para los tratamientos. Sin embargo, aún es una prioridad dirigir estos sistemas para la internalización solo en células

con procesos de cáncer, como en el cáncer de mama y cérvico-uterino, mismos que se saben son causantes de miles de fatalidades al año.

En el presente proyecto se propone sintetizar nanopartículas monometálicas de oro y bimetálicas de oro y plata por medio de una síntesis de dos pasos (o secuencial). La síntesis se lleva a cabo en el esquema de la química sustentable por lo que empleamos como agente reductor extractos de raíz de la planta *Rumex hymenosepalus* (o cañagria) la cual contiene una gran cantidad de antioxidantes naturales. Resultados previos obtenidos con extractos de dicha planta muestran la viabilidad de utilizar los extractos como solución reductora en la cristalización de nanopartículas metálicas [9]. La idea de proponer este sistema bimetálico se basa en el hecho de la biocompatibilidad que presentan tanto el oro como la plata, así como el potencial uso que puedan darse a estos productos como antibióticos y/o en el tratamiento contra células cancerosas. Cabe señalar que no existen trabajos previos de biosíntesis de nanopartículas bimetálicas empleando extractos de *Rumex hymenosepalus*. Los nanomateriales sintetizados serán utilizados para evaluar la toxicidad en líneas celulares HeLa de cáncer cérvico uterino.

El trabajo se divide en cuatro capítulos. El primero es **Antecedentes**, el cual brinda el contexto necesario y a la vez sirve de apoyo a la justificación. Se inicia con la definición de nanociencia y nanotecnología hasta llegar al tema central de este trabajo: la síntesis de nanopartículas bimetálicas utilizando el extracto de *Rumex hymenosepalus*, así como el uso de estas como tratamientos para líneas celulares de cáncer.

El segundo capítulo lleva el nombre de **Técnicas Experimentales**, en el cual se describen los fundamentos fenomenológicos de las diferentes técnicas utilizadas en la caracterización de las nanopartículas: espectroscopía ultravioleta visible, espectroscopía infrarroja, microscopía electrónica de transmisión y sus derivados de alta resolución y de barrido, difracción de rayos X, potencial Z, y microscopía confocal.

El tercer capítulo es **Resultados**, en donde se presentan y discuten los resultados obtenidos con las técnicas mencionadas en el capítulo anterior.

Finalmente, en las **Conclusiones y Perspectivas**, se resumen los resultados obtenidos que permiten destacar las conclusiones más importantes, además se comentan algunas perspectivas del presente trabajo.

Justificación

En 2012 se diagnosticaron 527,600 casos de cáncer cérvico uterino en el mundo y 265,700 muertes. Es el segundo tipo de cáncer con más casos diagnosticados y el tercero en causas de muerte en la población femenina dentro de los países menos desarrollados [10]. En el 2015, en México el cáncer cérvico-uterino provocó la muerte de 4,009 pacientes ocupando el segundo lugar en la población femenil solo detrás del cáncer de mama que registra 6,273 defunciones [11]. En este contexto, la nanotecnología ha incursionado recientemente como una alternativa para combatir células cancerosas. Reportes de nanopartículas de oro y plata sintetizadas en el esquema de la “síntesis verde” muestran un efecto citotóxico sobre distintas líneas celulares de cáncer. A su vez, se conoce que varios de los compuestos bioreductores presentes en extractos de plantas presentan por sí mismos efectos citotóxicos sobre células cancerosas. Teniendo esto en cuenta, se propone la síntesis de nanopartículas mono y bimetálicas de oro y plata usando como agente bioreductor un extracto hidroetanólico de la raíz de la planta *Rumex hymenosepalus*, la cual es rica en agentes polifenólicos. Se buscará que las moléculas actúen como agentes reductores en la reacción óxido-reducción que da origen a las nanopartículas y que posteriormente actúen como agentes estabilizadores al adsorberse a la superficie de la partícula formada. Dicha presentación de la partícula como un material compuesto de partícula metálica-compuesto antioxidante tiene la capacidad de potenciar la respuesta citotóxica sobre células de cáncer HeLa.

Hipótesis

Nanopartículas monometálicas de oro y plata, así como la presentación bimetálica en forma de núcleo@coraza (Au@Ag) sintetizadas con extracto de raíz de *Rumex hymenosepalus* presentan efecto citotóxico en la línea celular de cáncer cérvico uterino (Hela).

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consta en sintetizar y caracterizar nanopartículas monometálicas (Au, Ag) y bimetálicas (Au@Ag) empleando el extracto de raíz de *R. hymenosepalus* como agente biorreductor, para después evaluar el efecto anticancerígeno de dichos materiales sobre la línea celular HeLa.

Objetivos específicos

1. Obtener extractos ricos en taninos condensados (extractos polifenólicos) a partir de la raíz de la cañagria (*Rumex hymenosepalus*) empleando como medio de extracción mezclas de etanol/agua en distintas proporciones. Así mismo, liofilizar el producto extraído para contar con un extracto asilado y seco.
2. Estandarizar el método de síntesis de nanopartículas de oro utilizando como agente reductor extractos sin purificar de *Rumex hymenosepalus*.
3. Establecer un método de síntesis controlada de nanopartículas bimetálicas del tipo núcleo@coraza Au@Ag empleando como agente reductor extractos sin purificar de *Rumex hymenosepalus*.
4. Caracterizar la población de partículas obtenidas a distintas razones de volumen de solución precursora metálica vs volumen de solución reductora, mediante diferentes técnicas experimentales: Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS), Espectroscopía Infrarroja y de UV-Vis, etc.

5. Caracterizar la cinética de la formación de las nanopartículas metálicas bajo distintas condiciones de concentración de precursor vs reductor, haciendo uso de la Espectroscopia de UV-Vis.
6. Evaluar los efectos inhibitorios de las distintas nanopartículas metálicas obtenidas (monometálicas y bimetálicas), haciendo la evaluación en líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa.
7. Establecer la diferencia entre el efecto anticancerígeno de las nanopartículas monometálicas de oro y núcleo@coraza.

Referencias

- [1] CH. Ramamurthy, M. Padma, I. Daisy Mariya Samadanam, R. Mareeswaran, A. Suyavaran, M. Suresh Kumar, K. Premkumar, C. Thirunavukkarasu (2013) “The extra cellular synthesis of gold and silver nanoparticles and their free radical scavenging and antibacterial properties” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Vol. 102, 808– 815.
- [2] Virender K. Sharma, Ria A. Yngard, Yekaterina Lin (2009) “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities” *Advances in Colloid and Interface Science* Vol. 145, 83–96.
- [3] Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade (2009) “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials” *Biotechnology Advances* Vol. 27, 76–83.
- [4] Shankar S S, Rai A, Ahmad A, and Sastry M (2004) “Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth” *Journal of Colloid and Interface Science* Vol.275, 496–502.
- [5] Nitani, H., Nakagawa, T., Daimon, H., Kurobe, Y., Ono, T., Honda, Y., ... & Yamamoto, T. A. (2007). Methanol oxidation catalysis and substructure of PtRu bimetallic nanoparticles. *Applied Catalysis A: General*, 326(2), 194-201.
- [6] Nasrabadi, H. T., Abbasi, E., Davaran, S., Kouhi, M., & Akbarzadeh, A. (2016). Bimetallic nanoparticles: Preparation, properties, and biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 376-380.
- [7] Yallappa, S., Manjanna, J., & Dhananjaya, B. L. (2015). Phytosynthesis of stable Au, Ag and Au–Ag alloy nanoparticles using *J. Sambac* leaves extract, and their enhanced

antimicrobial activity in presence of organic antimicrobials. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 236-243.

- [8] Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B., & Patra, C. R. (2015). Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*, 53, 298-309.
- [9] 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), 1.
- [10] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). *Global*.
- [11] Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., ... & Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *cáncer*, 85, 1.

Capítulo 1

Antecedentes

En este capítulo se introduce la noción de nanotecnología. Además, para el caso de las nanopartículas metálicas, se describen las diferentes rutas de síntesis de éstas para enfatizar el caso particular de la síntesis de nanomateriales metálicos empleando extractos de plantas. Después, se establece la descripción y propiedades de la planta *Rumex Hymenosepalus*. Finalmente, se habla sobre el uso de sistemas de nanopartículas como tratamientos contra cáncer cérvico uterino.

1.1 Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia se dedica al estudio de materiales o partículas que tienen por lo menos una de sus dimensiones menor a 100 nm (1 nm equivale a 1×10^{-9} m, es decir, la mil millonésima parte de un metro); a dichas partículas se les denomina nanopartículas y a la rama del conocimiento dedicada al diseño, la producción y la aplicación de sistemas de tamaño nanométricos se le conoce como nanotecnología. Las nanopartículas manifiestan novedosas propiedades fisicoquímicas y biológicas que no se observan en su presentación en bulto debido a efectos de confinamiento cuántico y al incremento de la proporción de área superficial total contra volumen [1].

En la figura 1.1.1 se ilustra una escala de dimensiones espaciales comprendida desde los milímetros a los nanómetros e ilustrada con distintos componentes biológicos con los cuales las nanopartículas pueden interaccionar.

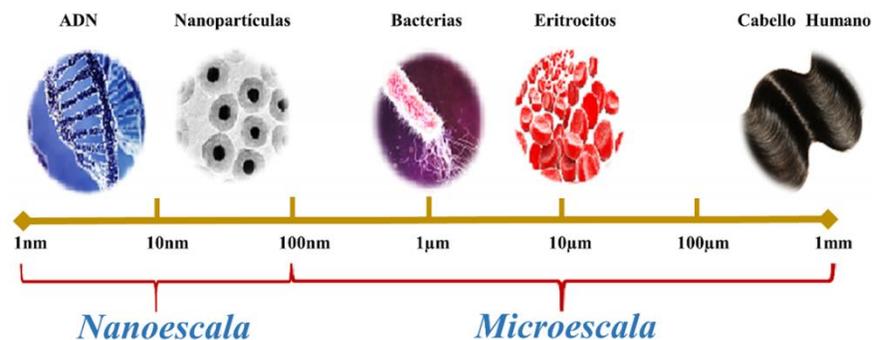


Figura 1.1.1 Nanoescala y su ubicación junto a otras escalas por medio de materiales pertenecientes a éstas. Imagen adaptada de [25].

1.2 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas han recibido considerable atención en los últimos años debido a sus propiedades únicas en catálisis, óptica, electrónica y biomedicina. Por ejemplo, las nanopartículas de plata han mostrado gran efectividad como agentes microbicidas y con baja citotoxicidad lo que permite su uso incluso en microorganismos resistentes a algunos antibióticos [2]. Dado que las nanopartículas pueden viajar a través de vasos capilares, se ha buscado la funcionalización de ciertos tipos de nanopartículas (principalmente de oro y Fe_2O) recubriéndoles superficialmente con moléculas que sirvan como guías específicos para ser direccionadas hacia un destino puntual como algún tumor canceroso, permitiendo con ello aumentar la efectividad del tratamiento y reducir la bioacumulación de nanomaterial. Además, si el nanomaterial empleado tiene respuesta a campos magnéticos y/o absorbe en la región infrarroja (IR) del espectro electromagnético puede emplearse como sensor para ubicar la distribución de las nanopartículas en el tejido mediante técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Tomografía Axial Computarizada (TAC) o Termografía y a la vez recibir el tratamiento correspondiente mediante terapias de hipertermia para la destrucción exclusiva del tejido marcado con las nanopartículas. Esta doble función que cumplen algunas nanopartículas, de diagnóstico y tratamiento, ha dado lugar a la línea de investigación conocida como Teragnosis (Terapia + Diagnóstico) [3]. Particularmente atractivo ha resultado la actividad catalítica que presentan algunas nanopartículas de metales nobles (Pd, Pt, Au). El impacto que la actividad catalítica industrial tiene en nuestra vida diaria es muy elevado, pues se estima que el 90% de todos los productos químicos producidos comercialmente involucran catalizadores en alguna etapa del proceso de su fabricación [4]. Ahora muchos de los catalizadores heterogéneos usados en la industria consisten en nanopartículas con tamaños entre 1-10 nm soportadas en una matriz porosa que suele tener tamaños de poros también nanométricos como en caso de las zeolitas. En la catálisis heterogénea las moléculas provenientes de los reactivos en fase líquida o gaseosa, se adsorben en la superficie sólida y catalíticamente activa de la nanopartícula. Los enlaces químicos son rotos en la superficie del nanomaterial generándose nuevos productos que son regresados a la fase de donde provenían los reactantes originales [5].

En este sentido se puede visualizar la gran ventaja de las nanopartículas pues a menor tamaño de partículas se incrementa el área superficial total con lo que se tienen más sitios activos (átomos superficiales de nanopartículas) donde llevar a cabo la reacción catalítica incrementando la eficiencia del catalizador.

1.3 Síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas de nanopartículas metálicas

La síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas como agentes reductores es bastante sencilla de realizar en el laboratorio pues simplemente se mezcla el extracto con la solución precursora metálica llevándose a cabo la reacción de oxidación-reducción donde los iones metálicos pasan a su estado de valencia cero (A^{+n} a A^0) por la transferencia de electrones que la molécula reductora del extracto proporciona. Los átomos metálicos se unen entre sí para formar agregados atómicos (clústeres) que dan lugar a una “semilla” cristalina conocida como núcleo crítico. A esta fase se le conoce como etapa de nucleación y es seguida por la fase de crecimiento de la nanopartícula hasta formar una solución coloidal estable en el solvente [6]. La síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas es un proceso “de un solo paso” pues los compuestos de los extractos participan como agentes reductores, pero también son estabilizantes de las nanopartículas ya formadas evitando la coalescencia entre ellas al adsorberse sobre las superficies de estos materiales. Algunos de los parámetros que resultan críticos en las características de los nanomateriales (tamaños, geometrías, eficiencia de síntesis) obtenidos empleando extractos de plantas son la naturaleza del extracto de planta (moléculas bioreductoras en el extracto), la concentración de las sales metálicas usadas como precursores de los iones metálicos, el pH, la relación extracto/precursor, la temperatura y las condiciones de iluminación durante la reacción entre otras variables. Sobre la naturaleza del extracto podemos decir que la síntesis de nanopartículas estará mediada por los distintos grupos funcionales como los grupos carbonilos, aminas y amidas, presentes en compuestos bioreductores como terpenoides, fenólicos, flavononas, proteínas, polisacáridos, pigmentos y alcaloides entre otros [7, 8]. El extracto preparado para realizar la síntesis puede ser obtenido de las distintas partes de la planta: hojas, flores, fruto, cáscara, raíz o corteza. Peralta *et al.* [9] efectúan una revisión actualizada de las distintas plantas empleadas para la síntesis de nanopartículas metálicas. En la

tabla 1.3.1 se presentan algunos de los resultados mostrados por Peralta *et al.* en su trabajo de revisión bibliográfica. Se incluyen ejemplos que ilustran las diversas partes de la planta que pueden usarse como fuente de biomoléculas reductoras para la síntesis de nanopartículas.

Tabla 1.3.1: Ejemplos de nanopartículas monometálicas obtenidas por síntesis utilizando plantas (adaptada de [13]).

| Precursor | Planta | Condición de síntesis | Tamaño | Morfología | Aplicación | Referencia |
|--------------------|--|--|------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| HAuCl ₄ | <i>Menta piperia</i> (planta entera) | 1.5mL de extracto en 30mL de HAuCl ₄ (1mM) incubado a 28°C por 24 h | > 150 nm | Esféricas | Antibacterial | MubarakAli <i>et al.</i> [10] |
| HAuCl ₄ | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (hojas) | 4mL extracto en 30mL HAuCl ₄ (0.2mM) | 25 nm | Esféricas | Marcaje celular y biosensores | Smitha <i>et al.</i> [11] |
| HAuCl ₄ | <i>Musa paradisiaca</i> (cáscara de fruto) | 10mg de polvo de cáscara seca en 2mL HAuCl ₄ 1mM | 300 nm | --- | Antibacterial y antifúngico | Bankar <i>et al.</i> [12] |
| HAuCl ₄ | <i>Sapindus Mukorossi</i> (pericarpio del fruto) | 10mL extracto en 1mL HAuCl ₄ (1mM) | 9 – 19 nm | Esféricas, triangular y decahedral | Reducción de p-nitroanilina | Reddy <i>et al.</i> [13] |
| AgNO ₃ | <i>Chelidonium majus</i> (hojas) | Proporción vol/vol 1:1 extracto: 1mM AgNO ₃ | 90 nm | Esféricas | Antioxidante Microbicida | Barbinta-Patrascu <i>et al.</i> [14] |
| AgNO ₃ | Almidón de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) | 85 mg de almidón soluble + 15mL de solución glucosa (0.06 o 0.12 M) en 10mL 1% AgNO ₃ | 20-50nm | Esféricas | Microbicida Biomedicina Sensores | Cheviron <i>et al.</i> [15] |
| AgNO ₃ | <i>Sambucus nigra</i> (extracto de fruta) | 16.6mL extracto en 6.6 mL 1% AgNO ₃ | 20-80 nm | Esféricas | Anti-inflamatoria | David <i>et al.</i> [16] |
| AgNO ₃ | Cáscara de cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>) | 5mL extracto en 45mL AgNO ₃ 10mM | 10-50 nm | Esféricas | Antifúngicas | Velmurugan <i>et al.</i> [17] |
| AgNO ₃ | <i>Rosa Andeli</i> (pétalos) | 1.6mL extracto en 20mL 1mM AgNO ₃ | 0.5-1.4 nm | Esféricas | Fotocatálisis | Suarez-Cerda <i>et al.</i> [18] |

De las moléculas extraídas de plantas que más capacidad presentan para actuar como bio-reductores en la síntesis de nanopartículas se encuentran los polifenoles, las cuales son

moléculas antioxidantes naturales que han mostrado tener actividad antitumoral importante [19]. En el caso del té verde se sabe que la familia de las catequinas son los antioxidantes más abundantes y a estas se les atribuyen las propiedades benéficas de esta bebida. Las estructuras de las cuatro catequinas presentes en el té verde se representan en la figura 1.3.1.

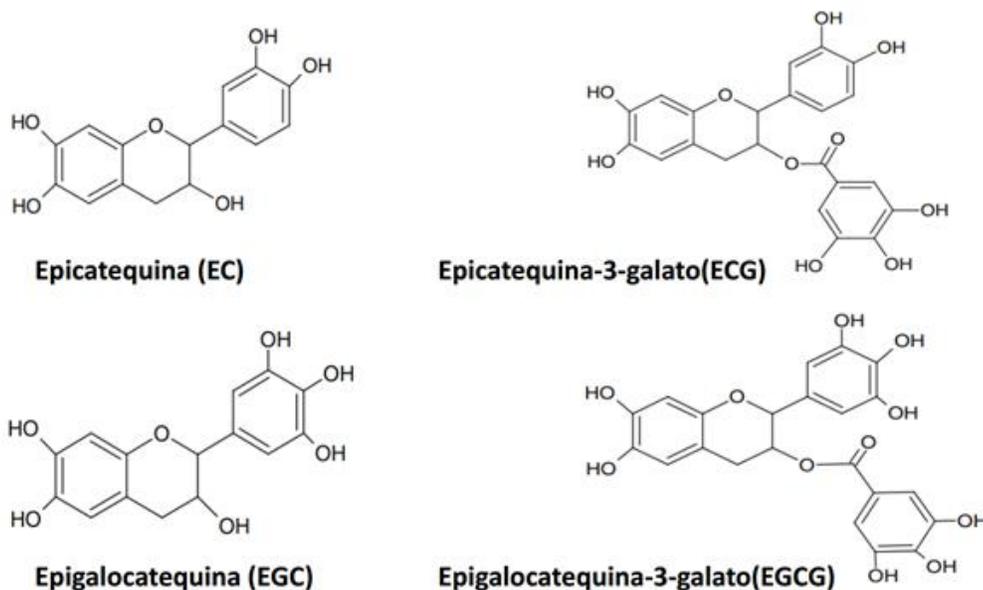


Figura 1.3.1 Catequinas presentes en el té verde.

Las moléculas de catequinas se caracterizan por la presencia de sus anillos fenólicos ricos en grupos hidroxilos (-OH) los cuales son susceptibles a desprotonarse con facilidad promoviendo la reacción óxido-reducción con que se inicia la síntesis de las nanopartículas metálicas. Tochi *et al.* [20] han observado que la actividad antioxidante del té verde es mayor mientras más alto es el contenido de EGC y EGCG por lo que se ha identificado al grupo galato como el que mayoritariamente contribuye en la reacción óxido-reducción de estos compuestos. En la figura 1.3.2 se muestra el mecanismo de reacción propuesto por Hussain y Khan [21] para la reducción del ion Ag^+ en presencia de una molécula de EGCG, lo cual se indica en el inciso A, donde el proceso se ilustra considerando solamente la contribución reductora de un grupo galato (resaltado en el sombreado gris). En B el grupo galato se ha desprotonado en uno de sus grupos -OH originándose un radical EGCG y el electrón se ha transferido al ion metálico obteniéndose plata metálica (Ag^0). En C otro de los grupos hidroxilos se desprotona en presencia de otro ion Ag^+ a quien le transferirá el electrón remanente dándose un re-arreglo de los enlaces π del anillo

aromático para dar lugar a los productos señalados en D, una molécula EGCG oxidada (conocida como quinona) y un nuevo átomo metálico Ag^0 .

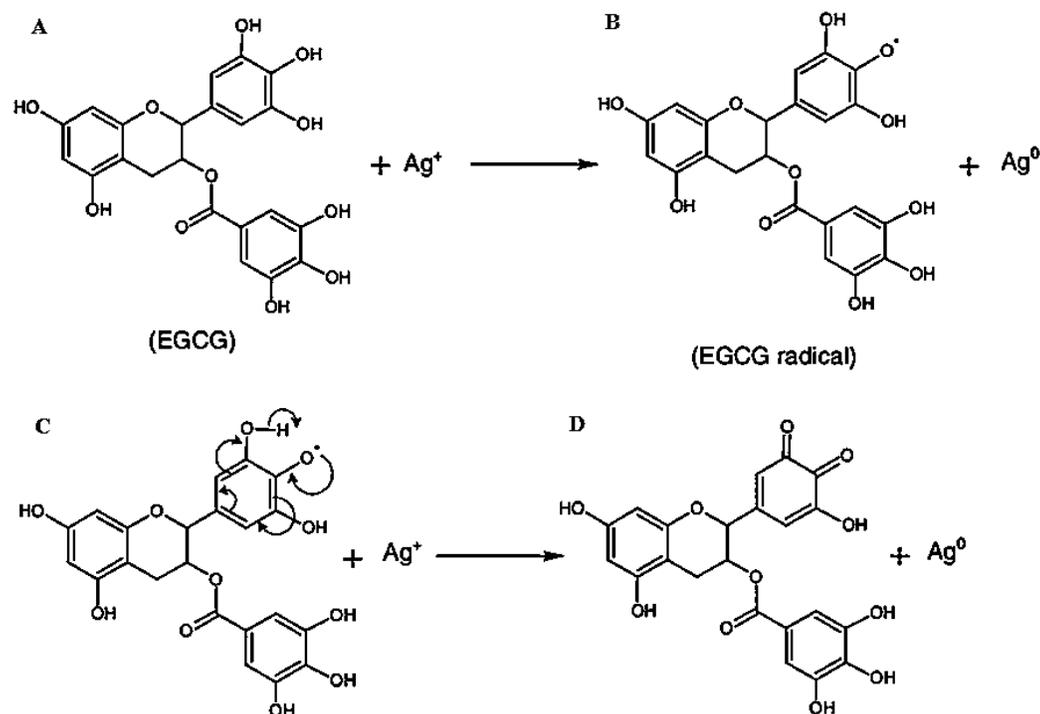
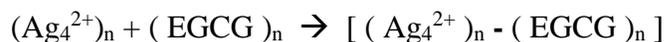


Figura 1.3.2 Reducción de los iones Ag^+ por los grupos $-OH$ de la EGCG [21]

Podemos resumir el proceso ilustrado en la figura 1.3.2 en la siguiente reacción:



Además, Hussain y Khan plantean una ruta de nucleación en la síntesis de nanopartículas de plata donde los tetrámeros son estabilizados por la EGCG



y señalan que la estabilización de las nanopartículas formadas es por interacción electrostática con la EGCG mediante el par de electrones no enlazantes de los grupos hidroxilos de la molécula. En este contexto, Wu *et al.* [22] sugieren que también las formas oxidadas de la EGCG intervienen en la estabilización de la nanopartícula resultante brindando estabilidad al sistema. En la figura 1.3.3 se presentan los esquemas de estabilización de las nanopartículas por la molécula EGCG sin oxidar (en B) y por la forma oxidada de la EGCG (en C). En A se muestra una micrografía de nanopartículas de Ag sintetizadas con EGCG, resaltando la cubierta

adyacente a los nanomateriales la cual corresponde a las moléculas de EGCG que están adsorbidas a la superficie actuando como agente estabilizador [21].

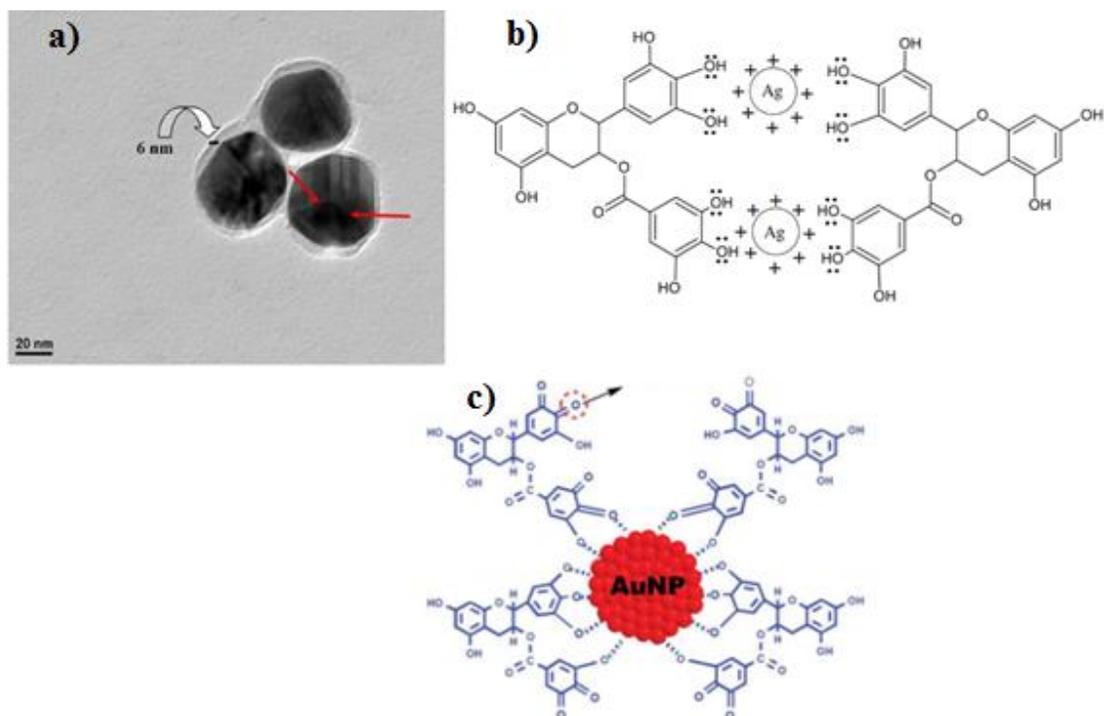


Figura 1.3.3 En a) se muestran nanopartículas de plata estabilizadas con EGCG. b) corresponde al mecanismo de estabilización propuesto en [21]. En c) se ilustra el mecanismo de estabilización propuesto en [22].

1.4 Nanopartículas núcleo@coraza

Las nanopartículas núcleo@coraza son nanopartículas heterogéneas formadas por dos o más materiales (metal, elemento o biomolécula), donde un nanomaterial actúa como un núcleo en el centro mientras que el otro se localiza alrededor del núcleo central formando la coraza, de tal forma que una nanopartícula núcleo@coraza es un nanomaterial bifásico, el cual tiene un núcleo interno y una coraza externa ambos de distintos componentes [23]. Las nanopartículas núcleo@coraza suelen etiquetarse como nanocompositos, los cuales tienden a ser uniformes desde el punto de vista microscópico: por el contrario, las nanopartículas núcleo@coraza poseen fronteras bien definidas entre la coraza y el núcleo por lo que ambos suelen ser fácilmente diferenciados [24]. Las propiedades de las nanopartículas núcleo@coraza, como las ópticas, físico-químicas o biológicas, pueden ser modificadas variando los tamaños de los núcleos o las

corazas, así como la naturaleza de los materiales que las conforman, de tal manera que esta capacidad de manipulación les brinda una gran versatilidad a las aplicaciones de estas nanopartículas en diversos campos como la medicina, ingeniería, farmacología y ciencia de materiales entre otras. En la figura 1.4.1 se muestran distintos tipos de NPs núcleo@coraza [25].

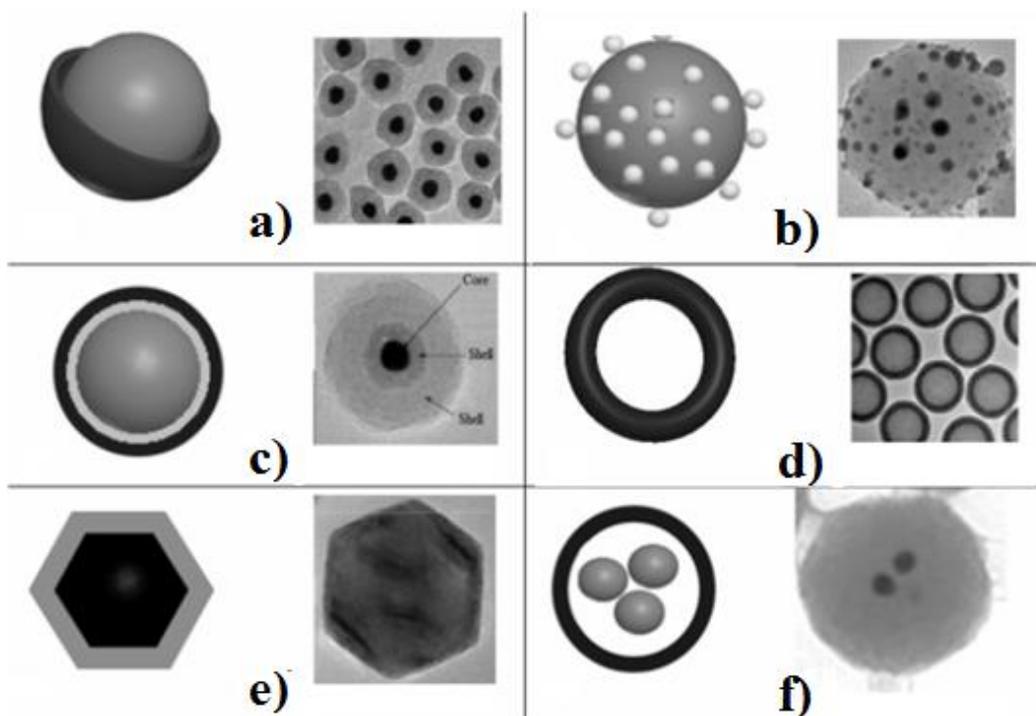


Figura 1.4.1 a) núcleo@coraza; b) core-aderezado con NPs; c) Core@doble-shell; d) coraza simple; e) núcleo@coraza-poliédrica y f) core-doble@shell

Los distintos tipos de nanopartículas núcleo@coraza mostrados en la figura tienen propiedades muy particulares y exclusivas. Por ejemplo, después de sintetizar nanopartículas núcleo@coraza con núcleos orgánicos y su subsecuente remoción (por disolución en solventes orgánicos o calentamiento a elevadas temperaturas) puede generar nanopartículas huecas o núcleo-hueco@coraza, como se ilustra en figura 1.4.1 d).

1.5 Biosíntesis de Nanopartículas núcleo@coraza

Las nanopartículas sintetizadas por métodos químicos presentan la desventaja de que pueden estar cubiertas con los compuestos que son usados en el proceso de síntesis lo cual puede limitar su aplicación en estudios clínicos debido a la presencia de las impurezas químicas remanentes

que aún en trazas pueden resultar tóxicas en los sistemas biológicos [26, 27]. A diferencia de los métodos químicos de síntesis, la biosíntesis de nanopartículas no presenta los efectos de toxicidad mencionado atrás debido a la naturaleza biocompatible de los compuestos que se adsorben sobre la superficie de los nanomateriales sintetizados, además los métodos biosintéticos suelen ser más baratos y de bajo impacto ecológico y en la mayoría de los casos la síntesis se efectúa rápidamente en pocos minutos u horas sin la necesidad de invertir energía en el proceso. Otro aspecto relevante de la biosíntesis de nanopartículas bimetalicas estriba en el hecho de que el uso de fuentes bio-reductoras naturales como plantas, hongos, levaduras o bacterias contienen una amplia gama de biomoléculas las cuales, además de fungir como agentes reductores en la reacción oxido-reducción con las sales metálicas, interactúan con las nanopartículas que se forman inmovilizándose en la superficie de ellas durante el proceso de síntesis de tal forma que recubren al nanomaterial incrementando la estabilidad de las nanopartículas bio-sintetizadas ya sea por carga o por interacciones estéricas [28].

1.6 Síntesis de nanopartículas núcleo@coraza con extractos de plantas

La síntesis de nanopartículas núcleo@coraza mediadas por plantas resulta más ventajosa en relación a la síntesis asistida por bacterias u hongos debido principalmente a los costos relacionados con el mantenimiento de los cultivos de dichos microorganismos, además los extractos de plantas contienen compuestos químicos como carbohidratos, aminoácidos, terpenoides, polifenoles y alcaloides entre otros, los cuales cuentan con una gran variedad de grupos funcionales que están involucrados en la reducción de las sales precursoras metálicas como son los grupos aminos, hidroxilos, carbonilos y aldehídos. Dependiendo del grupo funcional expuesto en las moléculas unidas en las superficies de las nanopartículas, éstas pueden unirse a una variedad de estructuras biológicas como son las proteínas, ADN, anticuerpos y enzimas entre otras. En comparación con los extractos de plantas, la producción de nanopartículas bimetalicas núcleo@coraza a través de microorganismos es muy limitada y solo existen menos de 10 estudios que reportan la biosíntesis de nanopartículas núcleo@coraza por este camino [25]. En la síntesis de nanopartículas núcleo@coraza un tipo de ion metálico se reduce antes que otro para dar lugar a las nanopartículas que harán las veces de núcleo en las

bimetálicas; a continuación, el otro precursor metálico es reducido en presencia de los núcleos formados previamente originando un recubrimiento metálico (coraza) sobre ellos con lo que se obtienen los nanomateriales núcleo@coraza. La mayoría de los protocolos de síntesis de las estructuras núcleo@coraza implican una serie de pasos (síntesis de núcleos → recuperación y limpieza de núcleos → síntesis de coraza) [29-31], incluso este protocolo permite la producción de nanopartículas multicoraza donde dos o más capas de distintos metales van recubriendo de forma secuencial concéntricamente al núcleo [32, 33]. Algunos autores reportan que es posible formar nanopartículas bimetálicas núcleo@coraza en un solo paso agregando los precursores metálicos simultáneamente. Presad *et. al.* reportaron la síntesis en un solo paso de nanopartículas bimetálicas magnéticas de Ni/Fe₃O₄ usando extractos de *Moringa oleífera* [34]. Song y Kim reportaron la obtención de nanopartículas bimetálicas Au@Ag por la exposición simultánea de iones Au³⁺ y Ag⁺ con extractos de hojas de pérsimo obteniendo tamaños de partículas entre 50-500 nm [35]. Shankar et al. reportan la síntesis de nanopartículas Au@Ag en un solo paso empleando extractos de hojas de Neem (*Azadirachta indica*) como agente bio-reductor obteniendo productos entre 50-100 nm [36]. En ambos trabajos los autores argumentan que la obtención de las estructuras núcleo@coraza se generan gracias a la reducción competitiva de iones favoreciéndose la rápida reducción Au³⁺ → Au⁰ sobre la Ag⁺ → Ag⁰ de tal forma que primero se origina la nanopartícula de oro retardándose la síntesis las partículas de plata, la cual empieza a darse sobre la superficie de las partículas de oro ya formadas originando las estructuras Au@Ag. En la tabla 1.5.1 se presentan algunos ejemplos que ilustran las diversas plantas y una matriz eco-amigable que pueden usarse como base para la síntesis de nanopartículas bimetálicas.

Tabla 1.5.1 Ejemplos de síntesis de nanopartículas bimetálicas Au – Ag

| Planta/ Compuesto | Tipo de nanopartículas | Método para la preparación del extracto/biosíntesis | Tamaño (nm) | Ref. |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------|-------------|
| <i>Antigonon leptopus</i> | Au/Ag | 2 g de partes de plantas hervidas en 100 mL de agua durante 5 min. | 10 – 60 | [37] |
| <i>Diopyros kaki</i> (Persimmon) | Au/Ag | 5 g de hojas secas cortadas en 100 mL de agua destilada e hirviendo la mezcla durante 5 min. | 50 – 500 | [35] |
| <i>Azadirachta indica</i> (Neem) | Au/Ag | 20 g de hoja en polvo hervida (2 min) en 100 mL de agua destilada y al final decantada. | 50 – 100 | [36] |
| <i>Potamogeton pectinatus</i> | Au – Ag | 1.5 g en 30 mL de agua destilada, y luego se calentó a 80 °C mientras se agitaba durante 10 min. | 5 ± 10.6 | [38] |
| <i>Anacadium occidentale</i> | Au – Ag | Condiciones no descritas. | Debajo de 25 | [39] |
| Gelatina | Au – Ag | 5.0 mL de 1.0x10 ⁻² mol/l de solución de HAuCl ₄ a 50 mL de solución de gelatina (1.0% en peso), seguido de 5.0 mL de 1.0x10 ⁻² mol/l de AgNO ₃ con agitación vigorosa a 50 °C durante 6 h. | 30 | [40] |

En el caso de la síntesis de nanopartículas metálicas con extractos de plantas uno de los problemas radica en la reproducibilidad de los productos sintetizados debido principalmente a la naturaleza misma de los extractos pues la composición de éstos varían en cada extracción para plantas de la misma especie ubicadas en distintas regiones geográficas, además pequeños cambios en los valores de los parámetros físico-químicos (concentraciones de reactantes, temperatura, pH, condiciones de iluminación) modifican sustancialmente los tamaños, formas

y estabilidad de los nanomateriales sintetizados. Raju *et. al.* estudiaron el efecto de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de oro usando extractos de *Semecarpus anacardium* y encontraron que temperaturas elevadas generan nanopartículas esféricas mientras que bajas temperaturas producen nanopartículas mayoritariamente triangulares [41]. Ren *et. al.* reportaron que el incremento del pH de 4 a 7 aumenta en 30 veces la eficiencia de remoción de iones de metales pesados por parte de las nanopartículas magnéticas núcleo@coraza de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ [42]. Algunos trabajos evalúan el efecto del espesor de la coraza sobre las propiedades de las nanopartículas núcleo@coraza producidas. Joshi *et. al.* mostraron que el incremento en el espesor de la coraza en nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ genera un decremento en la relajación r_2 en resonancia magnética de imagen [43]. Yang *et. al.* estudiaron la influencia de el espesor de la coraza en nanopartículas $\text{Au}@Ag$ sintetizadas con ascorbato de sodio sobre la actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* y encontraron que a las mismas concentraciones de nanopartículas se obtiene una mayor respuesta inhibitoria cuando la coraza es de 8.8 nm respecto a un espesor de 1.5 nm [44]. Khanchandani *et. al.* sintetizaron nano-rodillos de $\text{ZnO}@CdS$ empleando ácido cítrico como agente reductor. En su estudio variaron el espesor de la coraza entre los 10 nm y 30 nm encontrando que la respuesta fotocatalítica más eficiente sobre la degradación de Rhodamina B se da para el espesor de coraza de 10 nm [45].

1.7 Aplicaciones de nanopartículas núcleo@coraza

Las nanopartículas núcleo@coraza han generado un amplio interés científico y tecnológico debido a que exhiben algunas propiedades únicas que surgen de su diseño, geometría del núcleo, naturaleza de la coraza, relación de tamaños núcleo-coraza entre otros. No sorprende por lo tanto que se utilicen en campos tan variados como medicina, ingeniería y ciencia de materiales [46-48]. Algunos de los nanomateriales núcleo@coraza son multifuncionales ya que pueden usarse para varias aplicaciones asociadas a sus propiedades magnéticas y luminiscentes. Su componente magnético puede ayudar a mejorar la penetración de las nanopartículas en las células y también mejorar la resolución de las imágenes de resonancia magnética tradicionales, mientras que la parte luminiscente puede ayudar en la detección basada en luminiscencia [49]. Además, las nanopartículas núcleo@coraza multifuncionales pueden usarse para el suministro de biomoléculas como anticuerpos, proteínas y genes con el propósito de tratamientos [50]. En

este sentido, Wu *et. al.* utilizaron cadenas sencillas de ADN (aptámeros) para sintetizar nanopartículas de plata recubiertas de oro mediante foto-reducción con luz UV. Estas estructuras se unen con gran especificidad y afinidad a células de cáncer de mama MCF-7 vía interacción específica entre el aptámero S2.2 y la glicoproteína transmembranal, mucina MIC1, la cual se sobre expresa en estas líneas celulares y en cáncer de mama metastásico. Adicionalmente, este nanomaterial posee una alta absorción en el IR cercano (NIR, por sus siglas en inglés) que lo posibilita como agente en terapia foto-térmica de células MCF-7 a muy bajas densidad de potencia de radiación ($0.25\text{W}/\text{cm}^2$) por lo que no daña el tejido normal sano de los alrededores [51].

1.8 Descripción y propiedades de *Rumex hymenosepalus*

De las plantas regionales del Norte de México y sur de los Estados Unidos empleadas para fines medicinales, la *Rumex hymenosepalus*, conocida ordinariamente con el nombre de cañagria, es una de las de mayor contenido de antioxidantes naturales [52], siendo los taninos condensados o catéquicos los compuestos antioxidantes más importantes en esta planta, presentes en forma polimérica y cuyos extractos se han empleado tradicionalmente en la industria del curtido de pieles [53]. En este sentido, existen varios trabajos de síntesis de nanopartículas de metales nobles empleando compuestos catéquicos en forma de reactivo puro o bien obtenidos de extractos de plantas como el té verde o del pepino amargo entre otros, [54, 55]. En la literatura científica existen algunos estudios referentes a plantas del género *Rumex* de especies distintas a la aquí señalada [56, 57] y solamente un grupo de investigación ha reportado la síntesis de nanopartículas metálicas empleando extractos obtenidos de la raíz de esta planta donde los autores reportaron haber detectado la presencia del compuesto trans-resveratrol glucosado (figura 1.6.1) como constituyente del extracto, además de EC, ECG, EGC y EGCG [58]. Cabe mencionar que la molécula trans-resveratrol es uno de los antioxidantes naturales más comercializados como suplemento nutricional y se ha demostrado también (actuando como reactivo puro) su capacidad para la biosíntesis de nanopartículas metálicas [59] por lo que suponemos que junto a las catequinas presentes en el extracto de la *Rumex hymenosepalus* forman un coctel de moléculas reductoras disponibles para una síntesis eficiente de nanopartículas.

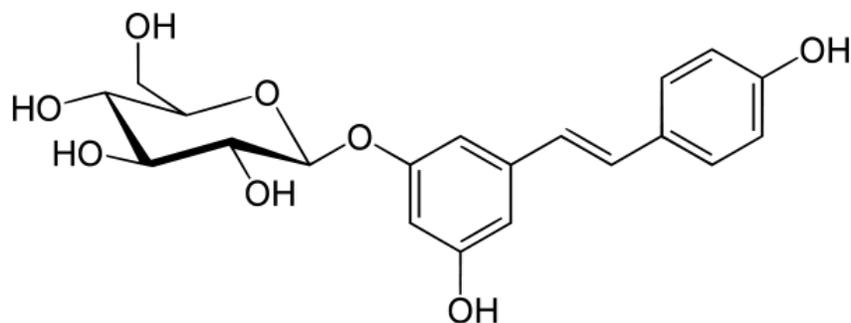


Figura 1.6.1 Molécula de trans-resveratrol glucosado

1.9 Nanopartículas Au y bimetálicas Au-Ag en células HeLa

En los últimos años ha habido un auge en la incursión del uso de nanopartículas metálicas en tratamientos contra cáncer. Entre las causas de esto radica el alto costo de las quimioterapias, así como los extenuantes efectos secundarios. Con el propósito de ofrecer un tratamiento alternativo con medicamentos menos invasivos, ha surgido de la nanociencia el uso de nanopartículas de metales nobles como tratamientos. Lo que hace posible el uso de estos materiales es la forma en que se sintetizaron, pues se recurre a métodos de síntesis verde como la síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas. Cada método tiene sus ventajas y desventajas, pero en general el uso de este tipo de recursos para la síntesis de nanopartículas es más fácil, rentable y genera menos contaminación y elude el daño ambiental que los métodos fisicoquímicos en términos de biocompatibilidad y medio ambientales.

Las células HeLa es un cultivo celular que se ha utilizado ampliamente para la evaluación de la toxicidad de los nanomateriales. Uno de los materiales más estudiados son las nanopartículas de oro (Au), las cuales se han sintetizado utilizando una enorme variedad de extractos de plantas o compuestos procedentes de estas. Un ejemplo de esto es el trabajo de Dhas *et. al.*, en donde se utiliza extracto de alga *Sargassum swartzii* en la síntesis de nanopartículas Au donde se obtienen partículas con tamaños de 20 – 60 nm que presentan una concentración inhibitoria, que es la reducción de la función mitocondrial en 50 % (IC₅₀, 24 h) de 41.10 µg/mL [60]. Por otro lado, Baharara *et. al.* presentan nanopartículas Au sintetizadas con extracto de hoja de *Zataria multiflora*, con un tamaño promedio de 20.52 nm y una (reducción de la actividad mitocondrial en 50 %) IC₅₀ a 48 h de 100 µg/mL [61]. En otro estudio, Bhat *et. al.* reportan nanopartículas Au con forma irregular sintetizadas por medio de foto irradiación con extracto de hongo

comestible *Pleurotus florida*. Dichas nanopartículas presentan tamaños entre 10 – 50 nm y una IC_{50} a 72 de 36.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [62].

Uno de los aspectos que resaltan en la síntesis de nanopartículas es el tamaño de los productos, pues pueden obtenerse una variedad de tamaños según el método de síntesis utilizado. Esto es determinante a la hora de evaluar la citotoxicidad en líneas de cáncer, así como la internalización, pues ambas pueden depender del tamaño de las nanopartículas usadas. La revisión hecha por Shang *et. al.* aborda este problema, discutiendo la internalización celular por medios activos y pasivos, así como los efectos citotóxicos y la relación que poseen estos con el tamaño de las partículas [63]. El artículo de Russo *et. al.* es más particular en este aspecto, pues limita su trabajo a nanopartículas Au en células HeLa. Sin embargo, dicho trabajo toma la métrica de la concentración del número de partículas, la cual toma en cuenta tanto el tamaño como la forma, para mostrar la dependencia de la citotoxicidad con dicha concentración de las partículas [64].

Por último, es imprescindible recalcar que los estudios en cáncer no se limitan a citotoxicidad y a condiciones *in vitro*. En el trabajo de Albanese y Chan se investiga la internalización de nanopartículas y agregados de Au en células HeLa y MDA, encontrando una reducción del 25 % en la internalización de los agregados en comparación con las nanopartículas individuales. Sin embargo, el incremento del doble de la internalización para agregados en MDA sugiere que los mecanismos de interacción dependen de la línea celular [65]. En el trabajo de Moser *et. al.* se investiga la internalización de nanopartículas Au en células HeLa y su localización mediante microscopía de determinación de posición espectral (SPDM por sus siglas en inglés). Para cuantificar la internalización utilizaron nanopartículas con diámetros de 10 y 25 nm a tiempos de 2 y 18 horas encontrando que las células internalizan el doble de nanopartículas de 10 nm en comparación con las de 25 nm [66]. Tan y Onur determinaron la localización y concentración inhibitoria de nanopartículas Au de 20 nm, además concluyeron que su sistema posee propiedades antiangiogénicas, convirtiéndolas en un agente potente en terapia anticáncer [67]. Shmarakov *et. al.* estudian el efecto sinérgico de nanopartículas núcleo@coraza de AuAg (en sus variaciones Au@Ag y Ag@Au) en la inhibición de carcinoma de pulmón Lewis (LLC por sus siglas en inglés) en ratón, encontrando que la inhibición tumoral *in vivo* es fuertemente dependiente de la distribución topológica de los metales, presentando la variación Ag@Au mayor actividad inhibitoria [68].

Referencias

- [1] Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- [2] Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of applied microbiology*, 112(5), 841-852.
- [3] Lee, D. E., Koo, H., Sun, I. C., Ryu, J. H., Kim, K., & Kwon, I. C. (2012). Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656-2672.
- [4] Herves, P., Pérez-Lorenzo, M., Liz-Marzan, L. M., Dzubielia, J., Lu, Y., & Ballauff, M. (2012). Catalysis by metallic nanoparticles in aqueous solution: model reactions. *Chemical Society Reviews*, 41(17), 5577-5587.
- [5] Hvolbæk, B., Janssens, T. V., Clausen, B. S., Falsig, H., Christensen, C. H., & Nørskov, J. K. (2007). Catalytic activity of Au nanoparticles. *Nano Today*, 2(4), 14-18.
- [6] Thanh, N. T., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610-7630.
- [7] Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... & Hong, J. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104.
- [8] Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- [9] Peralta-Videa, J. R., Huang, Y., Parsons, J. G., Zhao, L., Lopez-Moreno, L., Hernandez-Viezcas, J. A., & Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 1(1), 4.
- [10] MubarakAli, D., Thajuddin, N., Jeganathan, K., & Gunasekaran, M. (2011). Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 360-365.

- [11] Smitha, S. L., Philip, D., & Gopchandran, K. G. (2009). Green synthesis of gold nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* leaf broth. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(3), 735-739.
- [12] Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2010). Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80(1), 45-50.
- [13] Reddy, V., Torati, R. S., Oh, S., & Kim, C. (2012). Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Sapindus mukorossi* gaertn. Fruit pericarp and their catalytic application for the reduction of p-nitroaniline. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(2), 556-564.
- [14] Barbinta-Patrascu, M. E., Badea, N., Ungureanu, C., Constantin, M., Pirvu, C., & Rau, I. (2016). Silver-based biohybrids “green” synthesized from *Chelidonium majus* L. *Optical Materials*, 56, 94-99.
- [15] Cheviron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2014). Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 108, 291-298.
- [16] David, L., Moldovan, B., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., ... & Filip, G. A. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 767-777.
- [17] Velmurugan, P., Sivakumar, S., Young-Chae, S., Seong-Ho, J., Pyoung-In, Y., Jeong-Min, S., & Sung-Chul, H. (2015). Synthesis and characterization comparison of peanut shell extract silver nanoparticles with commercial silver nanoparticles and their antifungal activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 51-54.
- [18] Suárez-Cerda, J., Alonso-Nuñez, G., Espinoza-Gómez, H., & Flores-López, L. Z. (2015). Synthesis, kinetics and photocatalytic study of “ultra-small” Ag-NPs obtained by a green chemistry method using an extract of *Rosa ‘Andeli’* double delight petals. *Journal of colloid and interface science*, 458, 169-177.
- [19] Fujiki, H., Suganuma, M., Imai, K., & Nakachi, K. (2002). Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer letters*, 188(1), 9-13.

- [20] Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G., & Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3973-3978.
- [21] Hussain, S., & Khan, Z. (2014). Epigallocatechin-3-gallate-capped Ag nanoparticles: preparation and characterization. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(7), 1221-1231.
- [22] Wu, H., Huang, X., Gao, M., Liao, X., & Shi, B. (2011). Polyphenol-grafted collagen fiber as reductant and stabilizer for one-step synthesis of size-controlled gold nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. *Green Chemistry*, 13(3), 651-658.
- [23] López-Lorente, A. I., Simonet, B. M., & Valcárcel, M. (2011). Analytical potential of hybrid nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(1), 43-54.
- [24] Allafchian, A., Jalali, S. A. H., Bahramian, H., & Ahmadvand, H. (2016). Preparation, characterization, and antibacterial activity of NiFe₂O₄/PAMA/Ag–TiO₂ nanocomposite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 404, 14-20.
- [25] Khatami, M., Alijani, H., & Sharifi, I. (2018). Biosynthesis of bimetallic and core shell nanoparticles: their biomedical applications: A review. *IET Nanobio*, 1-19.
- [26] Nadagouda, M. N., Iyanna, N., Lalley, J., Han, C., Dionysiou, D. D., & Varma, R. S. (2014). Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(7), 1717-1723.
- [27] Allafchian, A. R., Farhang, H. R., Jalali, S. A. H., & Vahabi, M. R. (2017). *Gundelia tournefortii* L.: a natural source for the green synthesis of silver nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, 11(7), 815-820.
- [28] Markova, Z., Novak, P., Kaslik, J., Plachtova, P., Brazdova, M., Jancula, D., ... & Varma, R. (2014). Iron (II, III)–polyphenol complex nanoparticles derived from green tea with remarkable ecotoxicological impact. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(7), 1674-1680.

- [29] Nagaonkar, D., & Rai, M. (2015). Sequentially reduced biogenic silver-gold nanoparticles with enhanced antimicrobial potential over silver and gold monometallic nanoparticles. *Adv. Mater. Lett*, 6(4), 334-341.
- [30] Shaheen, T. I., El-Naggar, M. E., Hussein, J. S., El-Bana, M., Emara, E., El-Khayat, Z., ... & Hebeish, A. (2016). Antidiabetic assessment; in vivo study of gold and core-shell silver-gold nanoparticles on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 865-875.
- [31] Kumari, M. M., Jacob, J., & Philip, D. (2015). Green synthesis and applications of Au–Ag bimetallic nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 185-192.
- [32] Catala, L., Brinzei, D., Prado, Y., Gloter, A., Stéphan, O., Rogez, G., & Mallah, T. (2009). Core–multishell magnetic coordination nanoparticles: toward multifunctionality on the nanoscale. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(1), 183-187.
- [33] Rodríguez-González, B., Burrows, A., Watanabe, M., Kiely, C. J., & Marzán, L. M. L. (2005). Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties. *Journal of Materials Chemistry*, 15(17), 1755-1759.
- [34] Prasad, C., Sreenivasulu, K., Gangadhara, S., & Venkateswarlu, P. (2017). Bio inspired green synthesis of Ni/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves extract: A magnetically recoverable catalyst for organic dye degradation in aqueous solution. *Journal of Alloys and Compounds*, 700, 252-258.
- [35] Song, J. Y., & Kim, B. S. (2008). Biological synthesis of bimetallic Au/Ag nanoparticles using Persimmon (*Diopyros kaki*) leaf extract. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(4), 808-811.
- [36] Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., & Sastry, M. (2004). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and interface science*, 275(2), 496-502.
- [37] Ganaie, S. U., Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2016). Rapid and green synthesis of bimetallic Au–Ag nanoparticles using an otherwise worthless weed *Antigonon leptopus*. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(6), 395-417.

- [38] AbdelHamid, A. A., Al-Ghobashy, M. A., Fawzy, M., Mohamed, M. B., & Abdel-Mottaleb, M. M. (2013). Phytosynthesis of Au, Ag, and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract of sago pondweed (*Potamogeton pectinatus* L.). *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(12), 1520-1529.
- [39] Sheny, D. S., Mathew, J., & Philip, D. (2011). Phytosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(1), 254-262.
- [40] Alarfaj, N. A., & El-Tohamy, M. F. (2016). Eco-friendly synthesis of gelatin-capped bimetallic Au–Ag nanoparticles for chemiluminescence detection of anticancer raloxifene hydrochloride. *Luminescence*, 31(6), 1194-1200.
- [41] Raju, D., Mehta, U. J., & Hazra, S. (2011). Synthesis of gold nanoparticles by various leaf fractions of *Semecarpus anacardium* L. tree. *Trees*, 25(2), 145-151.
- [42] Ren, C., Ding, X., Fu, H., Li, W., Wu, H., & Yang, H. (2017). Core–shell superparamagnetic monodisperse nanospheres based on amino-functionalized $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ for removal of heavy metals from aqueous solutions. *RSC Advances*, 7(12), 6911-6921.
- [43] Joshi, H. M., De, M., Richter, F., He, J., Prasad, P. V., & Dravid, V. P. (2012). Effect of silica shell thickness of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{--SiO}_x$ core–shell nanostructures on MRI contrast. *Contrast media & molecular imaging*, 7(5), 460.
- [44] Yang, L., Yan, W., Wang, H., Zhuang, H., & Zhang, J. (2017). Shell thickness-dependent antibacterial activity and biocompatibility of gold@ silver core–shell nanoparticles. *RSC Advances*, 7(19), 11355-11361.
- [45] Khanchandani, S., Kundu, S., Patra, A., & Ganguli, A. K. (2012). Shell thickness dependent photocatalytic properties of ZnO/CdS core–shell nanorods. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(44), 23653-23662.
- [46] Beitollahi, H., Tajik, S., & Jahani, S. (2016). Electrocatalytic Determination of Hydrazine and Phenol Using a Carbon Paste Electrode Modified with Ionic Liquids and Magnetic Core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2/\text{MWCNT}$ Nanocomposite. *Electroanalysis*, 28(5), 1093-1099.

- [47] Jahani, S., & Beitollahi, H. (2016). Carbon Paste Electrode Modified with TiO₂/Fe₃O₄/MWCNT Nanocomposite and Ionic Liquids as a Voltammetric Sensor for Sensitive Ascorbic Acid and Tryptophan Detection. *Anal. Bioanal. Electrochem*, 8(2), 158-168.
- [48] Yang, Y., Shi, J., Kawamura, G., & Nogami, M. (2008). Preparation of Au–Ag, Ag–Au core–shell bimetallic nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering. *Scripta Materialia*, 58(10), 862-865.
- [49] Abou-Hassan, A., Bazzi, R., & Cabuil, V. (2009). Multistep Continuous-Flow Microsynthesis of Magnetic and Fluorescent γ -Fe₂O₃@ SiO₂ Core/Shell Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 121(39), 7316-7319.
- [50] Zaimy, M. A., Saffarzadeh, N., Mohammadi, A., Pourghadamyari, H., Izadi, P., Sarli, A., ... & Tavakkoly-Bazzaz, J. (2017). New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer gene therapy*, 24(6), 233.
- [51] Wu, P., Gao, Y., Zhang, H., & Cai, C. (2012). Aptamer-guided silver–gold bimetallic nanostructures with highly active surface-enhanced raman scattering for specific detection and near-infrared photothermal therapy of human breast cancer cells. *Analytical chemistry*, 84(18), 7692-7699.
- [52] VanderJagt, T.J., Ghattas, R., VanderJagt, D.J., Crossey, M., Glew, R.H., (2002). Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of new mexico. *Life Sci Vol 70 (9)*, pp 1035-40.
- [53] León Paz, G.E., “Obtención de extracto curtiembre libre de almidón de la cañagria (rumex hymenosepalus)”, Tesis de Licenciatura, 1966, Escuela de Ciencias Químicas, UniSon.
- [54] Goutam, K., Chandra, D., Ranjan T., Swagata D., and Anushree R., (2012). Interaction of epigallocatechin gallate with lysozyme-conjugated silver nanoparticles, *Applied Spectroscopy*, Vol. 66 (7), pp. 744-749.
- [55] Satyavani, K., Ramanathan, T., and Gurudeban, S., (2011). Green synthesis of silver nanoparticles by using stem derived callus extract of bitter (citrullus colocynthis); *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 6 (3)*, pp. 1019 -1024.

- [56] Wegiera, M., Grabarczyk, P., Baraniak, B. and Danuta-Smolarz, H., (2011). Antiradical properties of extracts from roots, leaves and fruits of six rumex l. species, *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 53 (1), pp. 125-131.
- [57] Wahid-Hawas, U., Fadi-Ahmed, E., Fadi-Abdelkader, A., and Anwar-Taie, H., (2011). Biological activity of flavonol glycosides from rumex dentatus plant, an egyptian xerophyte, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5(17), pp. 4239-4243.
- [58] 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), 1.
- [59] Preethi, R. y Padma, R., R., (2016). Biocompatibility of Silver Nano Bio-Conjugates from Vitis vinifera seeds and its major Component Resveratrol. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 6(3), 99-109.
- [60] Dhas, T. S., Kumar, V. G., Karthick, V., Govindaraju, K., & Narayana, T. S. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using Sargassum swartzii and its cytotoxicity effect on HeLa cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 133, 102-106.
- [61] Baharara, J., Ramezani, T., Divsalar, A., Mousavi, M., & Seyedarabi, A. (2016). Induction of apoptosis by green synthesized gold nanoparticles through activation of caspase-3 and 9 in human cervical cancer cells. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 8(2), 75.
- [62] Bhat, R., Sharanabasava, V. G., Deshpande, R., Shetti, U., Sanjeev, G., & Venkataraman, A. (2013). Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom Pleurotus florida and its anticancer evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 63-69.
- [63] Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnol*, 12(5), b26.
- [64] VittoriaáRusso, M. (2015). The puzzle of toxicity of gold nanoparticles. The case-study of HeLa cells. *Toxicology Research*, 4(4), 796-800.
- [65] Albanese, A., & Chan, W. C. (2011). Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS nano*, 5(7), 5478-5489.

- [66] Moser, F., Hildenbrand, G., Müller, P., Al Saroori, A., Biswas, A., Bach, M., ... & Hausmann, M. (2016). Cellular uptake of gold nanoparticles and their behavior as labels for localization microscopy. *Biophysicaljournal*, 110(4), 947-953.
- [67] Tan, G., & Onur, M. A. (2018). Cellular localization and biological effects of 20nm-gold nanoparticles. *JournalofBiomedicalMaterialsResearchPart A*, 106(6), 1708-1721.
- [68] Shmarakov, I., Mukha, I., Vityuk, N., Borschovetska, V., Zhyschynska, N., Grodzyuk, G., & Eremenko, A. (2017). Antitumor activity of alloy and core-shell-type bimetallic AgAu nanoparticles. *Nanoscaleresearchletters*, 12(1), 333.

Capítulo 2

Técnicas experimentales

En este capítulo se lleva a cabo la descripción de las técnicas experimentales utilizadas para caracterizar los sistemas de nanopartículas. La descripción consiste en los principios físicos involucrados en la operación de los equipos.

2.1 Radiación electromagnética

La parte visible del espectro electromagnético es, por definición, la radiación visible para el ojo humano. Otros sistemas de detección revelan radiación más allá de las regiones visibles del espectro y se clasifican como ondas de radio, microondas, infrarrojos, ultravioleta, rayos X y rayos γ . Estas regiones se ilustran en la Figura 2.1.1, junto con los procesos involucrados en la interacción de la radiación de estas regiones con la materia. El espectro electromagnético y las variadas interacciones entre estas radiaciones y muchas formas de materia se pueden considerar en términos de teorías clásicas o cuánticas.

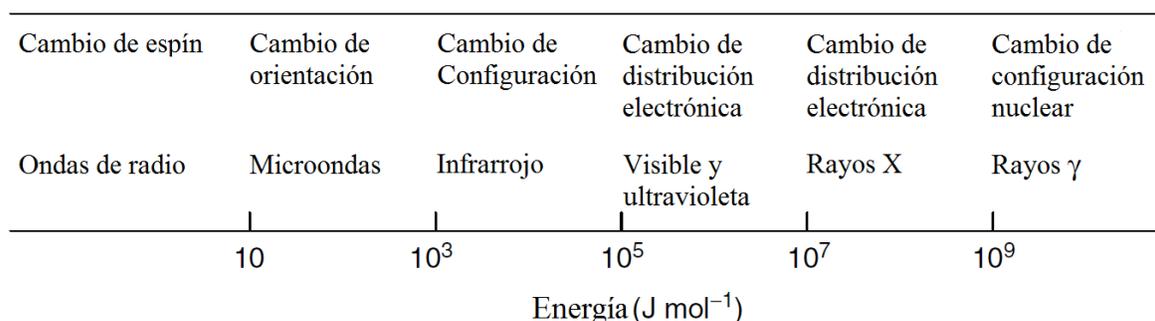


Figura 2.1.1 tipos de ondas electromagnéticas y los respectivos procesos involucrados. Adaptado de [5]

La naturaleza de las diversas radiaciones que se muestran en la Figura 2.1.1 ha sido interpretada por la teoría clásica de Maxwell del electromagnetismo, de ahí el término radiación electromagnética. Según esta teoría, la radiación se considera como dos campos, eléctrico y magnético mutuamente perpendiculares, que oscilan en planos individuales en ángulo recto entre sí. Estos campos están en fase y se propagan como una onda sinusoidal, como se muestra

en la Figura 2.1.2. Las magnitudes de los vectores eléctricos y magnéticos están representadas por E y B , respectivamente.

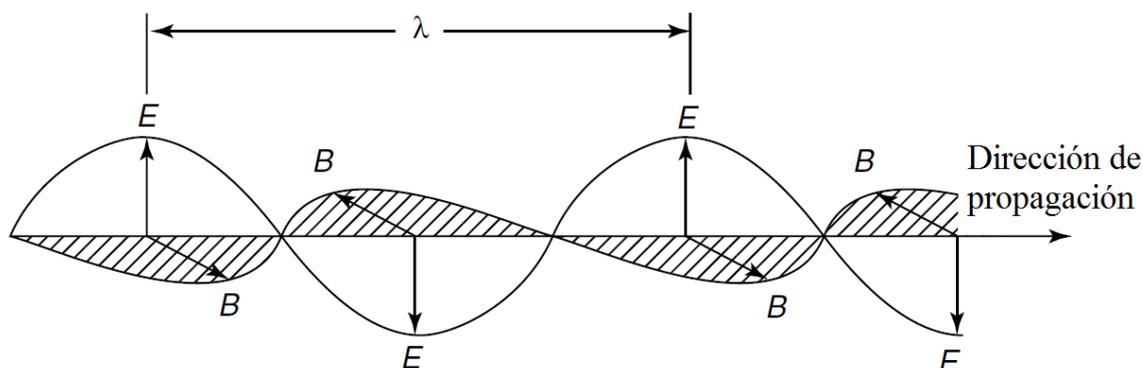


Figura 2.1.2 esquema de los campos que componen una onda electromagnética

Un descubrimiento significativo sobre la radiación electromagnética fue que la velocidad de propagación en el vacío es constante para todas las regiones del espectro. Esto se conoce como la velocidad de la luz, c , y tiene el valor 2.997925×10^8 m/s. Si se visualiza una onda completa que viaja a una distancia fija cada ciclo, se puede observar que la velocidad de esta onda es el producto de la longitud de onda, λ (la distancia entre picos adyacentes) y la frecuencia, ν (el número de ciclos por segundo). Por lo tanto:

$$c = \lambda \nu \quad 2.1.1$$

La presentación de las regiones espectrales puede ser en términos de longitud de onda como metros o submúltiplos de un metro. Las siguientes unidades se encuentran comúnmente en espectroscopia: $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$, $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, $1 \text{ }\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$.

Otra unidad que se usa ampliamente en espectroscopía infrarroja es el número de onda, $\bar{\nu}$, en cm^{-1} . Este es el número de ondas en una longitud de un centímetro y está dado por la siguiente relación:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad 2.1.2$$

Esta unidad tiene la ventaja de ser directamente proporcional a la energía.

Durante el siglo XIX, se realizaron varias observaciones experimentales que no eran consistentes con la visión clásica de que la materia podría interactuar con la energía en forma continua. El trabajo de Einstein, Planck y Bohr indicó que, de muchas maneras, la radiación

electromagnética podría considerarse como una corriente de partículas (o cuantos) para la cual la energía, E , viene dada por la ecuación de Bohr, de la siguiente manera:

$$E = h\nu \quad 2.1.3$$

donde h es la constante de Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34}$ J s) y ν es equivalente a la frecuencia clásica. Los procesos de cambio, incluidos los de vibración y rotación asociados con la espectroscopía infrarroja, se pueden representar en términos de niveles discretos cuantificados de energía E_0 , E_1 , E_2 , etc., como se muestra en la Figura 2.1.3.

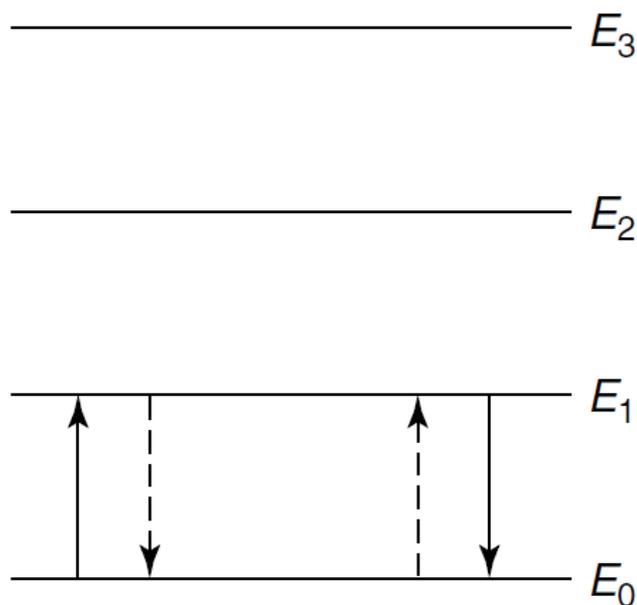


Figura 2.1.3 esquema representativo de los niveles de energía atómicos

Cada átomo o molécula en un sistema debe existir en uno u otro de estos niveles. En un gran conjunto de moléculas, habrá una distribución de todos los átomos o moléculas entre estos diversos niveles de energía. Estos últimos son una función de un número entero (el número cuántico) y un parámetro asociado con el proceso atómico o molecular particular asociado con ese estado. Cada vez que una molécula interactúa con la radiación, se emite o absorbe un cuanto de energía (o fotón). En cada caso, la energía de la cantidad de radiación debe ajustarse exactamente al espacio de energía $E_1 - E_0$ o $E_2 - E_1$, etc. La energía del cuanto se relaciona con la frecuencia de la siguiente manera:

$$\Delta E = h\nu \quad 2.1.4$$

Por lo tanto, la frecuencia de emisión o absorción de radiación para una transición entre los estados de energía E_0 y E_1 está dada por:

$$\nu = (E_1 - E_0)/h \quad 2.1.5$$

Asociado con la absorción de energía de la absorción cuantificada hay algún mecanismo de desactivación mediante el cual el átomo o molécula vuelve a su estado original. Asociado con la pérdida de energía por la emisión de un cuanto de energía o fotón es algún mecanismo de excitación previo. Ambos mecanismos asociados están representados por las líneas punteadas en la Figura 2.1.3.

2.2 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

En esta sección se presenta la descripción de la técnica de UV-Vis y las generalidades de la técnica. Después se comenta sobre la relación entre el espectro y las transiciones moleculares de las moléculas aromáticas. En seguida se establece brevemente de la definición y origen del plasmón de superficie localizado. Por último, se bosqueja el esquema general del espectrómetro de UV-Vis, así como de su fundamento en la ley de Beer-Lambert y la interpretación de la información que proporciona.

Naturaleza de las transiciones electrónicas

La energía total de una molécula es la suma de sus energías electrónica, vibracional, rotacional y traslacional. En la absorción de energía por una molécula en la región UV, se producen cambios en la energía electrónica de la molécula debido a las transiciones de electrones de valencia en la molécula. Estas transiciones consisten en la excitación de un electrón de un orbital molecular ocupado, por ejemplo, un orbital n no enlazante o π enlazante, al siguiente orbital de energía superior, es decir, un orbital antienlazante [1]. El orbital antienlazante se designa con un asterisco. Por lo tanto, la promoción de un electrón, por ejemplo, desde un orbital π enlazante a un antienlazante (π^*) se designa: $\pi \rightarrow \pi^*$ (pi a pi asterisco). Como se muestra en la figura 2.2.1, está claro que la transición $n \rightarrow \pi^*$ requiere menos energía en comparación con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ o $\sigma \rightarrow \sigma^*$.

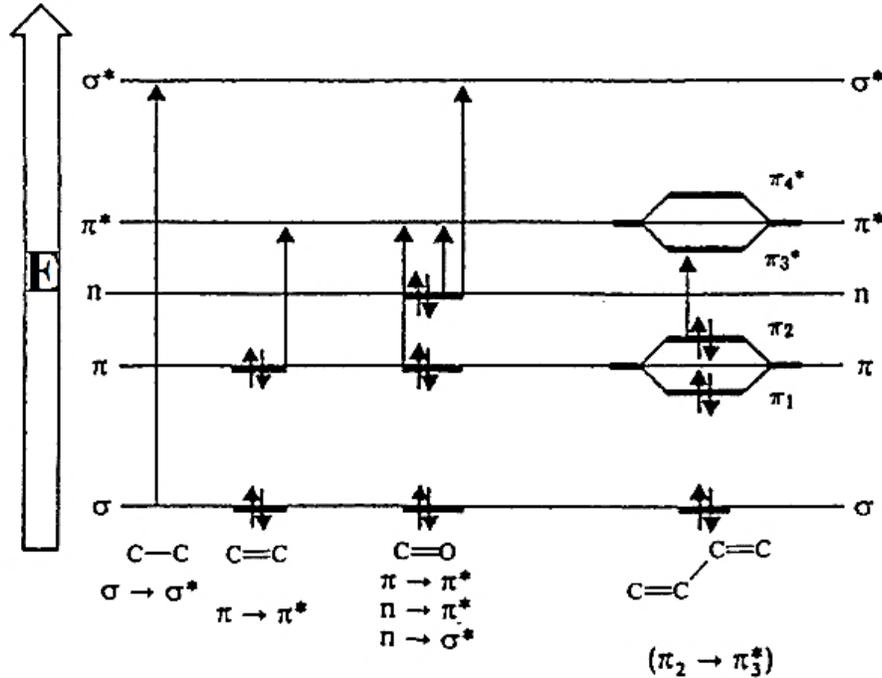


Figura 2.2.1 Energías relativas de algunos enlaces presentes en moléculas orgánicas y sus posibles transiciones [1].

Si la molécula tiene un grupo funcional orgánico, ésta puede tener transiciones electrónicas dependiendo de su naturaleza en el siguiente orden de energías: $n \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \pi \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$.

Cuando una molécula absorbe energía en el UV—Vis, se asume que solo un electrón se excita de un orbital enlazante o no enlazante a un orbital antienlace y los demás no se alteran. En consecuencia, este estado excitado dura alrededor de 10^{-15} segundos. De acuerdo al principio de Franck—Condon [2] durante este fenómeno la molécula no se mueve.

La transición más probable sería del orbital molecular más alto ocupado (conocido en inglés como HOMO) al orbital molecular más bajo desocupado (conocido en inglés como LUMO), pero en muchos casos se pueden observar varias transiciones, dando lugar a varias bandas en el espectro.

El plasmón de resonancia de superficie localizado [3]

El plasmón de resonancia de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés) es un fenómeno óptico generado por una onda de luz incidente en nanopartículas conductoras más

pequeñas que la longitud de onda de la luz. El fenómeno es un resultado de las interacciones entre el campo electromagnético incidente y los electrones de la banda de conducción localizados en la superficie del material. Lo anterior le confiere una fuerte relación entre la parte del espectro en la que se localiza el plasmón y las propiedades de las nanopartículas involucradas, como el tamaño y la forma.

Al ubicarse en la misma región del espectro electromagnético (200—800 nm), los plasmones pueden aparecer junto con las bandas de los compuestos orgánicos en un espectro UV-Vis, lo cual puede llevar a una confusión y malinterpretación de los resultados obtenidos. Sin embargo, como se explicó anteriormente, los máximos debidos a ambos fenómenos son de naturaleza distinta. Las diferencias salen a la luz al comparar otras propiedades, como por ejemplo la sección transversal, la cual puede ser varios órdenes de magnitud mayores para una simple nanopartícula en comparación al mismo volumen ocupado por un compuesto orgánico.

Tras la excitación de una nanopartícula debido a una onda de luz, el campo eléctrico oscilante causa una oscilación coherente de los electrones de conducción. Dicha oscilación desplaza la nube electrónica relativa al núcleo, dando lugar a una fuerza restauradora coulombica resultando en la oscilación de la nube electrónica respecto al núcleo. El campo de resonancia aumentado dentro de la nanopartícula lleva a un campo dipolar exterior a ésta. Dicho campo es el responsable de la absorción aumentada y de la sección transversal de dispersión, así como de fuertes campos electromagnéticos aumentados cercanos a la superficie de la nanopartícula. Las oscilaciones dependen de la forma y tamaño de la distribución electrónica, la densidad de electrones y la masa efectiva del electrón.

En la figura 2.2.2 se resume lo dicho en el párrafo anterior, considerando la interacción de la onda electromagnética con una sola nanopartícula esférica. Una consideración realista del sistema toma en cuenta el metal (índice de refracción) que se trata, el tamaño de la nanopartícula y forma, así como si están o no en suspensión.

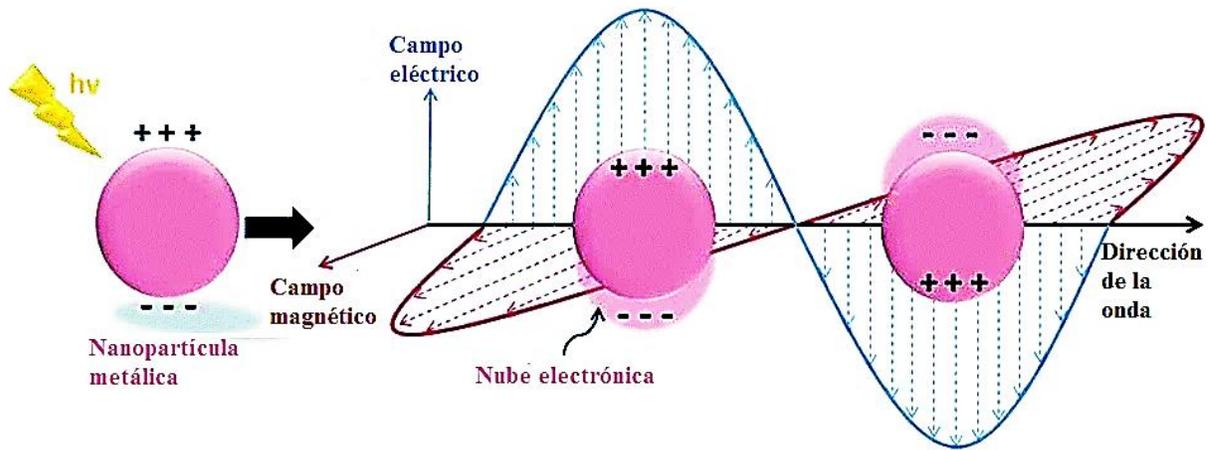


Figura 2.2.2 Esquema simplificado que explica el LSPR para una nanopartícula metálica [4].

Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer—Lambert establece que, cuando la radiación incide en un medio que puede absorber energía, la intensidad de la radiación disminuye en forma proporcional a la longitud del medio absorbente y a la concentración de la especie en el medio que absorbe la radiación.

Para obtener la expresión de la ley de Beer—Lambert puede considerarse una geometría como la siguiente:

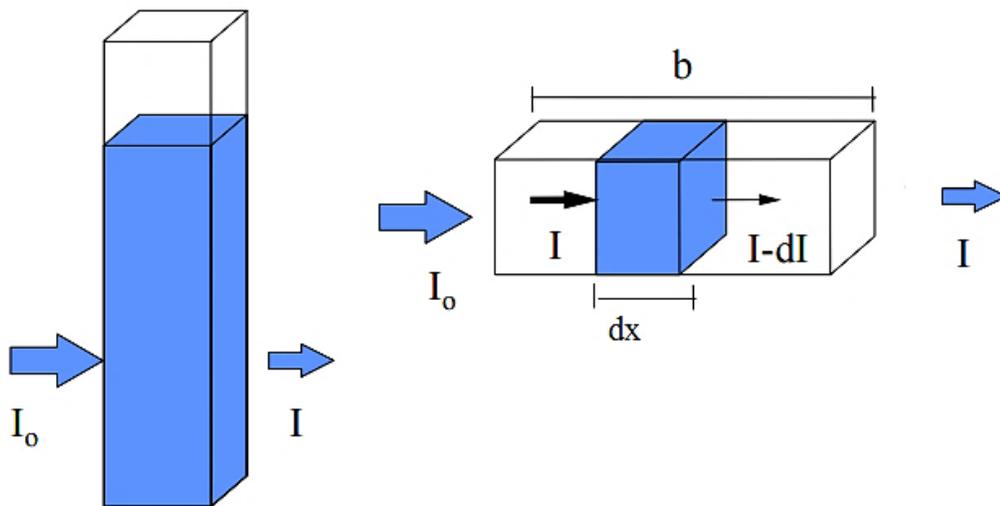


Figura 2.2.3 Esquema de la geometría para la ley de Beer-Lambert

Donde:

I : número de fotones de radiación que pasan por área de sección transversal por segundo

I_0 : intensidad de la luz antes de entrar a la celda

I : intensidad de la luz después de salir de la celda

dx : diferencial de longitud

b : longitud de la celda o camino óptico (cm)

De acuerdo a la ley de Beer—Lambert, sería

$$-N \sim cdx \quad 2.2.1$$

Siendo N el número de especies absorbentes. O bien, en términos de la intensidad del haz

$$-dl = \alpha c l dx \quad 2.2.2$$

Donde α es el coeficiente de absorción. Separando las variables e integrando desde el inicio al final de lo largo de la celda (por donde pasa el haz) se tiene

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^b \alpha c dx \quad 2.2.3$$

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \alpha cb \quad 2.2.4$$

Se definen la transmitancia y la absorbancia (ambas unidades adimensionales) respectivamente como

$$T = \frac{I}{I_0} \quad 2.2.5$$

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = -\log T \quad 2.2.6$$

Así, el resultado de la integral puede expresarse de la forma

$$-2.303 \log T = \alpha cb \quad 2.2.7$$

Lo cual lleva a la sencilla expresión de la ley de Beer—Lambert

$$A = \epsilon bc \quad 2.2.8$$

Con c la concentración (mol/L). Relacionando las variables importantes

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad 2.2.9$$

Esta expresión es usada ampliamente en la química para conocer la concentración de sustancias.

El espectrómetro de UV-Vis

Para estudiar este fenómeno de absorción se utilizan equipos especiales llamados espectrofotómetros. En este trabajo se utilizó un aparato de doble haz, cuyo diseño esquemático es el siguiente:

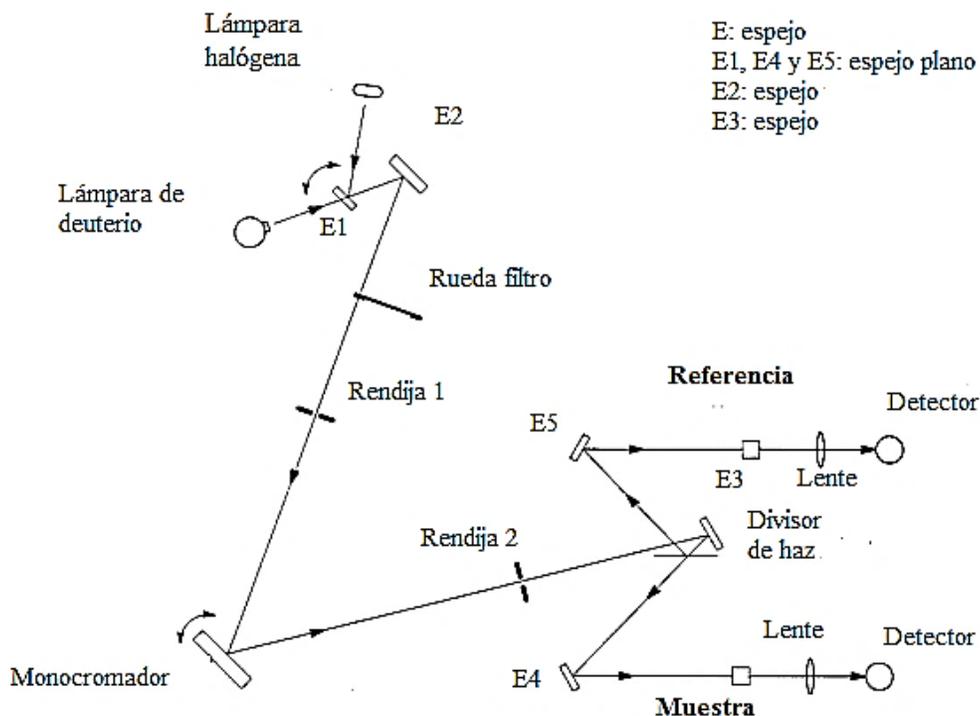


Figura 2.2.4 Esquema de un espectrómetro de UV-Vis doble haz [5]

Como se mencionó antes, la utilidad de esta técnica para la caracterización de las nanopartículas será la de obtener la longitud de onda de máxima absorbancia, para lo cual se hará un barrido de longitudes de onda de la muestra. Con los datos obtenidos se podrá hacer una gráfica *como* la siguiente:

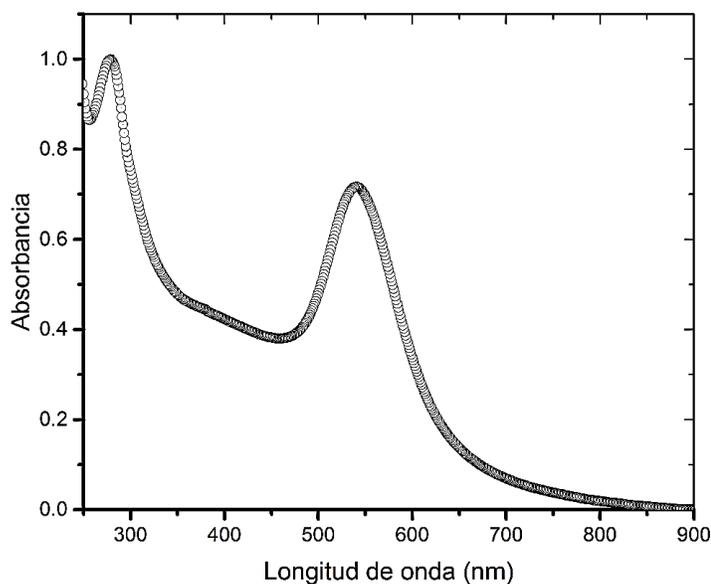


Figura 2.2.5 Gráfica típica ilustrativa de un espectro de UV-Vis perteneciente a nanopartículas Au sintetizadas con *Rumex hymenosepalus*

En la gráfica de la figura 2.2.5 se tienen como ejes horizontal y vertical a la longitud de onda y a la absorbancia, respectivamente. Se muestran dos máximos a longitudes de onda: uno cerca de los 300 nm y otro cerca de los 550 nm. Éstos máximos son de naturalezas diferentes debido a que el primero tiene origen en las transiciones electrónicas de los compuestos fenólicos (como se verá en el siguiente capítulo) presentes en el extracto de *Rumex hymenosepalus* mientras que el segundo se trata de la banda debida a la presencia del LSPR de las nanopartículas de Au en suspensión.

2.3 Espectroscopía infrarroja

Una de las grandes ventajas de la espectroscopía infrarroja es que se puede analizar muestras en diferentes estados de agregación llámese líquido, soluciones, pastas, polvos, películas, fibras y gases. Prácticamente se puede estudiar cualquier muestra en prácticamente cualquier estado. La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente al pasar radiación infrarroja a través de una muestra y determinar qué fracción de la radiación incidente se absorbe en una energía particular. La energía a la que aparece un pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula de muestra. En la parte de esta sección

se describirán las ideas y definiciones básicas asociadas con la espectroscopía infrarroja. Las vibraciones de las moléculas se verán aquí, ya que son cruciales para la interpretación de los espectros infrarrojos. Una vez que se haya completado esta parte, se procederá a hablar sobre el tipo de espectrómetro utilizado y sobre la ubicación de la energía vibracional de los grupos funcionales de interés.

Como la espectroscopía infrarroja ahora se usa en una variedad tan amplia de campos científicos, la última parte de esta sección contendrá un enfoque especial en los grupos funcionales orgánicos que forman parte de las moléculas presentes en el extracto, debido a que es la principal razón por la que se recurrió al uso de esta técnica.

Absorciones infrarrojas

Para que una molécula muestre absorciones de infrarrojos debe poseer una característica específica, es decir, el momento dipolar eléctrico de la molécula debe cambiar durante la vibración. Esta es la regla de selección para espectroscopía infrarroja. La Figura 2.3.1 ilustra un ejemplo de una molécula “activa infrarroja”, una molécula diatómica heteronuclear. El momento dipolar de una molécula de este tipo cambia a medida que el enlace se expande y se contrae. En comparación, un ejemplo de una molécula "infrarroja-inactiva" es una molécula diatómica homonuclear porque su momento dipolar permanece igual sin importar el tiempo del enlace.

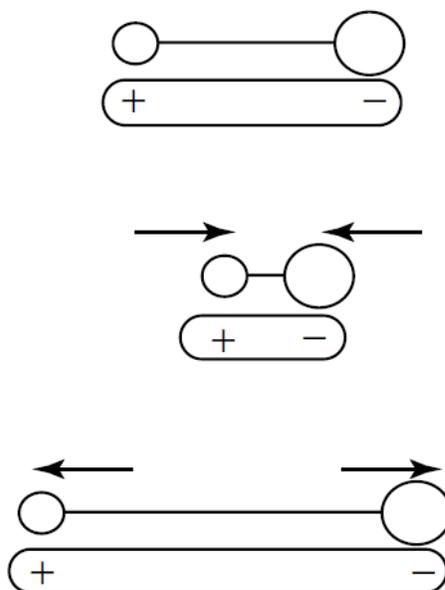


Figura 2.3.1 ejemplo de una molécula activa en IR [6]

Las absorciones de infrarrojos no son infinitamente estrechas y hay varios factores que contribuyen al ensanchamiento [6]. Para los gases, el efecto Doppler, en el que la radiación se desplaza en frecuencia cuando la fuente de radiación se mueve hacia o desde el observador, es un factor. También existe la ampliación de las bandas debido a las colisiones entre moléculas. Otra fuente de ampliación de línea es la vida finita de los estados involucrados en la transición. Desde la mecánica cuántica, cuando la ecuación de Schrödinger se resuelve para un sistema que cambia con el tiempo, los estados de energía del sistema no tienen energías definidas con precisión y esto lleva a una ampliación de la vida útil. Existe una relación entre el tiempo de vida de un estado excitado y el ancho de banda de la banda de absorción asociada con la transición al estado excitado, y esto es una consecuencia del Principio de Incertidumbre de Heisenberg. Esta relación demuestra que cuanto más corta es la vida de un estado, menos definida es su energía.

Modos de vibración normales

Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia se pueden entender en términos de cambios en los dipolos moleculares asociados con vibraciones y rotaciones. Tomando en cuenta un modelo básico, una molécula se puede considerar como un sistema de masas unidas por enlaces con propiedades de tipo resorte. Tomemos primero el caso de moléculas diatómicas, las cuales tienen tres grados de libertad traslacionales y dos grados de libertad rotacionales. Los átomos en las moléculas también pueden moverse uno respecto del otro, es decir, las longitudes de enlace pueden variar o un átomo puede moverse fuera de su plano. Esta es una descripción de los movimientos de estiramiento y flexión que se conocen en conjunto como vibraciones. Para una molécula diatómica, solo es posible una vibración que corresponde al estiramiento y la compresión del enlace. Esto cuenta como un grado de libertad vibracional.

Las moléculas poliatómicas que contienen muchos (N) átomos tendrán $3N$ grados de libertad. Al observar primero el caso de moléculas que contienen tres átomos, se pueden distinguir dos grupos de moléculas triatómicas: lineal y no lineal. Dos ejemplos que representan lo anterior serían CO_2 y H_2O , respectivamente (ilustrado en la Figura 2.3.2).

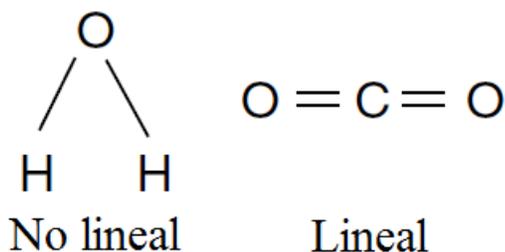


Figura 2.3.2 ejemplos de tipos de moléculas triatómicas: lineal y no lineal

Tanto el CO_2 como el H_2O tienen tres grados de libertad traslacional. El agua tiene tres grados de libertad rotacional, pero la molécula lineal de dióxido de carbono tiene solo dos ya que no hay energía detectable involucrada en la rotación alrededor del eje $\text{O} = \text{C} = \text{O}$. Restando estos de $3N$, hay $3N - 5$ grados de libertad para el CO_2 (o cualquier molécula lineal) y $3N - 6$ para el agua (o cualquier molécula no lineal). N en ambos ejemplos es tres, por lo que el CO_2 tiene cuatro modos de vibración y el agua tiene tres. Los grados de libertad para las moléculas poliatómicas se resumen en la Tabla 2.3.1.

Tabla 2.3.1 grados de libertad para moléculas lineales y no lineales [6]

| Tipos de grados de libertad | Lineal | No lineal |
|-----------------------------|----------|-----------|
| Traslacional | 3 | 3 |
| Rotacional | 2 | 3 |
| Vibracional | $3N - 5$ | $3N - 6$ |
| Total | $3N$ | $3N$ |

Mientras que una molécula diatómica tiene solo un modo de vibración que corresponde a un movimiento de estiramiento, una molécula triatómica de tipo $B - A - B$ no lineal tiene tres modos, dos de los cuales corresponden a movimientos de estiramiento, y el restante de flexión. Una triatómico de tipo lineal tiene cuatro modos, dos de los cuales tienen la misma frecuencia y se dice que son degenerados.

También se usan otros dos conceptos para explicar la frecuencia de los modos vibratorios. Estas son la rigidez del enlace y las masas de los átomos en cada extremo del enlace. La rigidez del enlace se puede caracterizar por una constante de proporcionalidad denominada constante de

fuerza, k (derivada de la ley de Hooke). La masa reducida, μ , proporciona una forma útil de simplificar nuestros cálculos combinando las masas atómicas individuales, y se puede expresar de la siguiente manera [6]:

$$1/\mu = 1/m_1 + 1/m_2 \quad 2.3.1$$

donde m_1 y m_2 son las masas de los átomos en los extremos del enlace. Una forma alternativa práctica de expresar la masa reducida es:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad 2.3.2$$

La ecuación que relaciona la constante de fuerza, la masa reducida y la frecuencia de absorción es:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad 2.3.3$$

Esta ecuación puede modificarse de modo que se pueda hacer un uso directo de los valores de número de onda para las frecuencias vibratorias de enlace, a saber:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad 2.3.4$$

donde c es la velocidad de la luz.

Una molécula solo puede absorber radiación cuando la radiación infrarroja incidente es de la misma frecuencia que uno de los modos fundamentales de vibración de la molécula. Esto significa que el movimiento vibratorio de una pequeña parte de la molécula aumenta mientras que el resto de la molécula no se ve afectado.

Las vibraciones pueden implicar un cambio en la longitud del enlace (estiramiento) o su ángulo (flexión) (Figura 2.3.3). Algunos enlaces se pueden estirar en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), como se muestra en la Figura 2.3.4. Si una molécula tiene diferentes átomos terminales tales como HCN, ClCN u ONCl, entonces los dos modos de estiramiento ya no son vibraciones simétricas y asimétricas de enlaces similares, sino que tendrán proporciones variables del movimiento de estiramiento de cada grupo. En otras palabras, la cantidad de acoplamiento variará.

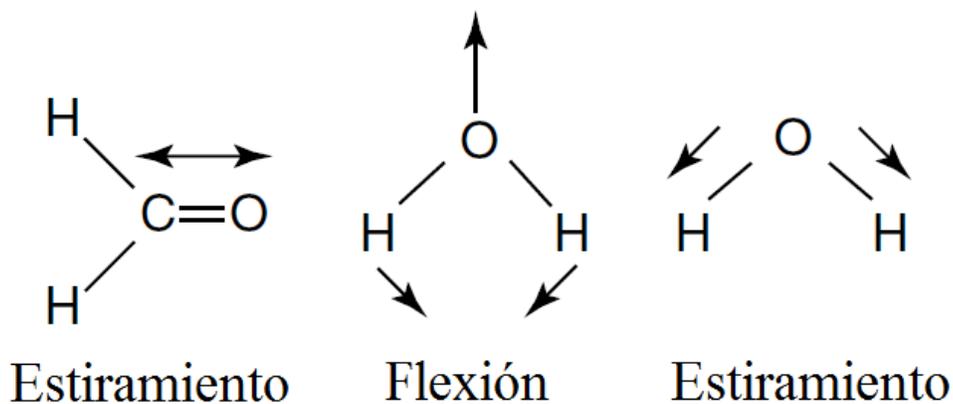


Figura 2.3.3 tipos de vibraciones [6]

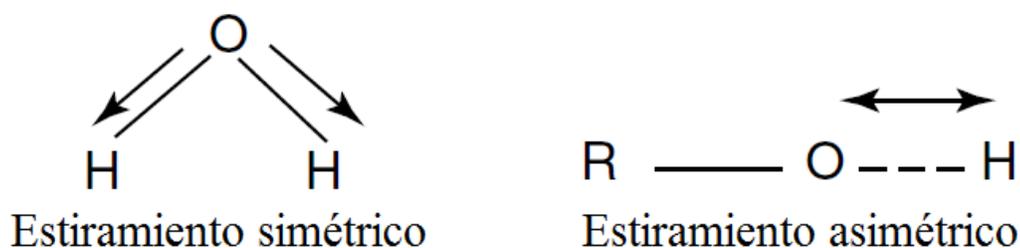


Figura 2.3.4 tipos de estiramientos [6]

Las vibraciones de flexión también contribuyen a los espectros infrarrojos y estos se resumen en la Figura 2.3.5. Lo mejor es considerar la molécula cortada por un plano a través de los átomos de hidrógeno y el átomo de carbono. Los hidrógenos pueden moverse en la misma dirección o en direcciones opuestas a este plano. Para moléculas más complejas, el análisis se vuelve más simple ya que los átomos de hidrógeno se pueden considerar en aislamiento porque generalmente están unidos a partes más masivas y, por lo tanto, más rígidas de la molécula. Esto produce vibraciones de flexión en el plano y fuera del plano, como se ilustra en la Figura 2.3.5.

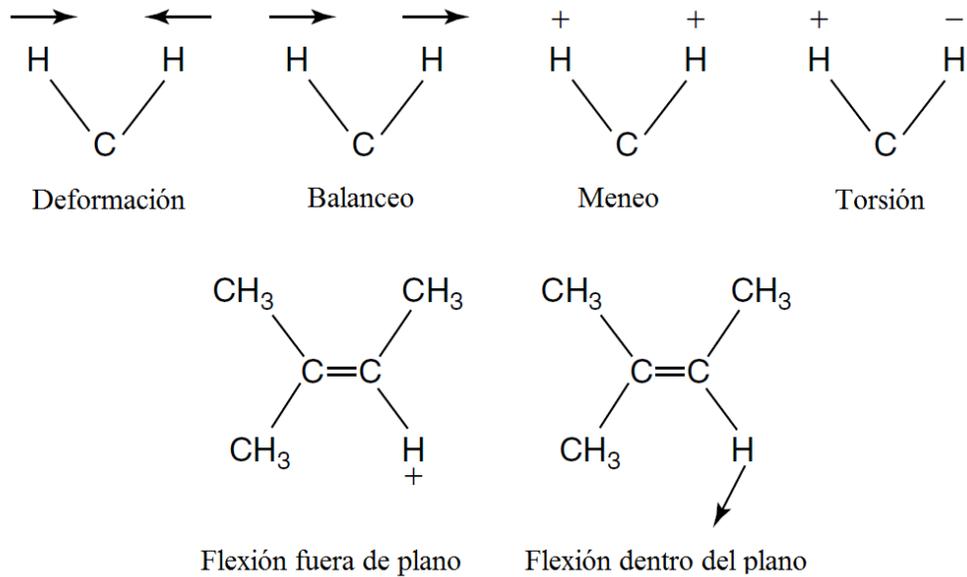


Figura 2.3.5 tipos de flexiones [6]

Como ya se mencionó, para que una vibración dé lugar a la absorción de radiación infrarroja, debe provocar un cambio en el momento dipolar de la molécula. Cuanto mayor sea este cambio, más intensa será la banda de absorción.

Las moléculas simétricas tendrán menos vibraciones “activas en infrarrojos” que las moléculas asimétricas. Esto lleva a la conclusión de que las vibraciones simétricas generalmente serán más débiles que las vibraciones asimétricas, ya que las primeras no conducirán a un cambio en el momento dipolar. Se deduce que la flexión o estiramiento de los enlaces que implican átomos en grupos ampliamente separados de la tabla periódica conducirá a bandas intensas. Las vibraciones de enlaces como $C - C$ o $N = N$ darán bandas débiles. Lo anterior es consecuencia del pequeño cambio en el momento dipolar asociado con sus vibraciones.

Existirán muchas vibraciones diferentes incluso para moléculas bastante simples. La complejidad de un espectro infrarrojo surge del acoplamiento de vibraciones en una gran parte de o sobre la molécula completa. Tales vibraciones se llaman vibraciones esqueléticas. Las bandas asociadas con las vibraciones esqueléticas probablemente se ajusten a un patrón o huella digital de la molécula como un todo, en lugar de a un grupo específico dentro de la molécula.

Espectrómetros infrarrojos de transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) se basa en el principio de la interferencia de la radiación entre dos haces para producir un interferograma. Esta última es una señal producida como una función del cambio de longitud de trayectoria entre los dos haces [6]. Los dos dominios de distancia y frecuencia son interconvertibles por el método matemático de la transformada de Fourier.

La radiación que emerge de la fuente pasa a través de un interferómetro a la muestra antes de llegar a un detector. Tras la amplificación de la señal, en la cual las contribuciones de alta frecuencia han sido eliminadas por un filtro, los datos se convierten a formato digital mediante un convertidor de analógico a digital y se transfieren a la computadora para llevar a cabo la transformada de Fourier [6].

El interferómetro de Michelson

El interferómetro más común utilizado en la espectrometría FTIR es un interferómetro de Michelson, que consiste en dos espejos planos perpendiculares, uno de los cuales puede viajar en una dirección perpendicular al plano (Figura 2.3.6). Una película semi-reflectante, el divisor de haz, divide los planos de estos dos espejos. El material del divisor de haz debe elegirse de acuerdo con la región que se va a examinar [6]. Materiales tales como germanio u óxido de hierro se recubren sobre un sustrato transparente al infrarrojo como bromuro de potasio o yoduro de cesio para producir divisores de haz para las regiones del infrarrojo medio o cercano. Películas orgánicas delgadas, como poli (tereftalato de etileno), se utilizan en la región del infrarrojo lejano.

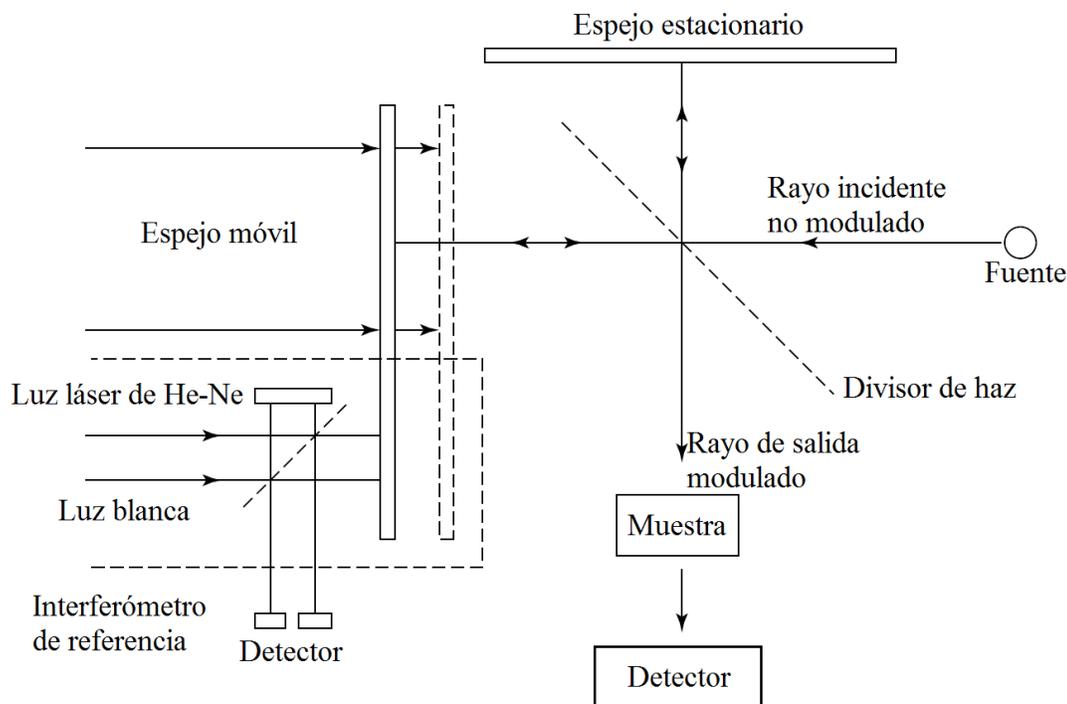


Figura 2.3.6 esquema de un interferómetro de Michelson típico [6]

Si se envía un haz colimado de radiación monocromática de longitud de onda λ a un divisor de haz ideal, la mitad de la radiación incidente se reflejará en uno de los espejos, mientras que la otra mitad se transmitirá al otro espejo. Los dos haces se reflejan desde estos espejos, volviendo al divisor del haz donde se recombinan e interfieren. La mitad del haz reflejado desde el espejo fijo se transmite a través del divisor del haz, mientras que la otra mitad se refleja hacia atrás en la dirección de la fuente. El haz que emerge del interferómetro a 90° con respecto al haz de entrada se denomina haz transmitido y este es el haz detectado en la espectrometría FTIR [6].

El espectro y sus modos de visualización

La escala de ordenadas se puede presentar en % de transmitancia con 100% en la parte superior del espectro. Es común tener una opción de absorbancia o transmitancia como una medida de la intensidad de la banda. La relación entre estas dos cantidades se describió en la sección 2.2 por medio de la ley de Beer-Lambert. Se reduce a la preferencia personal cuál de los dos modos usar, pero la transmitancia se usa tradicionalmente para la interpretación espectral, mientras que la absorbancia se usa para el trabajo cuantitativo.

Moléculas orgánicas

Una de las aplicaciones más comunes de la espectroscopía infrarroja es la identificación de compuestos orgánicos. Las principales clases de moléculas orgánicas se examinan sucesivamente en este capítulo y se detallan las frecuencias útiles del grupo. También se proporcionan una serie de preguntas para practicar la asignación de bandas observadas en espectros infrarrojos orgánicos y para usar los espectros para caracterizar las estructuras de las moléculas orgánicas.

Compuestos aromáticos [6]

Los compuestos aromáticos muestran bandas infrarrojas características útiles en cinco regiones del espectro del infrarrojo medio (Tabla 2.3.2). Las bandas de estiramiento C-H de compuestos aromáticos aparecen en el rango de 3100-3000 cm^{-1} , por lo que es fácil diferenciarlas de las producidas por grupos alifáticos C-H que aparecen por debajo de 3000 cm^{-1} . En la región de 2000-1700 cm^{-1} , aparece una serie de bandas débiles de combinación y armónicos y el patrón de las bandas de armónicos refleja el patrón de sustitución del anillo de benceno. Las vibraciones esqueléticas, que representan estiramiento C = C, absorben en el rango de 1650-1430 cm^{-1} . Las bandas de flexión C-H aparecen en las regiones 1275-1000 cm^{-1} (flexión en el plano) y 900-690 cm^{-1} (flexión fuera del plano). Las bandas de las vibraciones de flexión fuera del plano de compuestos aromáticos son fuertes y características del número de hidrógenos en el anillo, y por lo tanto se pueden usar para dar el patrón de sustitución.

Tabla 2.3.2 asignación de bandas IR a grupos aromáticos

| Número de onda (cm^{-1}) | Asignación |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 3100 – 3000 | Estiramiento C – H |
| 2000 – 1700 | Sobretonos y bandas de combinación |
| 1600 – 1430 | Estiramiento C = H |
| 1275 – 1000 | Flexión dentro del plano C – H |
| 900 – 690 | Flexión fuera del plano C – H |

Alcoholes y fenoles [6]

Los alcoholes y fenoles producen bandas infrarrojas características debido al estiramiento O-H y al estiramiento C-O, ambos sensibles a los enlaces de hidrógeno. Para los alcoholes, la banda ancha de estiramiento O-H está centrada en 3600 cm^{-1} , mientras que para los fenoles esta banda aparece $50\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ más abajo que en el caso del alcohol. El estiramiento C-O en alcoholes y fenoles produce una banda fuerte en la región de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Las principales bandas para estos compuestos se muestran en la Tabla 2.3.3.

Tabla 2.3.3 asignación de bandas IR a alcoholes y fenoles, éteres y ésteres [6]

| Número de onda (cm^{-1}) | Asignación |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| | Alcohol y fenoles |
| 3600 | Estiramiento O – H del alcohol |
| 3550 – 3500 | Estiramiento O – H del fenol |
| 1300 – 1000 | Estiramiento C – O |
| | Éteres |
| 1100 | Estiramiento C – O – C |
| | Ésteres |
| 1750 – 1730 | Estiramiento C = O alifático |
| 1730 – 1705 | Estiramiento C = O aromático |
| 1310 – 1250 | Estiramiento C – O aromático |
| 1300 – 1100 | Estiramiento C – O alifático |

Éteres [6]

Los éteres se pueden identificar por una fuerte banda de estiramiento C-O cerca de 1100 cm^{-1} debido al enlace C-O-C en este tipo de compuesto (ver Tabla 2.3.3). Los éteres aromáticos muestran una banda fuerte cerca de 1250 cm^{-1} , mientras que los éteres cíclicos muestran una banda de estiramiento C-O en un amplio rango de $1250\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

Ésteres [6]

Los dos enlaces más polares en ésteres (que contienen la unidad -CO-O-C) son los enlaces C = O y C-O y estos enlaces producen las bandas más fuertes en el espectro de cualquier éster (resumido en la Tabla 2.3.3). Los ésteres aromáticos y alifáticos pueden diferenciarse, ya que tanto el estiramiento C = O como las vibraciones de estiramiento C-O producen bandas en diferentes rangos: los ésteres alifáticos producen bandas C = O y C-O a 1750-1730 y 1300-1100 cm^{-1} , respectivamente, mientras que los ésteres aromáticos producen bandas C = O y C-O a 1730-1705 y 1310-1250 cm^{-1} , respectivamente.

2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles disponibles para el examen y análisis de la morfología de la microestructura y las caracterizaciones de la composición química.

El SEM utiliza un haz de electrones enfocado para escanear sistemáticamente la superficie de la muestra, produciendo un gran número de señales de electrones que se convierten eventualmente en una señal visual que se muestra en un tubo de rayos catódicos (CRT por sus siglas en inglés).

La formación de imágenes en el SEM depende de la adquisición de señales producidas por el haz de electrones y las interacciones entre muestras. Estas interacciones se pueden dividir en dos categorías principales: interacciones elásticas e interacciones inelásticas. La dispersión elástica resulta de la deflexión del electrón incidente por el núcleo atómico de la muestra o por electrones de la cubierta exterior de energía similar. Este tipo de interacción se caracteriza por una pérdida de energía despreciable durante la colisión y por un cambio direccional de gran ángulo del electrón disperso. Los electrones incidentes que se dispersan elásticamente en un ángulo de más de 90° se llaman electrones retrodispersados (BSE) y producen una señal útil para obtener imágenes de la muestra. La dispersión inelástica ocurre a través de una variedad de interacciones entre los electrones incidentes y los electrones y átomos de la muestra, y da como resultado que el haz primario de electrones transfiera energía sustancial a ese átomo. La cantidad de pérdida de energía depende de si los electrones de la muestra se excitan individual o colectivamente y de la energía de enlace del electrón con el átomo. Como resultado, la excitación de los electrones de la muestra durante la ionización de los átomos de la muestra

conduce a la generación de electrones secundarios (SE), que se definen convencionalmente como poseedores de energías de menos de 50 eV y pueden utilizarse para obtener imágenes o analizar la muestra. Además de las señales que se utilizan para formar una imagen, se producen otras señales cuando un haz de electrones incide sobre una muestra, incluida la emisión de rayos X característicos, electrones Auger y catodoluminiscencia. La Figura 2.4.1 muestra las regiones desde las cuales se detectan diferentes señales [7].

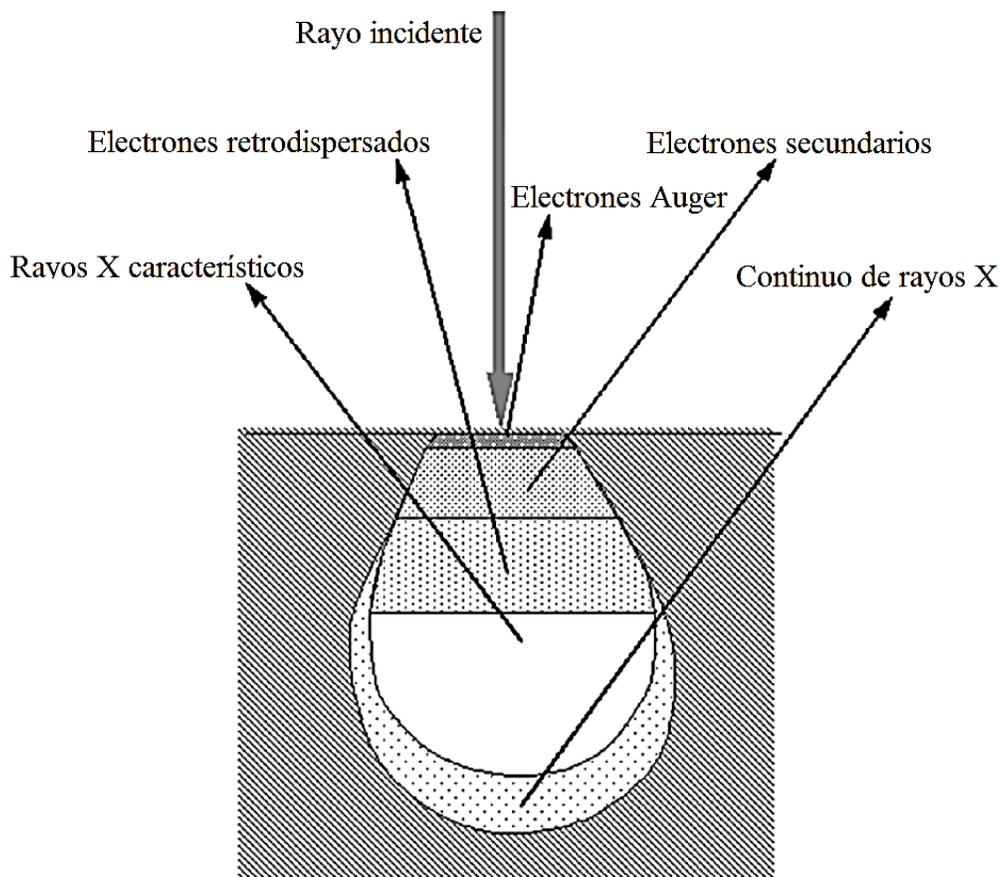


Figura 2.4.1 interacción electrones – muestra y productos que se obtienen [7]

En la mayoría de los casos, cuando el electrón incidente golpea la superficie de la muestra, en lugar de rebotar inmediatamente, los electrones energéticos penetran en la muestra a cierta distancia antes de que se encuentren y colisionen con un átomo de la muestra. Al hacerlo, el haz primario de electrones produce lo que se conoce como una región de excitación primaria, a partir de la cual se produce una variedad de señales. El tamaño y la forma de esta zona es dependiente

en gran medida de la energía de haz de electrones y el número atómico, y por lo tanto la densidad, de la muestra.

La Figura 2.4.2 muestra una estructura de columna de un SEM convencional. El cañón de electrones, que está en la parte superior de la columna, produce los electrones y los acelera a un nivel de energía de 0.1 - 30 keV. El diámetro del haz de electrones producido por la pistola de tungsteno en horquilla es demasiado grande para formar una imagen de alta resolución. Por lo tanto, las lentes y las aperturas electromagnéticas se utilizan para enfocar y definir el haz de electrones y para formar una pequeña mancha electrónica enfocada en la muestra. Este proceso demagnifica el tamaño de la fuente de electrones ($\sim 50 \mu\text{m}$ para un filamento de tungsteno) hasta el tamaño de punto requerido final (1-100 nm). Es necesario un entorno de alto vacío, que permita el desplazamiento de electrones sin dispersión por el aire. La plataforma de la muestra, las bobinas de barrido de electrones, la detección de señal y el sistema de procesamiento proporcionan observación en tiempo real y grabación de imágenes de la superficie de la muestra.

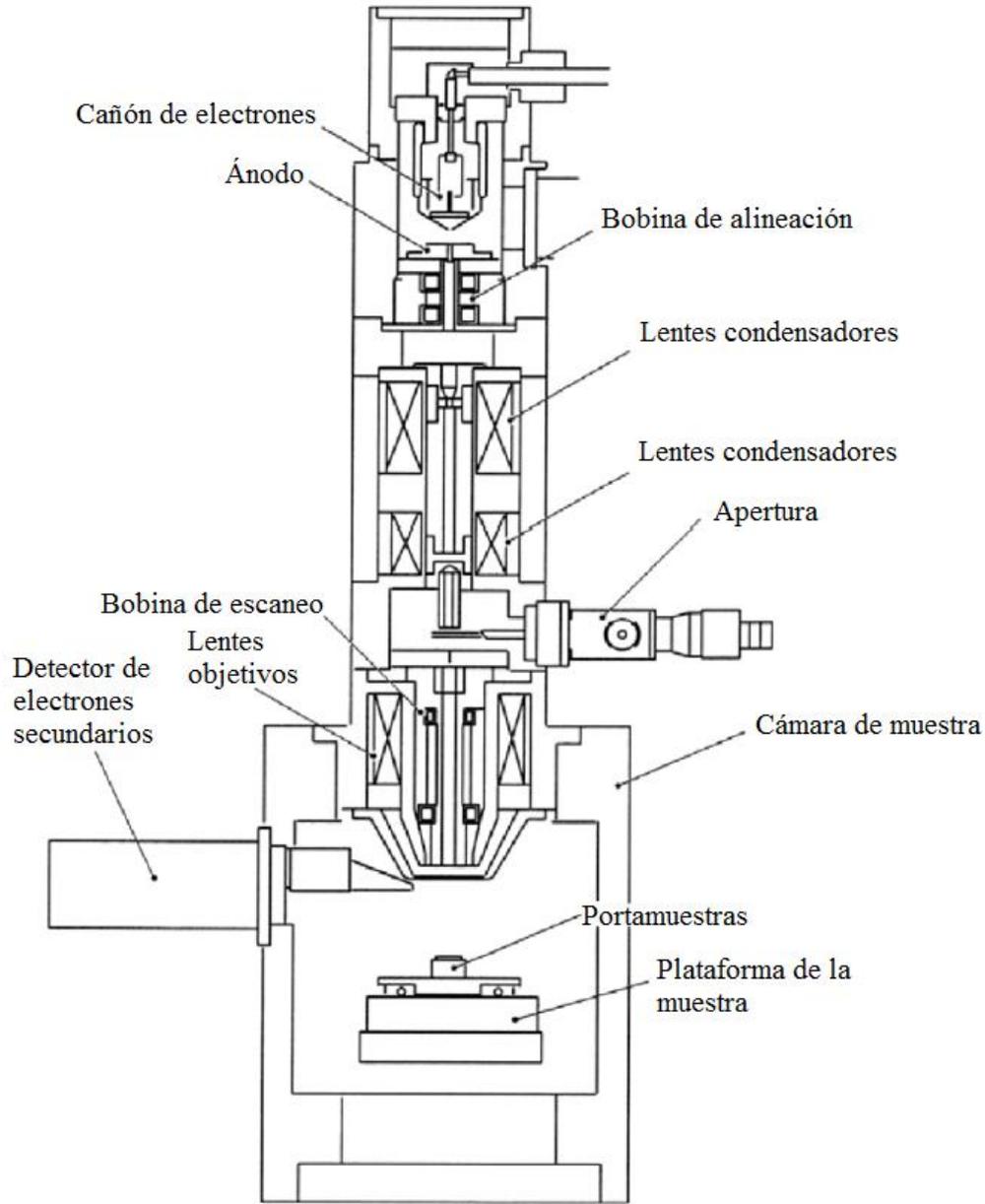


Figura 2.4.2 diagrama de un SEM típico [7]

2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En esta sección se presenta la descripción de la técnica de TEM. Se describen las generalidades de la técnica, enseguida se establecen los parámetros o propiedades importantes para la técnica, así como sus expresiones. Finalmente se describen las dos variaciones de esta técnica que se usaron en el proceso de caracterización: TEM convencional y TEM en modo barrido (STEM).

El microscopio electrónico de transmisión (transmission electron microscope o TEM en inglés) es un equipo de suma utilidad en las biociencias y nanotecnología. Con él se pueden examinar muestras en una (como capas individuales, nanotubos, nanocables y nanopartículas), dos (interfaces) y tres (multicapas, semiconductores y estructuras con nanoporos) dimensiones. En la figura 2.5.1 se muestra un diagrama de las partes de un microscopio electrónico de transmisión.

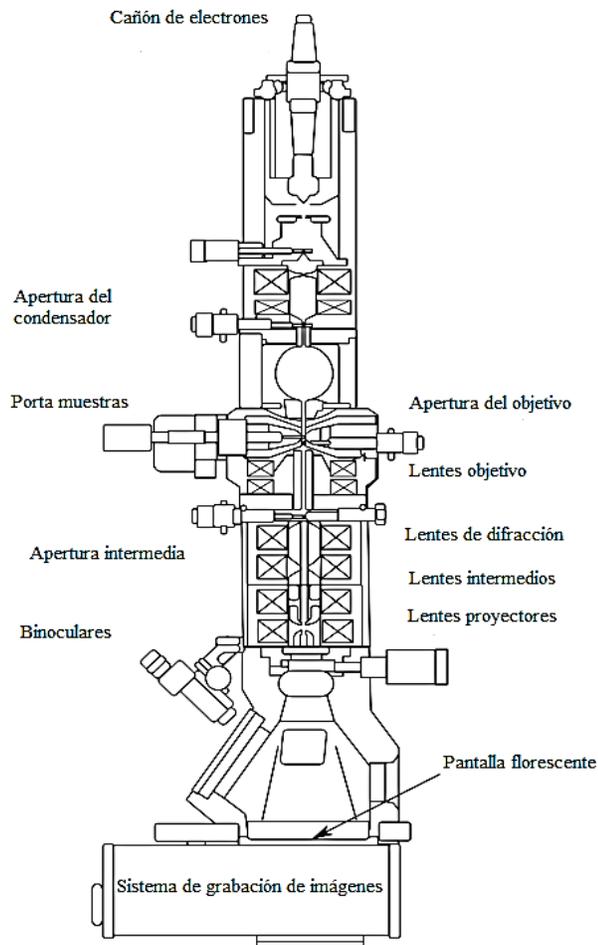


Figura 2.5.1 Diagrama de un TEM típico [8]

La distancia más corta entre dos puntos que puede resolverse es la resolución o el poder de resolución de un microscopio, ya sea de luz visible o TEM. Es más fácil pensar en la resolución de una imagen TEM en términos del criterio de Rayleigh clásico para los microscopios de luz visible (Visible Light Microscope o VLM en inglés), que establece que la distancia más pequeña que se puede resolver, δ , viene dada aproximadamente por

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{\mu \text{sen } \theta} \quad 2.5.1$$

Donde λ es la longitud de onda de la radiación, μ el índice de refracción del medio de visualización, y θ el semi-ángulo de la recopilación de la lente de aumento. En aras de la simplicidad podemos aproximar $\mu \text{sen } \theta$ (llamada a veces la apertura numérica) a la unidad por lo que la resolución es igual a la mitad de la longitud de onda de la luz.

La famosa ecuación de Louis de Broglie muestra que la longitud de onda de los electrones está relacionada con su energía E , y si ignoramos los efectos relativistas, podemos mostrar que aproximadamente:

$$\lambda = \frac{1.22}{E^{1/2}} \quad 2.5.2$$

En esta ecuación E se encuentra en eV y λ en nm.

Esta relación muestra que al aumentar la energía podemos reducir la longitud de onda de la radiación emitida y, por ende, lograr una mejor resolución. El problema es que aún no se han construido microscopios capaces de obtener enormes resoluciones (menores a 0.1 nm) debido a la imperfección actual de las lentes de electrones. Igual que en los VLM, aquí también se presentan aberraciones esféricas y cromáticas, sobre las cuales se trabaja para obtener mejores imágenes.

Los electrones son un tipo de radiación ionizante, que es el término general que se da a la radiación que es capaz de eliminar los electrones fuertemente unidos por el campo atractivo del núcleo, mediante la transferencia de parte de su energía a los átomos individuales en la muestra. Una de las ventajas del uso de esta radiación es que produce una amplia gama de señales secundarias de la muestra, algunas de ellas utilizadas en la microscopía electrónica analítica (analytical electron microscopy o AEM en inglés) que utiliza la espectrometría de rayos X de dispersión de energía (X-ray energy-dispersive spectrometry o EDS en inglés) y la espectrometría de pérdida de energía de electrones (electron energy-loss spectrometry o EELS en inglés).

Con el fin de obtener la mejor señal de nuestras muestras que tenemos que poner la mejor señal, y por esto la fuente de electrones es crítica. En consecuencia, los TEM modernos son muy buenos instrumentos generadores de señal. Algunos hasta combinan TEM y la tecnología del microscopio electrónico de barrido (scanning electron microscope o SEM en inglés) para crear el microscopio electrónico de transmisión de barrido (scanning transmission electron

microscope o STEM en inglés). El STEM es la base para los AEM y un microscopio de barrido de imágenes único propio.

La profundidad de campo de un microscopio es una medida de la cantidad de qué tanto del objeto que estamos observando permanece enfocado al mismo tiempo; el término profundidad de foco se refiere a la distancia sobre la que la imagen puede moverse con respecto al objeto y todavía permanecer enfocada. Las lentes del TEM gobiernan estas propiedades tal como lo determina la resolución. Una forma de mejorar su rendimiento es insertar muy pequeñas aberturas limitantes, estrechando el haz hasta un 'lápiz' de electrones fino a lo sumo de unos pocos micrómetros de diámetro.

Si bien esta gran profundidad de campo se utiliza principalmente en el SEM para producir imágenes 3D de las superficies de las muestras con grandes cambios en la topografía, esto también es fundamental en el TEM. Resulta que, en el TEM, la muestra está por lo general enfocada de la superficie superior e inferior, al mismo tiempo, independientemente de su topografía, siempre y cuando sea transparente a los electrones.

Además, se puede grabar la imagen final en diferentes posiciones por debajo de la lente final del instrumento y todavía estará enfocada. Con el VLM, a menos que la superficie de la muestra sea plana dentro de la longitud de onda de la luz, no estará todo enfocado al mismo tiempo.

La difracción de electrones es una parte indispensable del TEM y es sin duda el aspecto más útil para los científicos de materiales y nanotecnólogos para quienes la estructura cristalina es una característica esencial cuando se trata de controlar las propiedades. Una de las ventajas es que el patrón de difracción puede ser vinculado a la imagen del área de la muestra de la que procede, y si se converge el haz del TEM paralelo a una sonda centrada, entonces se pueden producir patrones convergentes de haces aún más llamativos del que se puede realizar un análisis de simetría cristalino completo de los cristales minúsculos.

El precio a pagar por cualquier técnica de formación de imágenes de alta resolución es que sólo se mira a una pequeña parte de la muestra en un momento dado. Cuanto mayor sea la resolución, peor es la capacidad de muestreo del instrumento.

Otro problema es que el TEM nos presenta imágenes en 2D de muestras 3D, vistos en la transmisión. Es decir, una imagen TEM no tiene sensibilidad de profundidad como otras técnicas que son sensibles a la superficie o a lo profundo. Se requieren técnicas adicionales si se requiere la caracterización completa de la muestra.

Un efecto perjudicial de la radiación ionizante es que puede dañar las muestras, particularmente polímeros o ciertos minerales y cerámicas. Algunos aspectos de los daños del haz se acentúan a voltajes más altos, y mientras que instrumentos comerciales que ofrecen hasta 400 kV, los daños causados pueden limitar mucho de lo que hacemos en el TEM, incluso con metales refractores. Sin embargo, se pueden combinar fuentes de electrones más intensos con detectores de electrones más sensibles y utilizar la ampliación del equipo de imágenes con ruido para minimizar la dosis total que recibe la muestra a niveles por debajo del umbral de daño. Las técnicas de microscopía de dosis mínima, combinadas con el enfriamiento de las muestras (criomicroscopía) y cámaras de dispositivo de carga acoplada (charge coupled device o CCD, en inglés) de bajo ruido, son enfoques estándar en la TEM biológica y permiten obtener imágenes incluso cuando sólo unos pocos cientos de electrones por nanómetro cuadrado están golpeando la muestra.

Las muestras tienen que ser transparentes a los electrones, es decir, se requiere utilizar muestras con espesores menores a 100 nm. En casos extremos, como el TEM de alta resolución (High Resolution Transmission Electron Microscope o HRTEM en inglés) o espectrometría de electrones, son esenciales espesores <50 nm (incluso <10 nm).

Un TEM moderno es esencialmente una columna de electro-óptica en la que se puede mantener un buen vacío, pero las lentes y la mayoría de otras funciones pueden ser controladas por una o más computadoras. Una máquina de 200 o 300 keV puede combinar aspectos de HRTEM, STEM y AEM.

De hecho, el TEM demuestra de rutina características de partícula y de onda del electrón. Primero, podemos relacionar el momento p de la partícula con su longitud de onda λ a través de la constante de Planck mediante

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad 2.5.3$$

En el TEM se imparte un momento al electrón para acelerarlo mediante una caída de potencial V , dándole una energía cinética eV . Esta energía potencial debe ser igual a la energía cinética, por lo tanto

$$eV = \frac{m_0 v^2}{2} \quad 2.5.4$$

Donde m_0 es la masa del electrón y v es su velocidad. Despejando la velocidad de la ecuación anterior y sustituyendo en la definición de momento lineal mv

$$p = m_0 v = (2m_0 eV)^{1/2} \quad 2.5.5$$

Estas ecuaciones definen la relación entre la longitud de onda del electrón λ , y el potencial de aceleración del microscopio electrónico V , mediante

$$\lambda = \frac{h}{(2m_0 eV)^{1/2}} \quad 2.5.6$$

Aunque el tratamiento anterior fue no relativista, es necesario considerar que para energías mayores de alrededor de 100 keV los electrones viajan a un poco más de la mitad de la velocidad de la luz. Por esta razón, es necesario modificar la ecuación anterior para transformarla en la siguiente [8]

$$\lambda = \frac{h}{[2m_0 eV(1 + \frac{eV}{2m_0 c^2})]^{1/2}} \quad 2.5.7$$

Detector Anular para Dispersión a Grandes Ángulos-Campo Oscuro (HAADF)

En la técnica HAADF empleado en un equipo STEM, un gran detector con geometría anular es colocado en un sitio lejano respecto a la muestra, como se ilustra en la figura 2.5.2.

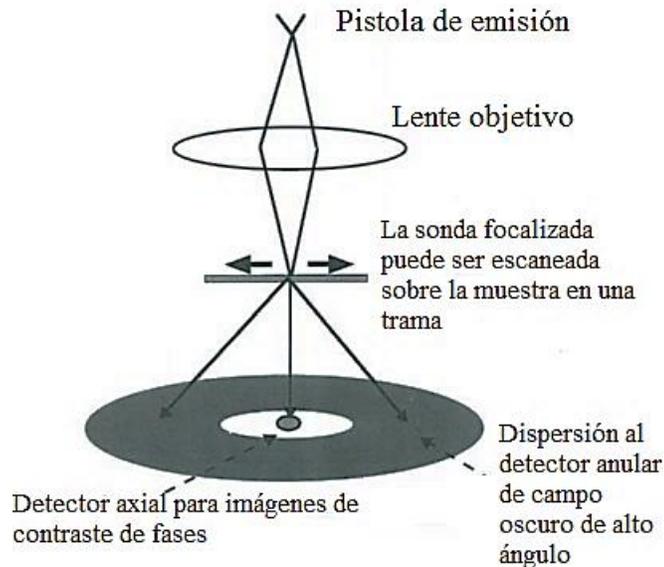


Figura 2.5.2 Esquema simplificado de un equipo STEM mostrando la geometría de un detector HAADF (campo oscuro) y el detector para imágenes de campo claro [9].

La intensidad recabada en todo el detector es guardada y desplegada como una función de la posición de la sonda de iluminación. Debido a que el detector procesa solo los electrones

dispersados entonces cuando no hay muestra (solo el vacío) no habrá señal detectada a lo que corresponderá una “imagen” oscura y de ahí el nombre de campo oscuro. Cuanto más pesado es el átomo del elemento químico que está en la muestra mayor será la intensidad de dispersión lo cual lleva a un contraste por número atómico (contraste Z) en la imagen, apareciendo más brillantes a mayor Z cuando utilizamos HAADF. Como es de suponerse esta técnica es idónea para la identificación de elementos químicos de grandes números atómicos dentro de la muestra o bien, para contrastar elementos químicos que cumplan $Z_1 \gg Z_2$ para un apropiado contraste. En la práctica, la muestra es caracterizada procesando simultáneamente la señal en campo oscuro (HAADF) y en campo claro para fines de comparación, tal como se muestra en la figura 2.5.3 para una muestra de nanopartículas bimetálicas de Au ($Z=79$) y Ag ($Z=47$).

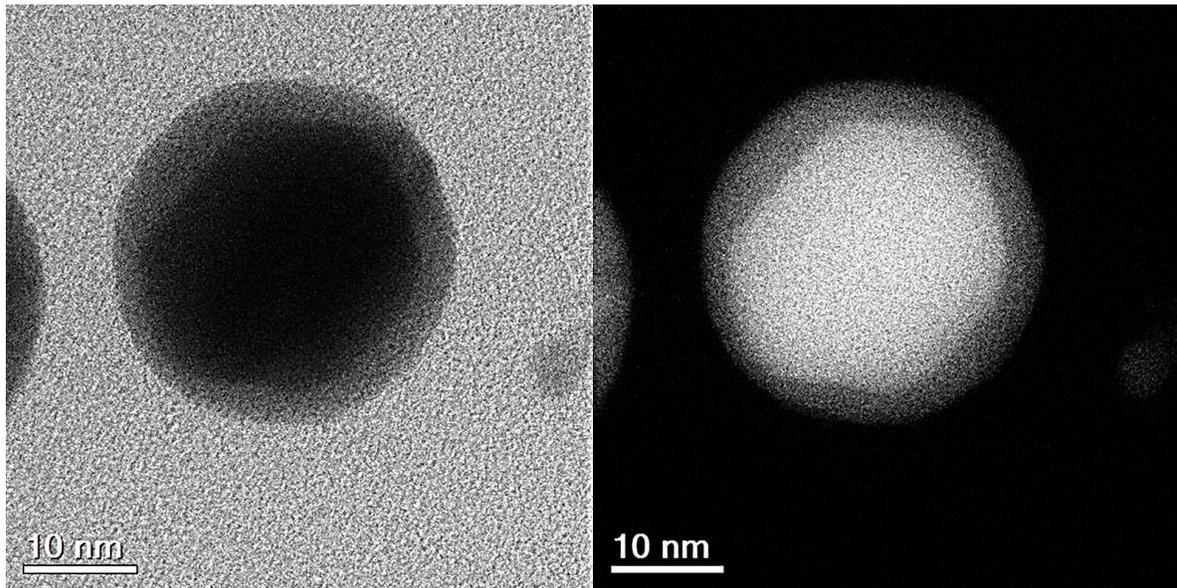


Figura 2.5.3 Nanopartícula bimetálica de Au y Ag procesadas en un equipo STEM con detectores para campo claro (izquierda) y HAADF (derecha)

Para finalizar podemos mencionar que en un detector típico de campo claro los electrones que llegan provienen de una dispersión menor de 10 mrad ($\sim 0.6^\circ$) mientras que en detector HAADF la señal proviene de electrones dispersados a ángulos mayores de 50 mrad ($\sim 3^\circ$) medidos respecto al eje del haz incidente [10].

2.6 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X (DRX) es una herramienta importante que sirve para identificar, cuantificar y caracterizar materiales cristalinos. Esta sección brinda información básica sobre la física del proceso de difracción de rayos X.

Antes de que describamos la teoría de la difracción de rayos X, es necesario explicar dos conceptos: qué es una celda unitaria y cómo se pueden manejar los planos de red difractantes de una manera conveniente. Los minerales cristalinos son caracterizados de forma única por su composición química y por la disposición tridimensional de los átomos en su estructura. La unidad más pequeña que contiene toda la información estructural y química necesaria para definir un cristal de manera única se denomina celda unitaria [11] (Figura 2.6.1). Un cristal macroscópico consiste en una disposición ordenada tridimensional de tales celdas unitarias.

Los conjuntos de tres coordenadas mencionadas en la Figura 2.6.1 se refieren a las coordenadas de los átomos individuales en la celda unitaria a lo largo de los ejes x , y y z . La celda unitaria tiene las dimensiones a , b y c a lo largo de estos ejes. Para determinar distancias absolutas, debe conocerse la geometría de la celda unitaria, es decir, las longitudes de las dimensiones a , b y c de la celda y los ángulos entre los ejes.

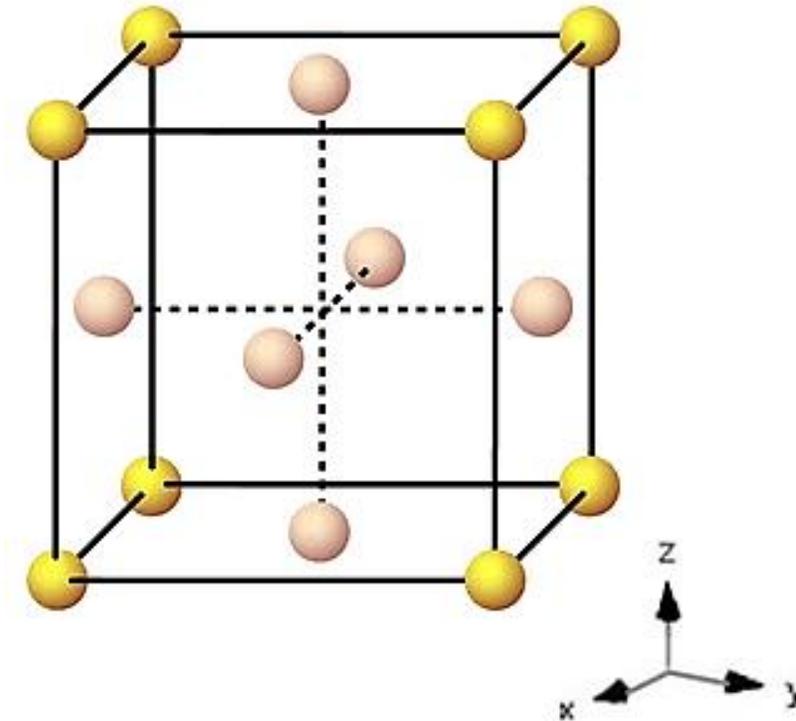


Figura 2.6.1 celda unitaria cúbica centrada en las caras

La representación de planos de átomos también es directa. Primero, se determinan las intersecciones del plano reticular con los ejes x , y y z . Por razones que no necesitan explicarse aquí, los valores recíprocos de las coordenadas de las intersecciones se calculan y luego se convierten a los números enteros h , k y l mediante la multiplicación adecuada. Los hkl tripletes se llaman índices Miller de un plano o cara. Un ejemplo: un plano corta al eje x en $1/3a$, el eje y en $1/2b$ y el eje z en $2c$. Los recíprocos son entonces $(3, 2, 1/2)$, lo que, multiplicando por 2 para obtener valores enteros, finalmente da (641) . Los planos paralelos a un eje se cruzan en el infinito, el recíproco de los cuales es cero. Un plano (100) es por lo tanto paralelo a los ejes y y z e interseca el eje x en $1a$.

Teoría de la difracción

La interacción de las ondas con estructuras periódicas produce efectos de difracción si la longitud de onda y la periodicidad de los cristales son de magnitud similar. Los rayos X pueden producirse fácilmente con longitudes de onda que coincidan con las dimensiones de las celdas unitarias de los cristales.

Teniendo en cuenta que los átomos tienen diámetros del orden de Ångstroms ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$), las celdas unitarias tienen dimensiones de varios Å. Esto implica que los cristales con tamaños de micras o mayores consisten en miles de millones de celdas unitarias, que se repiten periódicamente en las tres dimensiones, es decir, que poseen un orden de largo alcance. Este tipo de orden distingue los materiales cristalinos de los amorfos, por ejemplo, los vidrios, que tienen solo un orden de corto alcance. Dado que la "calidad" de los efectos de difracción en DRX depende fuertemente de la periodicidad estricta e inalterada de los átomos, cualquier tipo de desviación del orden ideal se mostrará en el diagrama de difracción de rayos X. Incluso un tamaño de cristal pequeño es una desviación del cristal perfecto teóricamente infinito. Otras desviaciones del orden ideal pueden ser reemplazos de átomos por otros (comunes en soluciones sólidas), ligeras desviaciones geométricas de átomos desde su posición ideal debido a la tensión interna, o aberraciones mayores en dos o tres dimensiones.

El factor de forma del átomo

Las ondas electromagnéticas con longitudes de onda del orden de 10^{-10} m se llaman rayos X. El campo eléctrico de tales ondas interactúa con las cargas de todos los electrones de un átomo, que luego emiten una onda casi esférica con la misma longitud de onda que la radiación incidente. La amplitud de esta onda saliente es proporcional al número de electrones en el átomo y, por lo tanto, al número atómico. Los elementos ligeros con pocos electrones, por ejemplo, carbono u oxígeno, son, por lo tanto, dispersores "pobres" para los rayos X, mientras que los elementos pesados, como el plomo, son "buenos" dispersores. Los límites de detección están severamente influenciados por este efecto. La amplitud de la onda dispersa se describe por el factor de forma atómica f [11]. Debido a la interferencia dentro de átomos individuales, especialmente los más grandes, la amplitud de la onda saliente y por lo tanto el factor de forma del átomo también varía con el ángulo de dispersión 2Θ (Figura 2.6.2).

Difracción y la ley de Bragg

Sin ningún efecto de difracción, la incidencia de un haz primario de rayos X sobre un volumen de muestra producirá dispersión en todas las direcciones. La difracción redistribuye la intensidad por toda la esfera de dispersión en distintas direcciones. Por lo tanto, los picos de intensidad surgen en ciertas direcciones, mientras que en las direcciones entre picos la intensidad

disminuye drásticamente. La intensidad integrada en la esfera, sin embargo, permanece constante debido a la conservación de energía. ¿En qué direcciones observamos esos picos, también llamados reflexiones? Una forma de describir estas direcciones es teniendo de planos de red dispersantes y la interferencia entre las ondas dispersadas por los planos reticulares vecinos. La Figura 2.6.2 ilustra esta situación.

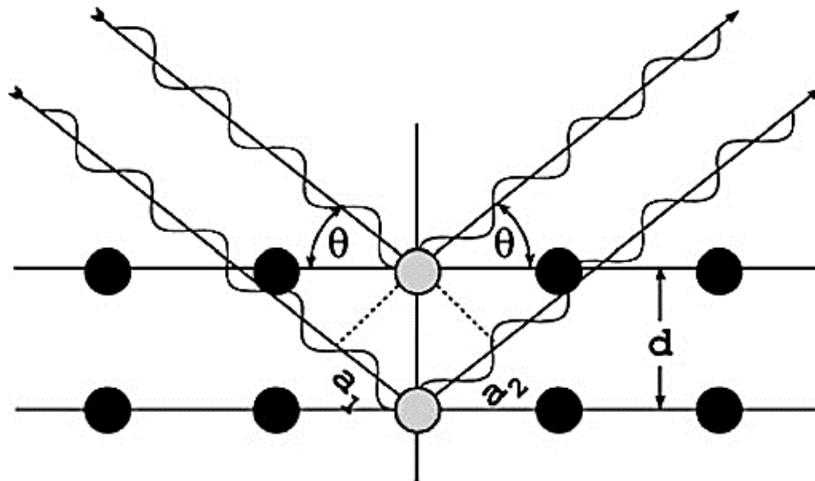


Figura 2.6.2 esquema en el que se cumple la ley de Bragg [11]

La interferencia constructiva y, por lo tanto, llamada reflexión de Bragg se obtiene cuando la trayectoria de la onda dispersada del plano más bajo es un número entero de longitudes de onda λ más larga que la de la onda dispersada en el plano superior. Una reflexión así ocurrirá cuando

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad 2.6.1$$

Esta es la llamada ecuación de Bragg, donde λ es la longitud de onda de la radiación, n es un número entero, θ es el ángulo entre los planos reticulares y el haz incidente y d es la distancia entre los planos reticulares donde se produce el pico.

La ecuación de Scherrer

El difractograma de nanopartículas metálicas no solo nos puede brindar la estructura cristalina, también nos puede brindar el tamaño de estas. P. Scherrer mostró que, cuando radiación monocromática paralela incide sobre un conjunto de cristales orientados al azar, el haz difractado se ensancha cuando el tamaño de partícula es pequeño. Mediante un método de

aproximación, obtuvo una expresión para el valor del ancho de banda medio β del haz difractado en la forma

$$\beta = \frac{K\lambda}{L \cos \frac{\theta}{2}} \quad 2.6.2$$

donde λ es la longitud de onda de los rayos X incidentes, L el tamaño de la partícula, $\theta/2$ el ángulo de Bragg y K una constante numérica para la cual obtuvo el valor $2(\ln 2/\pi)^{\frac{1}{2}} = 0.93$. En el trabajo citado, se siguen cálculos exactos y aproximados de la constante de Scherrer para partículas esféricas y elipsoidales [12].

2.7 Microscopía confocal

Una de las técnicas más efectivas para imágenes en la microscopía es la microscopía confocal de escaneo láser (CLSM, por sus siglas en inglés). En un microscopio normal, el campo de visión completo se ilumina de forma simultánea y uniforme, y se crea una imagen bidimensional completa de ese campo de visión. que puede ser examinada por el ojo humano, o proyectada sobre una película o el detector de una cámara de televisión.

En CLSM, una fuente puntual y un detector de punto se utilizan para iluminar un volumen específico y muy pequeño de la muestra y para rechazar la luz proveniente de cualquier otra parte del sistema [13]. La fuente se enfoca en un punto específico en el volumen de la muestra, así como también lo hace el detector. La figura 2.7.1 muestra una forma en que esto se puede realizar. El láser iluminador se enfoca a través de un orificio para producir una fuente de luz puntual que luego se reenfoca en el plano focal de la muestra mediante la lente del objetivo.

La luz dispersa en ese punto, o emitida como en el microscopio de fluorescencia, pasa a través del objetivo, se refleja en un divisor de haz o un espejo dicróico y pasa a través de un segundo orificio al detector. Si el orificio del detector ocupa exactamente la misma posición con respecto a la lente del objetivo en el brazo óptico del detector que el orificio de la fuente en el brazo óptico de la fuente, entonces se dice que el microscopio tiene una configuración confocal [13]. Esto significa que la luz que proviene del punto focal del sistema en la muestra se enfocará y pasará a través del orificio. La luz de cualquier otra parte del sistema seguirá un camino diferente a través de la óptica y no se enfocará en el orificio. Esto proporciona un alto grado de selectividad para la luz que emana del punto particular en la muestra que se está examinando.

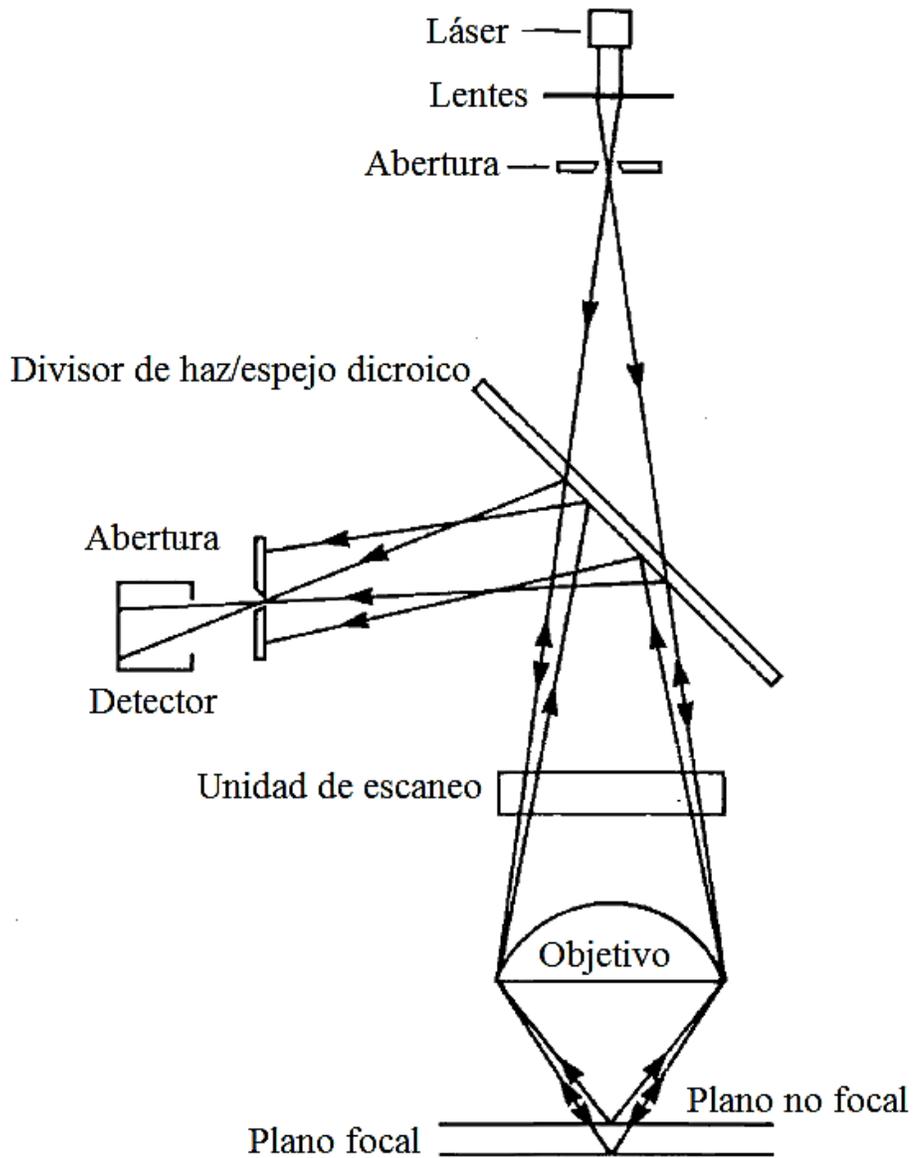


Figura 2.7.1 diagrama esquemático del principio del microscopio confocal [13]

Si el microscopio se provee de una unidad de exploración de haz, es posible construir punto por punto una imagen bidimensional del plano focal del microscopio. Esto nos permite obtener imágenes de alto contraste de regiones dentro de muestras gruesas y en la superficie o a través de muestras delgadas.

Junto con la fuerte discriminación hacia la luz desde el exterior del plano focal, el microscopio de escaneo láser confocal produce una profundidad de enfoque muy estrecha. El grosor de la región enfocada depende de la apertura numérica del objetivo y, para un objetivo con una

apertura numérica de 1.3, el espesor del corte que se está formateando es de aproximadamente 0.7 μm . Se puede pensar que esto proporciona la capacidad de seccionamiento óptico no invasivo de la muestra, en contraste con el corte físico de la muestra realizado con un microtomo. Si se toman una serie de estas secciones a diferentes profundidades dentro de la muestra, es posible reconstruir estructuras tridimensionales a partir de muestras gruesas intactas.

Referencias

- [1] Kalsi, P. S. (2007). *Spectroscopy of organic compounds*. New Age International.
- [2] Lax, M. (1952). The Franck-Condon Principle and Its Application to Crystals. *The Journal of Chemical Physics*, 20(11), 1752-1760.
- [3] Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing—a review. *Analytica chimica acta*, 706(1), 8-24.
- [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.
- [5] PerkinElmer, Inc. (2000). *Lambda 25, 35, 45 User's Guide*.
- [6] Suart, B. (2004). Infrared spectroscopy: Fundamental and applications. *Google Scholar*.
- [7] Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2006). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In *Scanning microscopy for nanotechnology* (pp. 1-40). Springer, New York, NY.
- [8] Pennycook, S. J., David, B., & Williams, C. B. (2010). Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. *Microscopy and Microanalysis*, 16(1), 111.
- [9] Nellist, P. D., & Pennycook, S. J. (2000). The principles and interpretation of annular dark-field Z-contrast imaging. *Advances in imaging and electron physics*, 113, 147-203.
- [10] Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). The transmission electron microscope. In *Transmission electron microscopy* (pp. 3-17). Springer Us.
- [11] Stanjek, H., & Häusler, W. (2004). Basics of X-ray Diffraction. *Hyperfine Interactions*, 154(1-4), 107-119.

- [12] Patterson, A. L. (1939). The Scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical review*, 56(10), 978.
- [13] Jeffrey, A. (1993). Tutorial review—Applications of confocal laser scanning microscopy in in-situ mapping. *Analyst*, 118(1), 1-9.

Capítulo 3

Resultados y discusiones

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con las técnicas descritas en el capítulo anterior para la caracterización de las nanopartículas. Todas las gráficas que aparecen en este capítulo fueron hechas utilizando Origin 9.1.

3.1 Resultados de UV-Vis

La figura 3.1.1 muestra una curva de calibración del extracto de *Rumex hymenosepalus*. Para realizar esta curva se utilizó extracto liofilizado y una mezcla de alcohol/agua (70/30 vol) como solvente. La curva se llevó a cabo para establecer la concentración equivalente del extracto proveniente del macerado, mismo que se utilizó para la síntesis de nanopartículas.

Para esto se tomaron diluciones del extracto proveniente del macerado y se midió la absorbancia de cada una por medio del espectrómetro de UV-Vis y los datos crudos se graficaron en Origin. Después, se llevó a cabo el ajuste lineal de los datos obteniéndose la recta de la figura cuya ecuación es

$$y = 0.00224 + 0.01884x$$

Donde y es la absorbancia en unidades arbitrarias y x es la concentración en $\mu\text{g/mL}$. Con esta ecuación es posible obtener la concentración del extracto macerado midiendo su absorbancia.

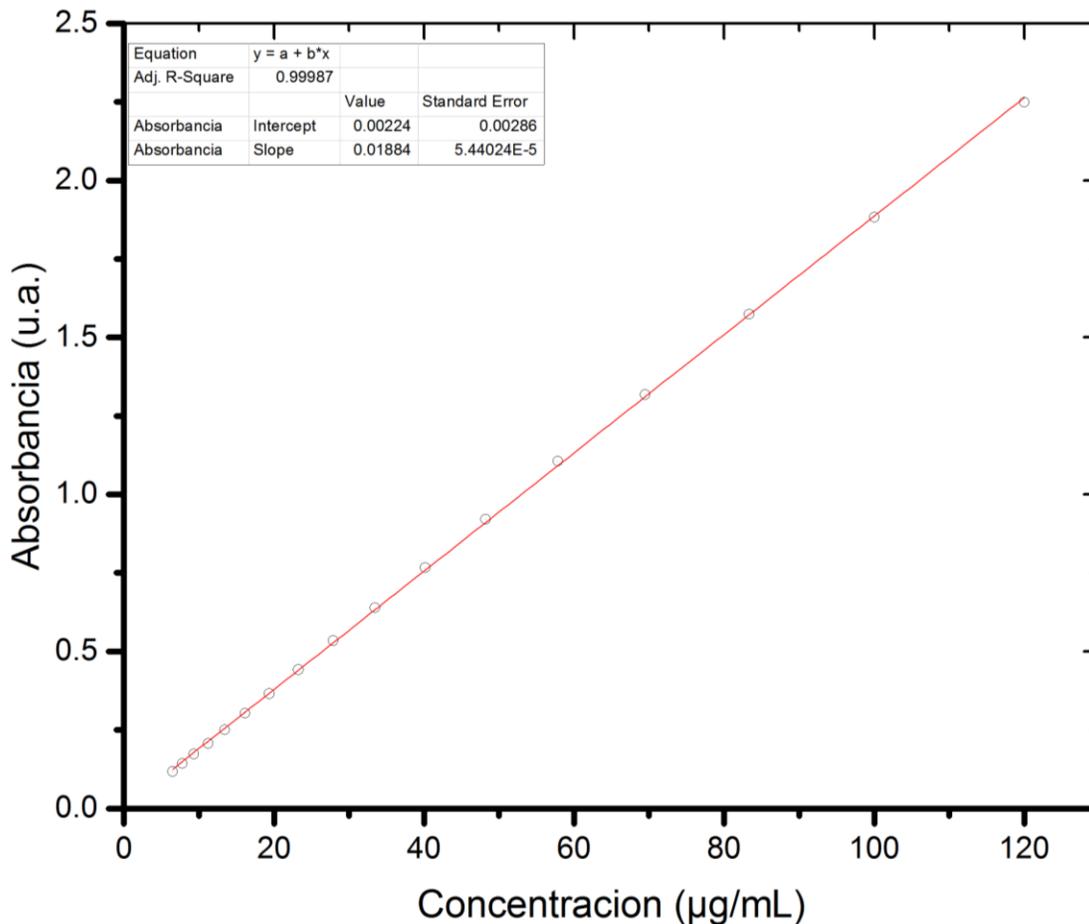


Figura 3.1.1 curva de calibración realizada con el extracto de *Rumex hymenosepalus* en forma liofilizada

La figura 3.1.2 corresponde a la cinética de formación de las nanopartículas de oro. El proceso de síntesis se llevó a cabo, respetando las proporciones de reactivos, dentro de una cubetilla para espectroscopía UV-Vis, a la cual se le monitoreó la absorbancia a través del tiempo en una longitud de onda fija (la del máximo de absorción de las nanopartículas). La absorbancia de la reacción de formación de las nanopartículas se midió por un lapso de 15 minutos.

La gráfica muestra que la absorbancia aumentó de forma considerable en los primeros minutos de la reacción, lo que indica que la reacción se encontraba en curso en esos momentos. Pasados los 15 minutos, la absorbancia comenzó a estabilizarse alrededor de las 0.45 unidades, indicando que culminó la reacción y se formaron las nanopartículas.

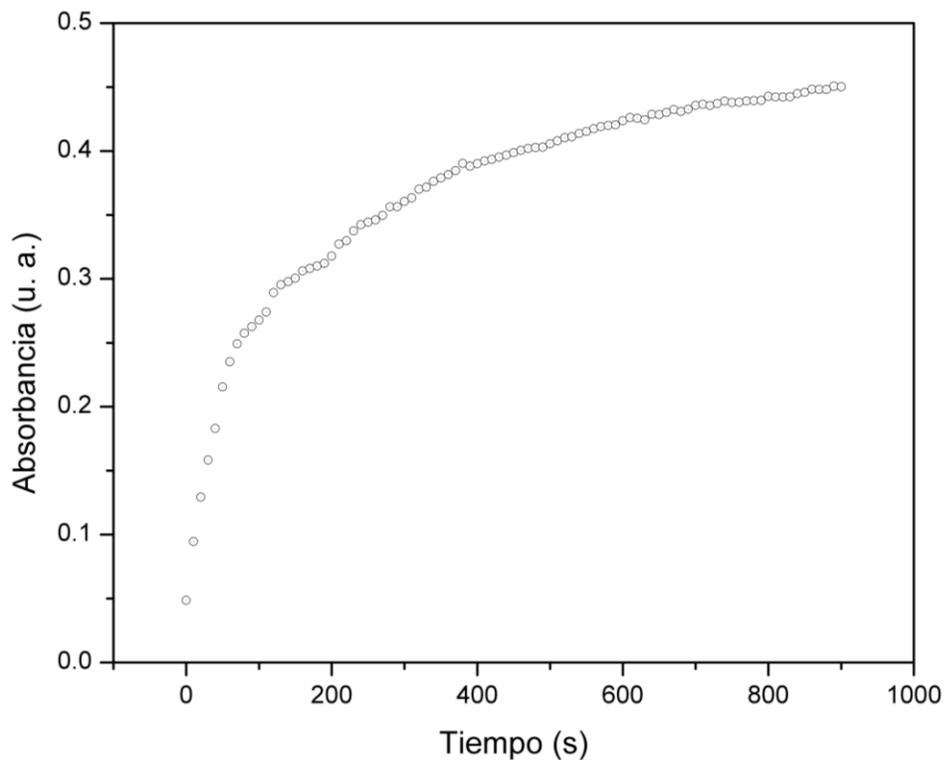


Figura 3.1.2 gráfica de la cinética de formación de las nanopartículas Au

La figura 3.1.3 muestra el espectro UV-Vis del extracto de *Rumex hymenosepalus* en su forma macerada. La única región a destacar en este espectro es la del máximo correspondiente a los compuestos reductores (catequinas, resveratrol), los cuales son responsables de reducir los iones de oro para la síntesis de nanopartículas. El máximo de absorción de estos compuestos se encuentra alrededor de los 280 nm.

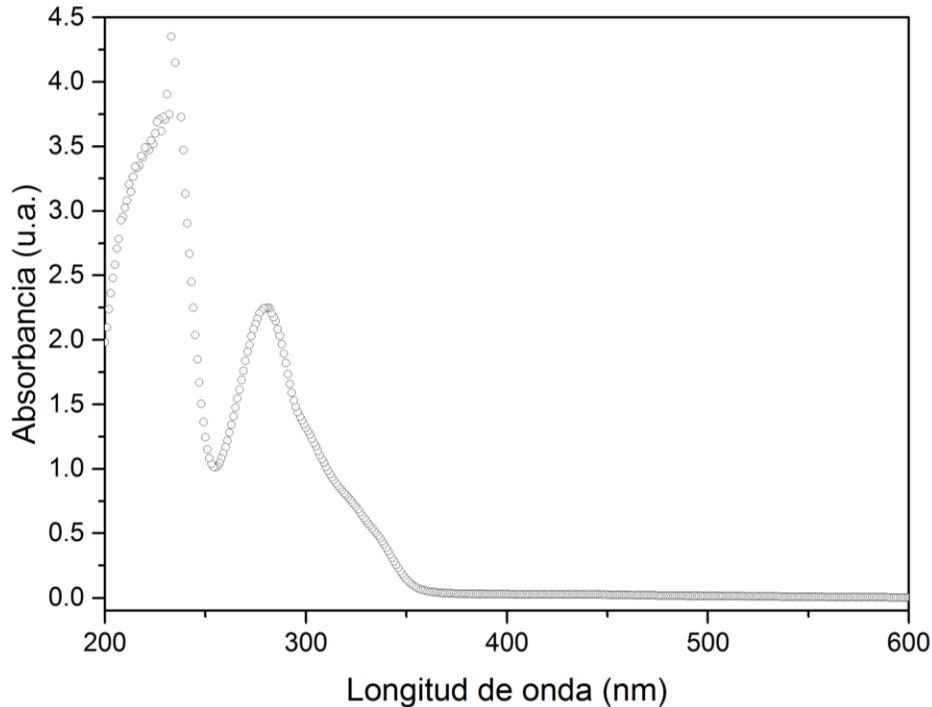


Figura 3.1.3 gráfica del espectro UV – Vis del extracto de *Rumex hymenosepalus*

En la figura 3.1.4 se muestran los espectros UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas: las nanopartículas monometálicas de Au, Ag, así como las variaciones de núcleo@coraza cuya base son las nanopartículas de Au con diferentes volúmenes de precursor Ag. Los datos crudos fueron normalizados respecto al máximo del plasmón para una comparación más clara.

Al observar la figura, es apreciable que tanto el oro como la plata presentan solo una banda de absorción de origen plasmónico con máximos respectivos en 533 nm y 412 nm, lo que sugiere que ambos sistemas presentan morfologías isotrópicas. Respecto al ancho medio de las bandas de estos espectros, cuyos valores aproximados son de 80 nm para el Au y 140 nm para el Ag, lo cual indica que de entre las dos nanopartículas monometálicas, el Au cuenta con una monodispersidad relativa mayor al Ag.

Otro elemento destacable de la figura son los sistemas de nanopartículas bimetálicas, cuya única diferencia es la cantidad de precursor de Ag usado al momento de la síntesis. Los números 50, 100, 200 y 400 corresponden al volumen en mL de precursor de Ag empleado en la síntesis.

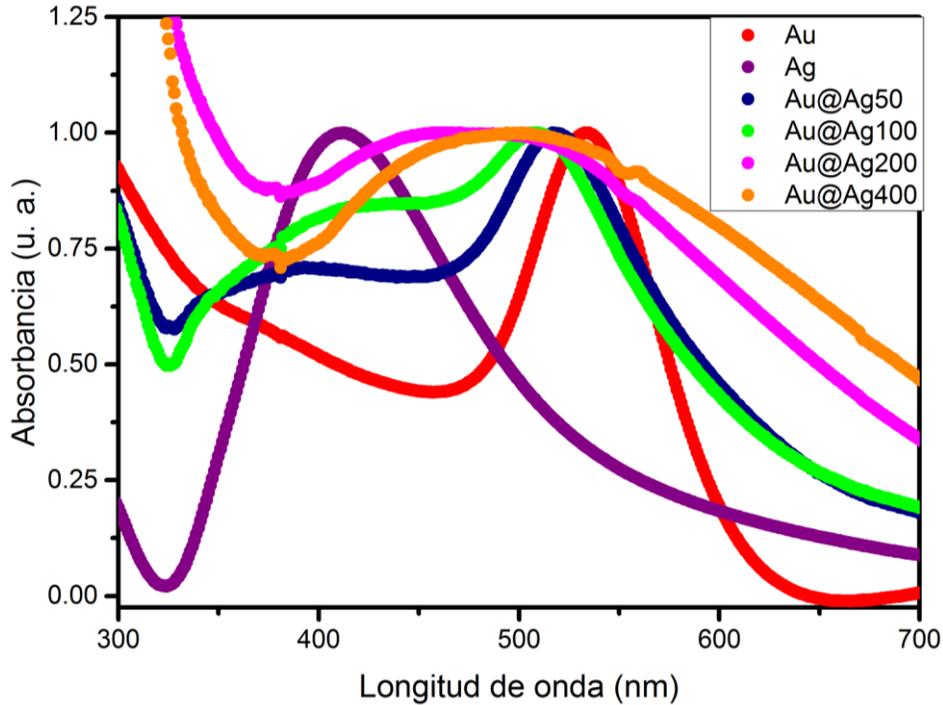


Figura 3.1.4 gráfica de los espectros UV – Vis de todos los sistemas de nanopartículas sintetizados

El comportamiento de las bandas de absorción de las nanopartículas bimetalicas indica que el máximo de la banda de cualquier sistema bimetalico se encuentra acotado entre los máximos del oro y la plata. Además, existe una relación entre el volumen de precursor de Ag usado y la ubicación del respectivo máximo de absorción con relación a los máximos del Au y Ag. Entre menos volumen de precursor de Ag usado, el máximo de absorción fue más cercano al Au, mientras que entre más volumen de precursor de Ag usado, el máximo de absorción fue más cercano al Ag.

En este aspecto, Li *et. al.* reportaron una tendencia similar a la aquí observada. En ese trabajo, se presentan nanopartículas núcleo@coraza, con un núcleo Au de baja polidispersidad y una coraza Ag con grosor controlable mediante la cantidad de precursor agregada. Un total de nueve corazas Ag con grosores diferentes se analizaron mediante UV – Vis, encontrando que el LSPR de estas partículas se corría hacia el azul con el aumento del grosor de la coraza Ag, indicando una clara relación entre la ubicación del máximo del plasmón y el grosor de la coraza Ag [1].

3.2 Resultados de espectroscopía IR

La Figura 3.2.1 muestra el espectro IR en modo de transmitancia para los sistemas de nanopartículas monometálicas y el extracto de *Rumex hymenosepalus*. El propósito de esta técnica fue el de demostrar que el extracto seguía presente después de sintetizadas las nanopartículas, por lo cual se asumió que los picos y bandas del espectro del extracto aparecerían también en los espectros de las nanopartículas.

La identificación de los picos y bandas del extracto se presenta a continuación, tomando en cuenta que los compuestos más abundantes del extracto son EGCG y el resveratrol. La banda con máximo en 3206 cm^{-1} corresponde a un estiramiento O – H aromático. El pico con máximo en 1601 cm^{-1} pertenece a un estiramiento C = C de carácter alifático. El pico con máximo en 1440 cm^{-1} representa el estiramiento C = H aromático. Debido a la apariencia ancha del pico ubicado en 1214 cm^{-1} , se sospecha que se trate de una combinación de estiramiento C – O fenólico con estiramiento C – O alifático. Por último, el pico con máximo en 1030 cm^{-1} presenta una banda ancha, la cual es posible que se trate de la combinación de varias señales: flexión dentro del plano C – H aromática, estiramiento C – O – C etérico y estiramiento C – O fenólico.

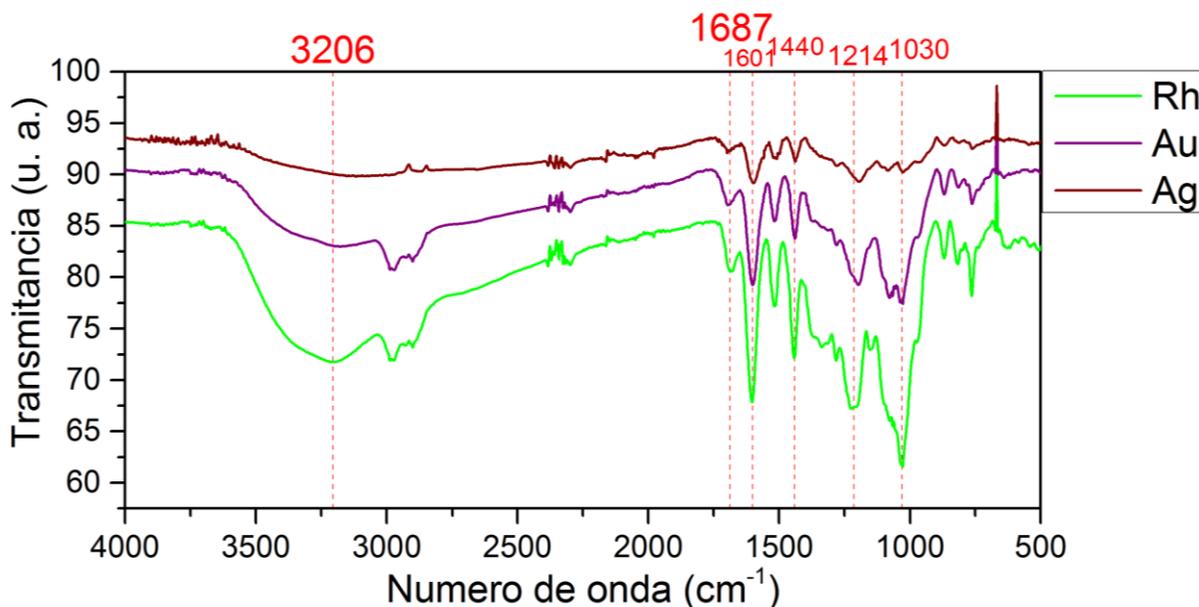


Figura 3.2.1 espectro IR del extracto de *Rumex hymenosepalus* y nanopartículas monometálicas

3.3 Resultados de TEM

Esta es la sección correspondiente a los resultados obtenidos de TEM. La preparación de las muestras para observación se llevó a cabo depositando una gota de solución del material (solvente: DMSO al 5% en agua ultrapura) en una rejilla de lacey carbon (ElectroMicroscopy Sciences) para su inserción en el microscopio.

La figura 3.3.1 muestra imágenes de TEM obtenidas para los sistemas de nanopartículas monometálicas Au y Ag y bimetálicas Au@Ag. Las secciones a) y b) de la figura corresponden a imágenes obtenidas del sistema Ag, las cuales se presentan en forma cuasiesférica y en su mayoría, en formas irregulares. Además, se puede observar que los tamaños de las nanopartículas varían en abundancia, como se verá en seguida en la distribución de tamaños. Otro aspecto a resaltar es la diferencia de contraste en todas las nanopartículas, lo cual es debido a la distribución irregular del material y a la presencia de defectos en el sistema cristalino de estas.

Las secciones c) y d) de la figura corresponden a imágenes obtenidas del sistema Au, las cuales son en su mayoría cuasiesféricas, con excepciones en forma de triángulo con esquinas truncas. Además, se puede observar que, a diferencia de sus contrapartes Ag, las nanopartículas Au presentan mayor monodispersidad de tamaños.

Por último, las secciones e) y f) de la figura corresponden a imágenes obtenidas del sistema Au@Ag. Estas nanopartículas presentan las mismas cualidades de forma que las monometálicas Au, pues estas se utilizaron como el núcleo de las nanopartículas bimetálicas. El núcleo y la coraza de este material se puede apreciar de forma clara mediante la diferencia de contraste que muestran, prueba fehaciente de la formación del sistema. Además, debido a que la agregación de la coraza no fue uniforme en todas las nanopartículas, es decir, no todas las corazas son del mismo tamaño, la monodispersidad se vio afectada.

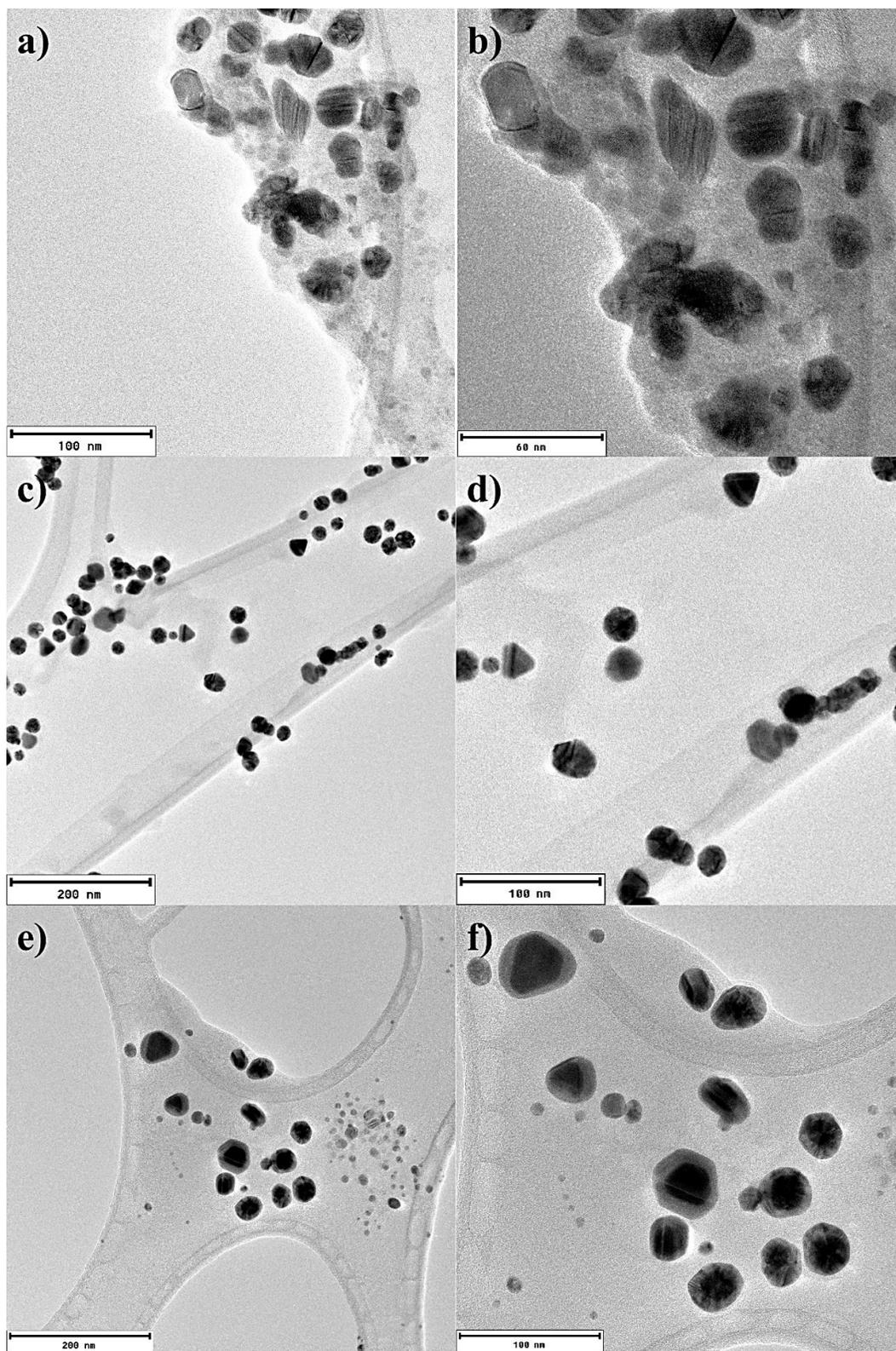


Figura 3.3.1 a) y b): imágenes TEM del sistema Ag, c) y d): imágenes TEM del sistema Au, e) y f): imágenes TEM del sistema Au@Ag

A continuación se presentan los histogramas de conteo de frecuencias relativas o distribución de tamaños de los sistemas. Se midió el diámetro de las nanopartículas (o en su defecto la distancia del eje mayor) de todas las imágenes de TEM obtenidas mediante el uso del programa ImageJ 1.51. Las distancias obtenidas se exportaron a Origin 9.1, en donde se calcularon las frecuencias relativas, obteniéndose las gráficas.

La figura 3.3.2 presenta la distribución de tamaños para las nanopartículas Au, las cuales presentan la mayoría de su población entre los 25 – 30 nm cuyo diámetro promedio es de 20.8 ± 5.1 nm. En comparación, se podría decir que la síntesis de nanopartículas Au con extracto de *Rumex hymenosepalus* produce nanopartículas con menor polidispersidad que utilizando otros extractos [2-4].

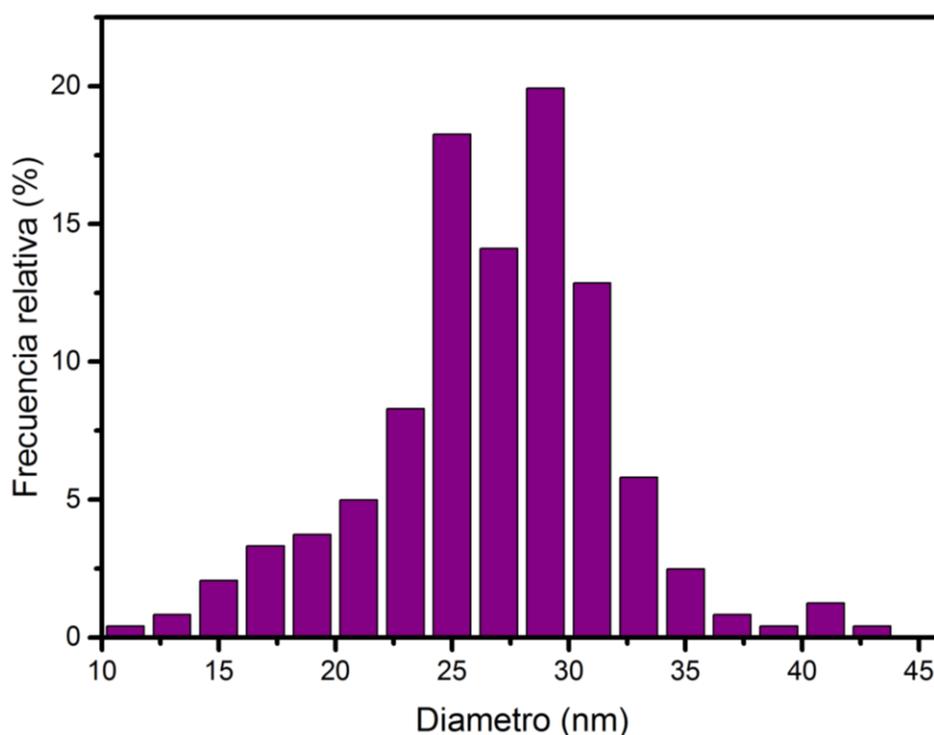


Figura 3.3.2 distribución de tamaños para las nanopartículas Au

En la figura 3.3.3 aparece la distribución de tamaños para las nanopartículas Ag, las cuales presentan la mayoría de su población entre los 20 – 40 nm cuyo diámetro promedio es de 28.1 ± 10.0 nm, resultando así, más grandes que las nanopartículas Au. Aunque aparecen partículas mayores a 40 nm, estas representan solo un pequeño porcentaje de la población total.

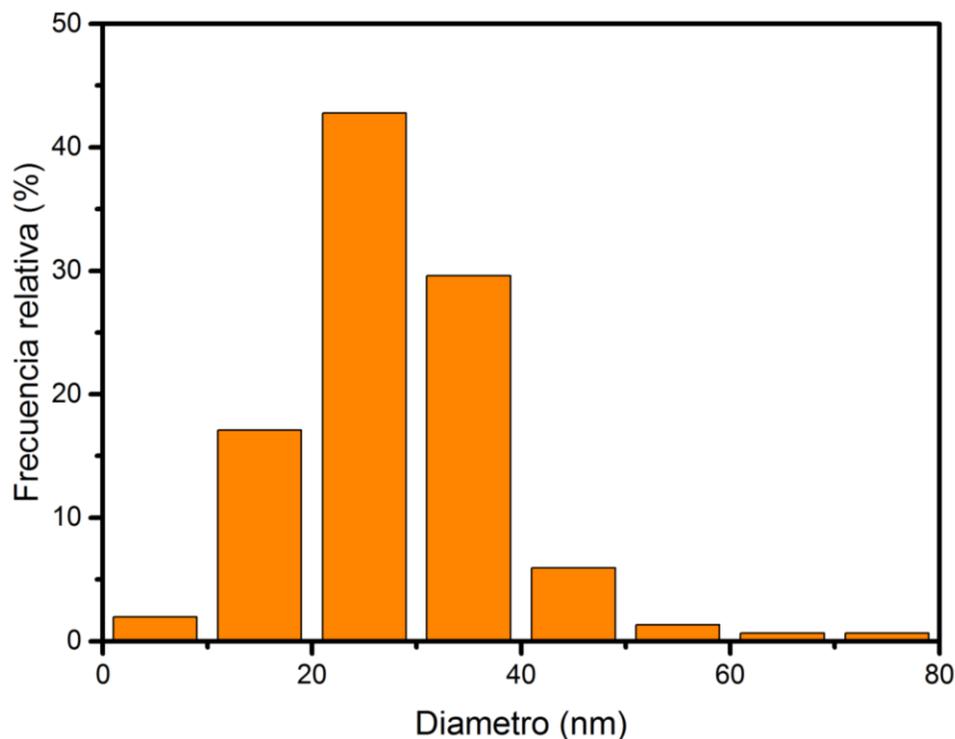


Figura 3.3.3 distribución de tamaños para las nanopartículas Ag

La figura 3.3.4 contiene la distribución de tamaños para las nanopartículas Au@Ag, los núcleos de estas y las corazas por separado (diferente al grosor de las corazas, el cual varía para distintos lugares en una partícula debido a la formación irregular de la coraza). Las nanopartículas Au@Ag presentan un tamaño promedio de 38.9 ± 5.8 nm, mientras que el tamaño de los núcleos y las corazas por separado son de 25.2 ± 4.4 nm y 13.5 ± 4.5 nm respectivamente. Comparando estos tamaños con los reportados en la síntesis química mediada por citrato de Kamimura *et. al.*, la cual resulta en nanopartículas de 15 nm con una distribución más aguda que la presentada aquí, queda claro que la limitación de la síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas es la mayor polidispersidad respecto a la síntesis química [5]. Incluso la síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas de nanopartículas Au@Ag de Ghosh *et. al.* presenta núcleos de 5 – 11 nm y nanopartículas enteras de 13 – 19 nm [6]. Es necesario incluir métodos adicionales para la reducción de la polidispersidad.

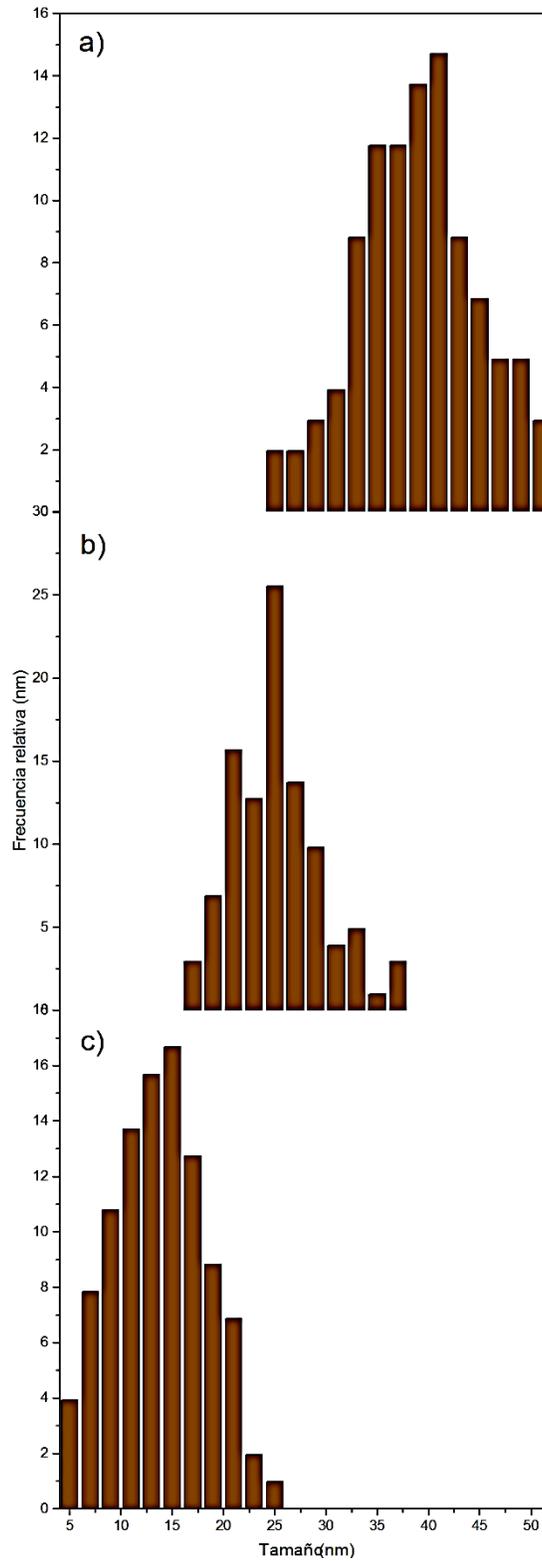


Figura 3.3.4 a): distribución de tamaños para nanopartículas Au@Ag; b): tamaños de núcleos de las nanopartículas Au@Ag; c): corazas de las nanopartículas Au@Ag

3.4 Resultados de STEM y EDS

La figura 3.4.1 presenta en el lado derecho cuatro imágenes de STEM para el sistema Au@Ag, de las cuales la parte superior corresponde a campo claro y la parte inferior corresponde a campo oscuro HAADF. En ellas aparecen las nanopartículas bimetálicas con forma irregular y tamaños variados. Gracias al HAADF se puede diferenciar con claridad la distribución de los elementos por medio del contraste. Las partes más claras y brillantes representan al Au, mientras que las partes más oscuras alrededor de las primeras representan al Ag. Por otra parte, el lado derecho de la figura contiene la distribución de tamaños para este sistema, el cual solo contiene diámetros menores a 7 nm y la mayoría de la población ubicada en los 2 – 3 nm.

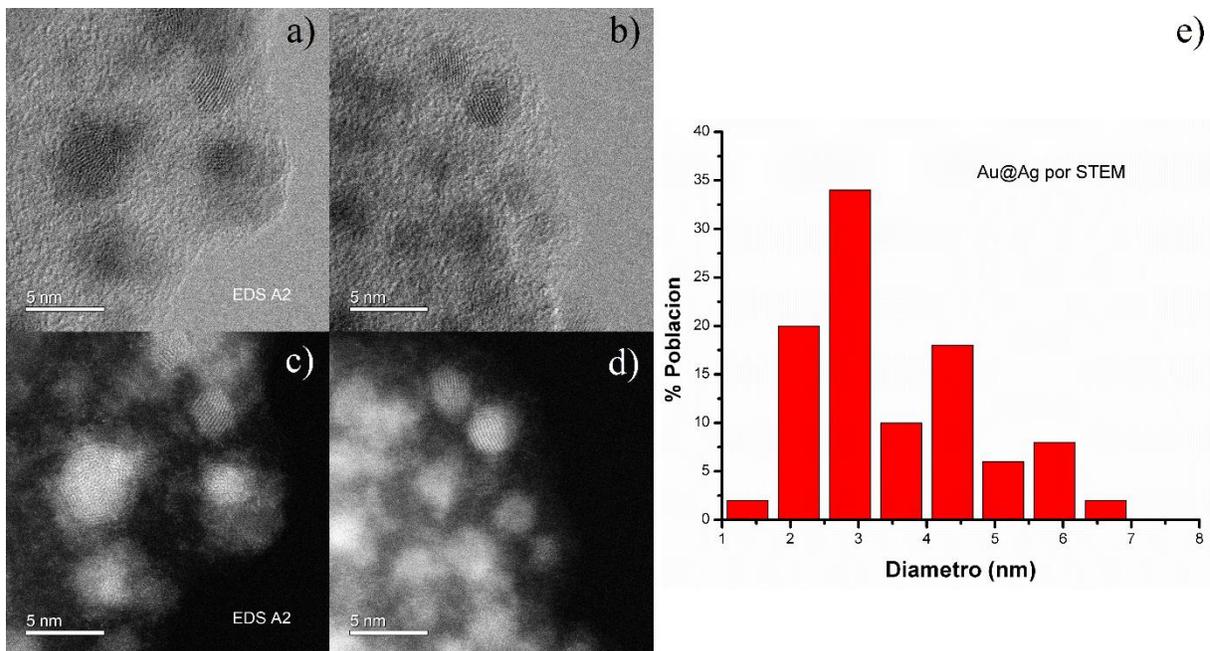


Figura 3.4.1 imágenes STEM: a) y b) campo claro, c) y d) HAADF y e): distribución de tamaños para el sistema Au@Ag

A continuación se muestran imágenes de HRTEM junto con imágenes correspondientes a fases del proceso de determinación de la cristalinidad de cada sistema. Este procedimiento fue llevado a cabo en el programa Digital Micrograph 3.0 (Gatán). Consiste en seleccionar un área cuadrada de interés (imagen HRTEM de la izquierda, cuadrado rojo) y aplicarle una transformada rápida de Fourier (FFT por sus siglas en inglés) para obtener los puntos de difracción (inset del lado derecho). Después, se aplica la máscara de selección a los puntos deseados y a estos se les aplica

la FFT inversa (IFFT) obteniendo los planos cristalinos de la imagen original más claros (imagen de la derecha). Por último, se elige una distancia interplanar de esta nueva imagen, tomando diez planos y haciendo un promedio. Esta distancia se compara en una ficha cristalográfica del material para determinar a qué plano corresponde y así determinar el sistema cristalino al que pertenece.

La figura 3.4.2 ejemplifica el procedimiento descrito en el párrafo anterior para las nanopartículas Au. Las distancias interplanares de 2.34, 2.06 y 1.44 Å corresponden a los planos (111), (200) y (220) respectivamente. Estos planos corresponden al sistema cristalino cúbico centrado en las caras (FCC por sus siglas en inglés).

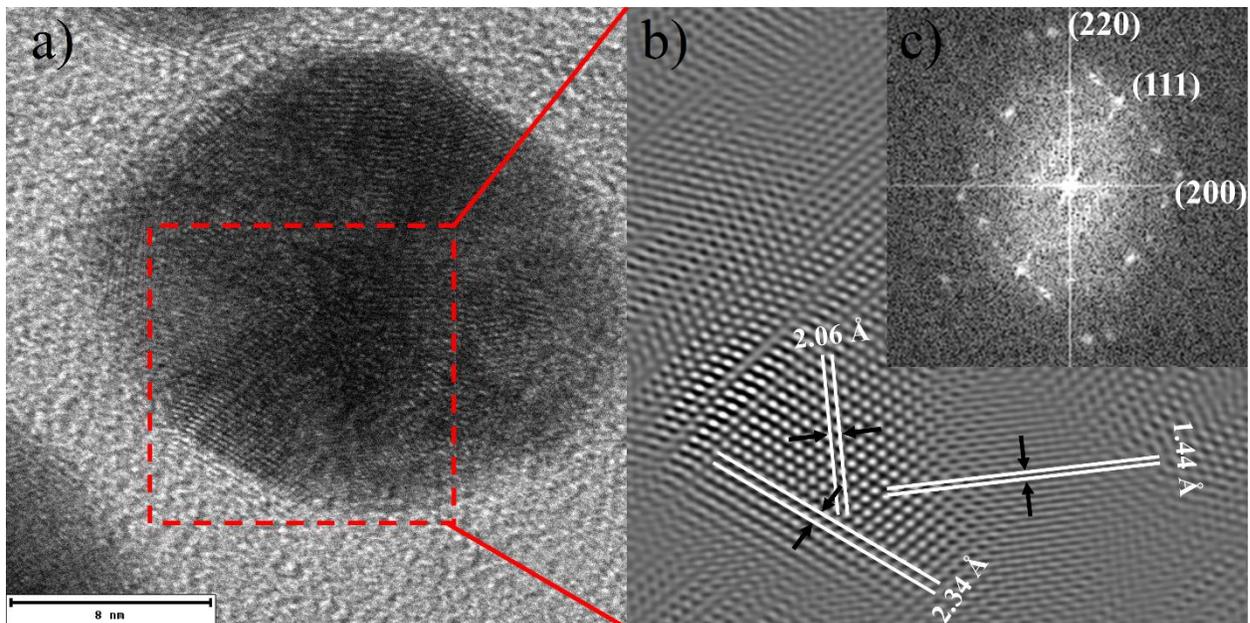


Figura 3.4.2 a): imagen HRTEM, b) e inset c): determinación de la cristalinidad. Sistema de nanopartículas Au

La figura 3.4.3 muestra el procedimiento descrito anteriormente, ahora para las nanopartículas Ag. Las distancias interplanares de 2.39, 2.06 y 1.44 Å corresponden a los planos (111), (220) y (311) respectivamente. Estos planos también corresponden al sistema cristalino FCC, por lo que ambos sistemas de nanopartículas monometálicas presentan el mismo sistema cristalino.

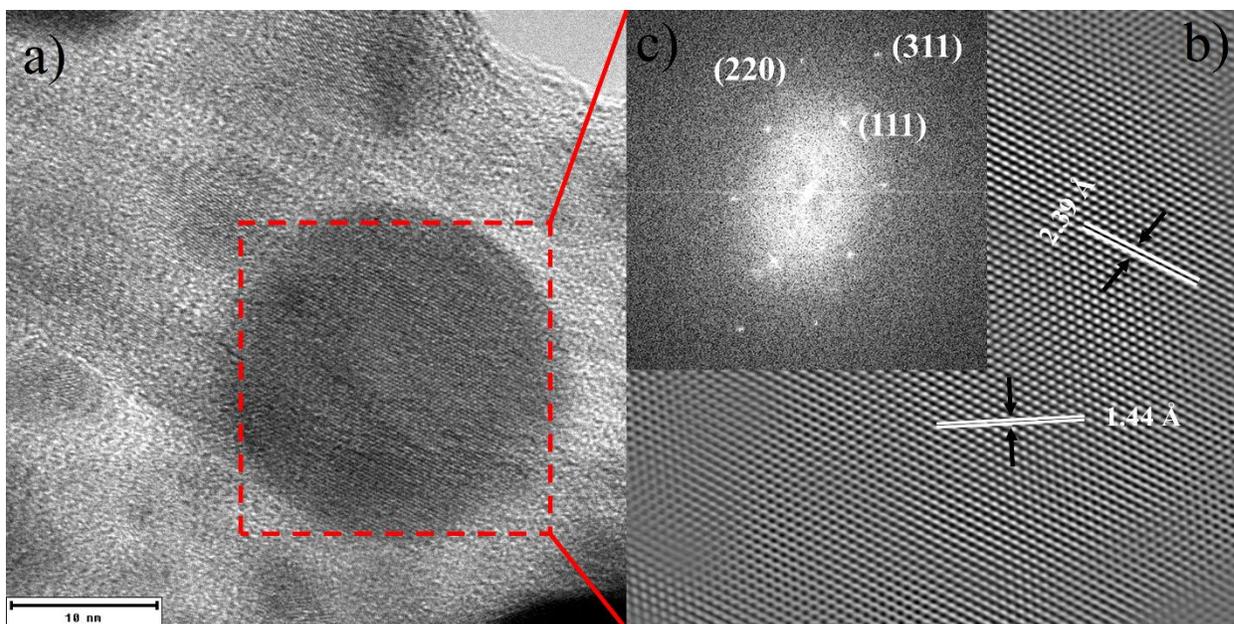


Figura 3.4.3 imagen HRTEM: a) y determinación de la cristalinidad: b) e inset c). Sistema de nanopartículas Ag

A continuación se muestra el mismo tratamiento para el sistema Au@Ag, con una ligera variación. Dado que este sistema consta de dos metales, el procedimiento se llevó a cabo en dos áreas distintas de la nanopartícula: la parte de la coraza que cubre al Au y la parte que no lo cubre.

Aclarado esto, la figura 3.4.4 presenta el procedimiento descrito anteriormente, en esta ocasión para las nanopartículas Au@Ag. La parte a) de la figura corresponde a una nanopartícula vista en HAADF y la parte b) es una sección con zoom de la misma. Los cuadros verdes corresponden a la selección de las áreas explicadas en el párrafo anterior. Las partes c) y e) de la figura son el tratamiento del área 1 de la que se obtuvieron las distancias de 2.36 y 2.07 Å correspondientes a los planos (111) y (200) del sistema FCC. Por otro lado, las partes d) y f) de la figura muestran el tratamiento del área 2 de la que se obtuvieron las distancias de 2.36 y 2.01 Å también correspondientes a los planos (111) y (200) del sistema FCC. Dichos resultados indican que tanto el núcleo como la coraza de las partículas presentan estructura FCC. La leves discrepancias en las distancias interplanares, así como la presentación borrosa de las partes c) y e) de la figura respecto a las partes d) y f) puede deberse a defectos en la interfase Au—Ag o a ligeras diferencias en la orientación de los planos.

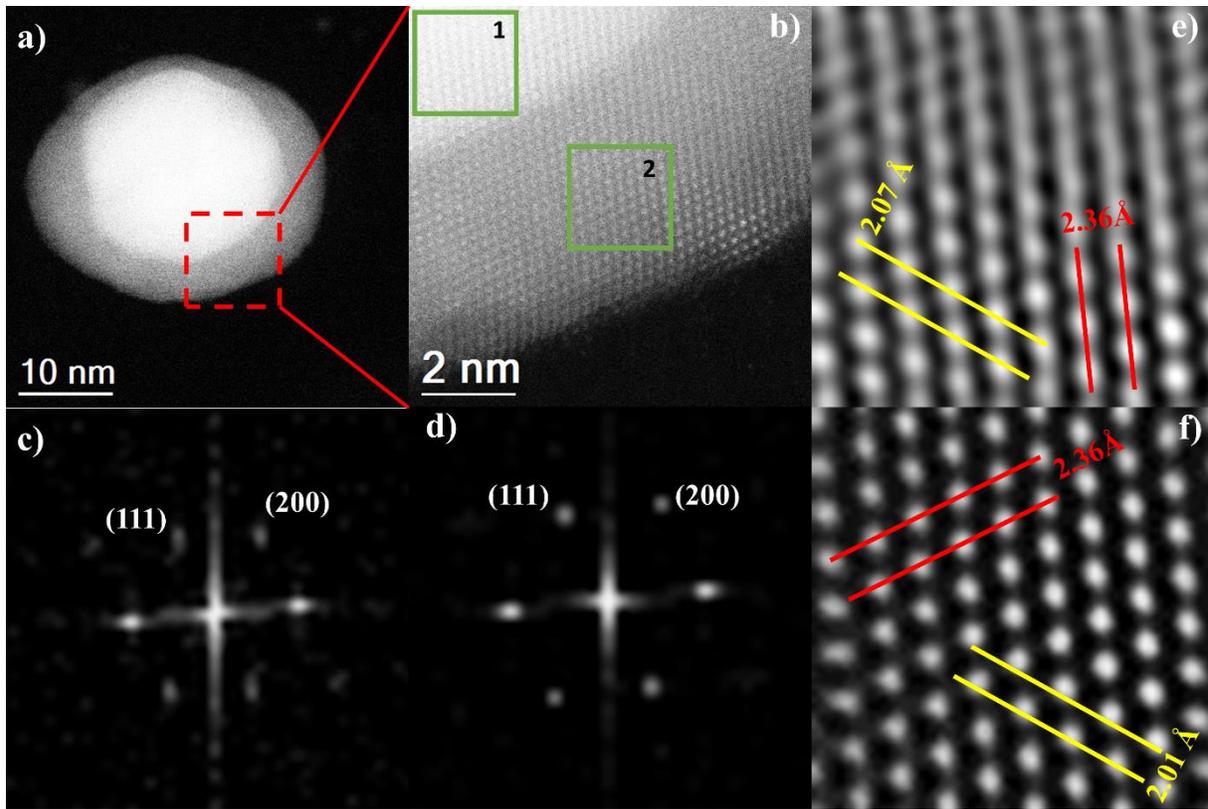
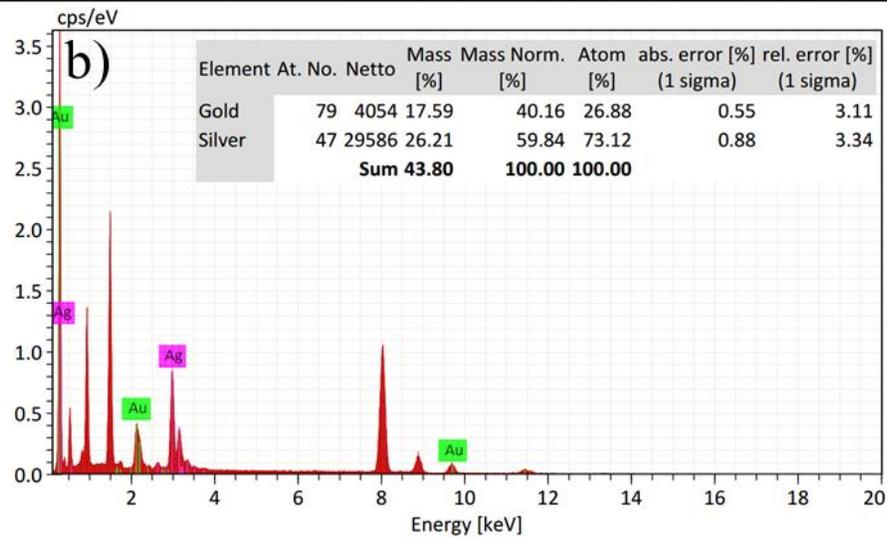
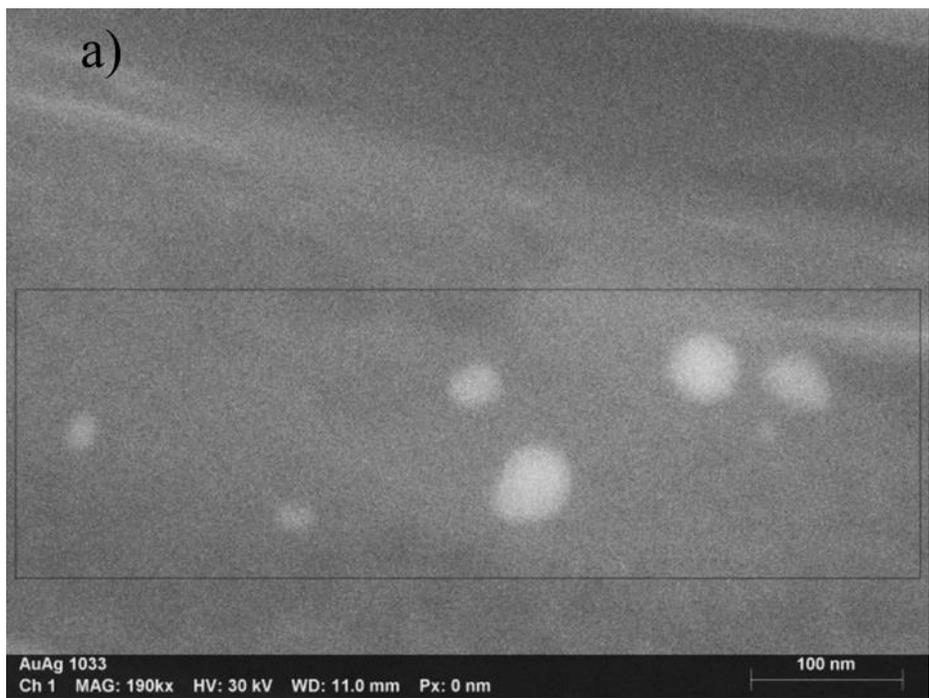


Figura 3.4.4 a) y b): imágenes HRTEM; c) y e): determinación de la cristalinidad del área 1 y d) y f): determinación de la cristalinidad del área 2. Sistema de nanopartículas Au@Ag

Enseguida se presentan las imágenes STEM EDS del sistema Au@Ag obtenidas de dos lugares distintos. Las primeras dos figuras corresponden a imágenes obtenidas en el JEOL JSM-7800F (8 Å) mientras que las últimas dos figuras tienen imágenes obtenidas en el JEOL ARM 200F (0.78 Å). La diferencia entre ellas radica en que las obtenidas en el JEOL ARM 200F poseen mayor resolución.

La figura 3.4.5 presenta la imagen STEM de un campo visual que muestra nanopartículas Au@Ag, así como el espectro de energías y el mapeo de elementos. El espectro de energías muestra que en efecto se encuentran presentes los dos elementos constituyentes de las nanopartículas, mientras que la tabla de este espectro muestra que la relación en porcentaje atómico es de 26.88 % para el Au y 73.12 para el Ag, lo que indica que hay aproximadamente el triple de Ag que de Au. La razón de este fenómeno puede explicarse mediante el mapeo elemental, el cual muestra que aunque el Au (verde) está presente y envuelto en Ag (morado),

hay áreas en las que se presenta el Ag pero no el Au. Esto indica que durante la síntesis no solo se formaron las nanopartículas Au@Au, sino también monometálicas Ag.



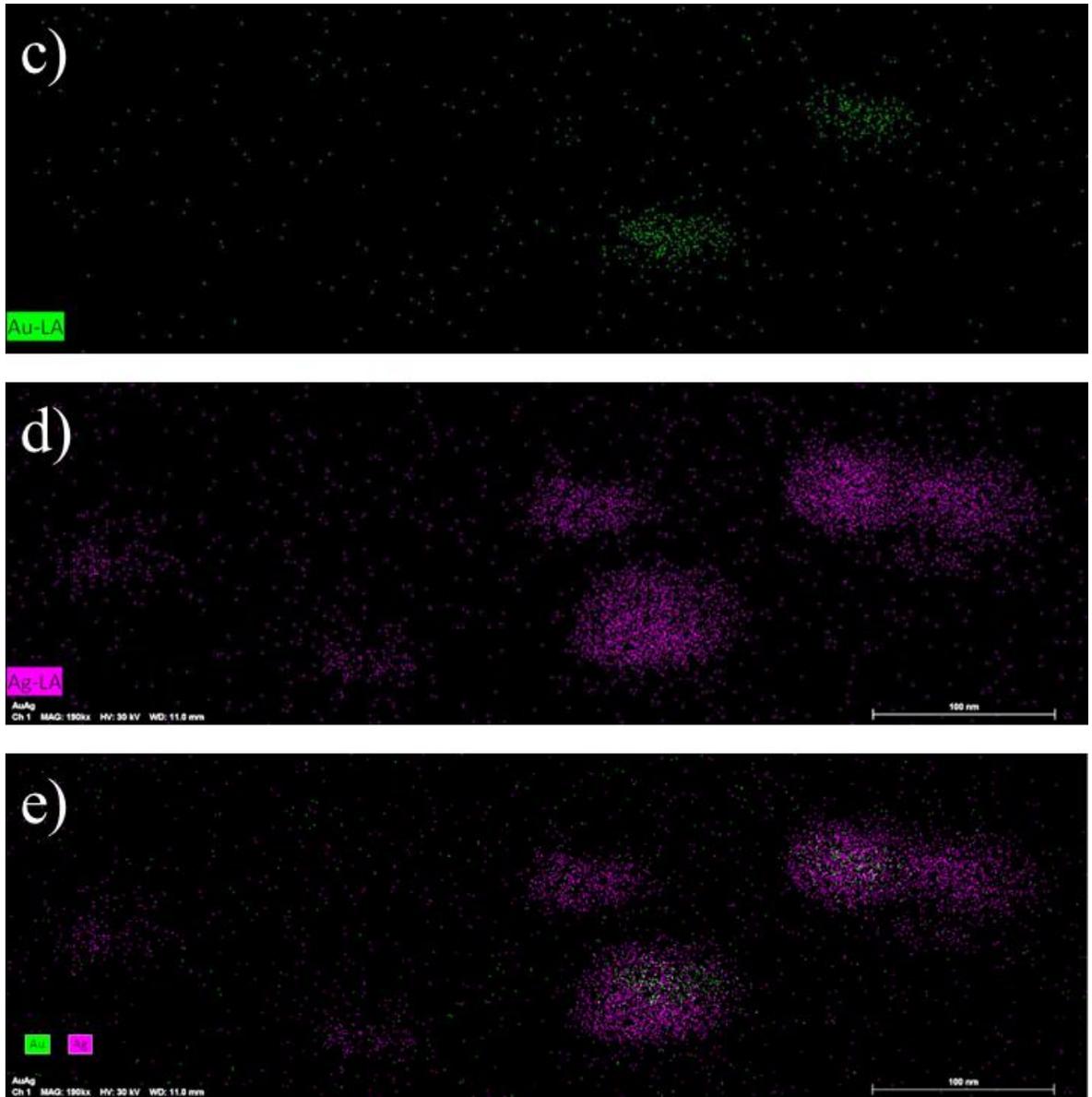
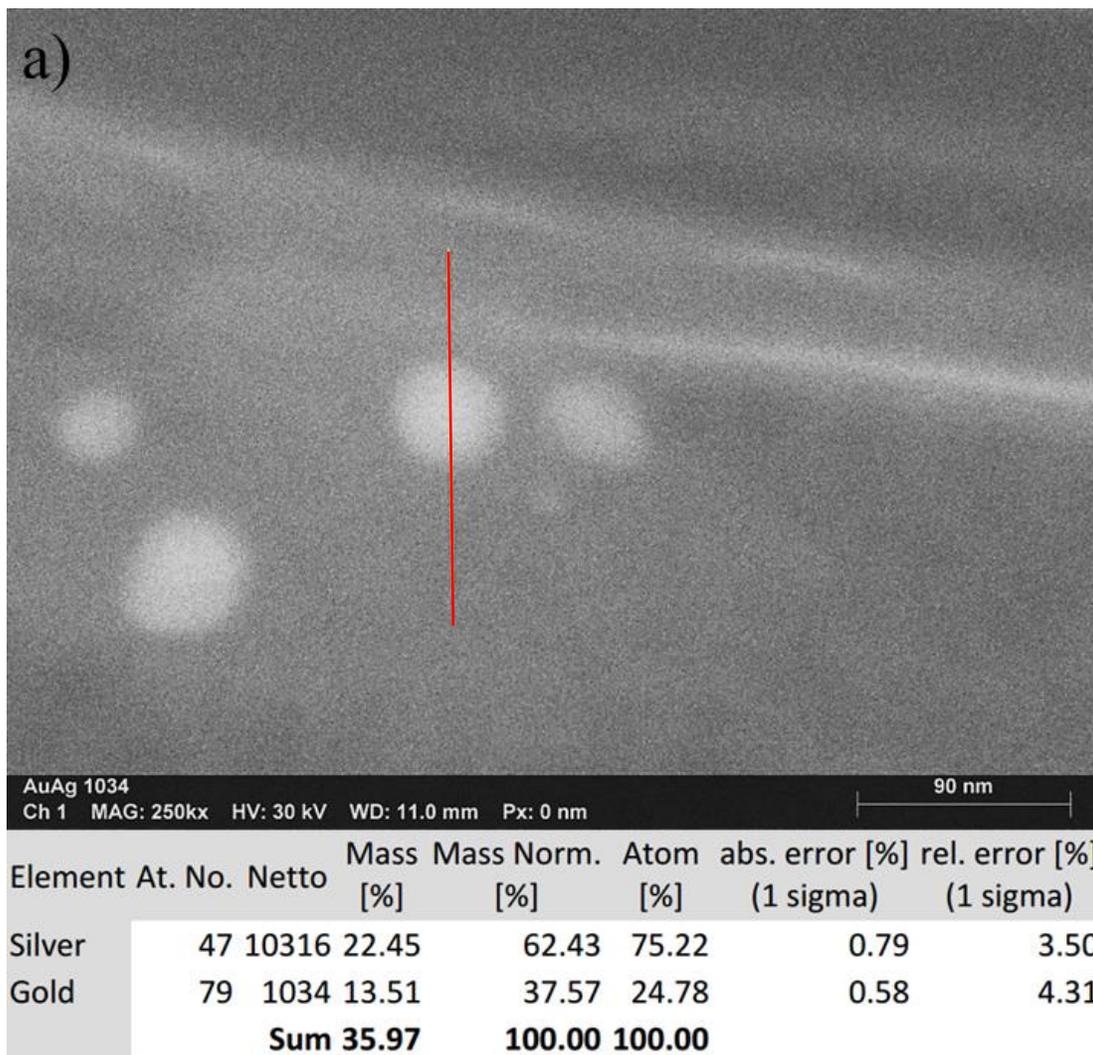


Figura 3.4.5 a): imagen STEM de nanopartículas Au@Ag, b): espectro de energías y c), d) y e): mapeo elemental del sistema mostrando Au, Ag y la combinación, respectivamente

La figura 3.4.6 contiene un zoom de la imagen STEM de la figura 3.4.5, así como la tabla de distribución elemental, el espectro de energías y el espectro de distribución de material de una sola nanopartícula Au@Ag. la tabla de distribución elemental y el espectro de energías revelan información muy parecida a la de la figura 3.4.5. Lo destacable de la figura 3.4.6 es el espectro de distribución de material, pues indica que el núcleo de Au (señal verde) es de aproximadamente 35 nm, distancia que aumenta hasta 55 nm al tomar en cuenta la coraza de Au

(señal azul). En otras palabras, la nanopartícula seleccionada (línea roja en el inciso a) es bimetalica y tiene un diámetro aproximado de 55 nm, con una coraza aproximada de 10 nm.



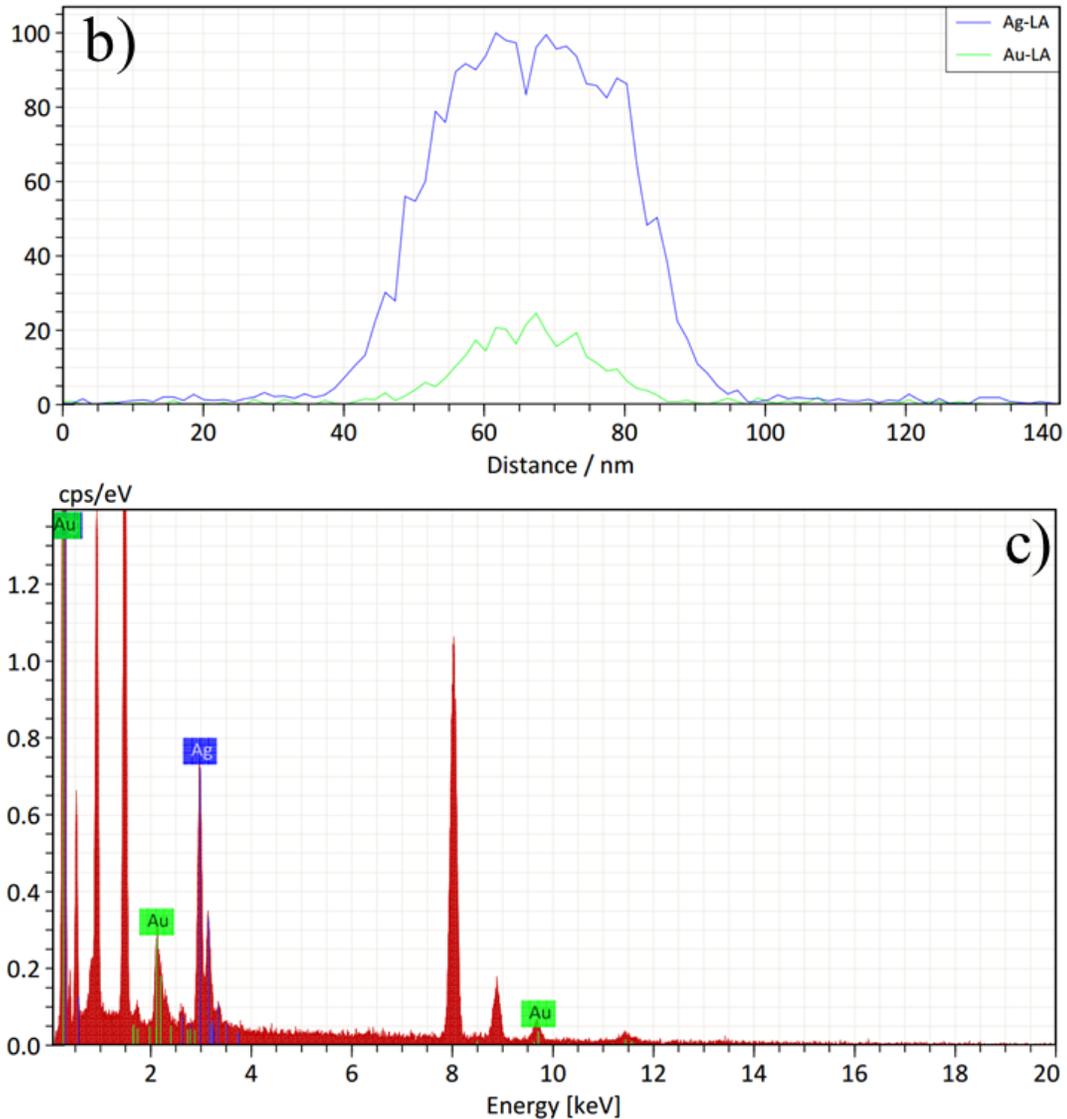


Figura 3.4.6 a): imagen STEM de nanopartículas Au@Ag y tabla de distribución elemental, b): espectro de distribución de material y c): espectro de energías. Se utiliza una sola nanopartícula para b) y c)

La figura 3.4.7 muestra el mapeo elemental del sistema Au@Ag llevado a cabo en el STEM EDS del JEOL ARM 200F, en el cual se traza también la presencia de oxígeno (O) y azufre (S). La relación Au—Ag de las partículas es la misma que en la figura 3.4.5: hay tanto nanopartículas Au@Ag como monometálicas Ag. Lo inquietante de la figura 3.4.7 es que muestra al S en abundancia coincidiendo en la ubicación del Au, hecho que indica sin mucho margen de error la existencia de una unión entre estos dos elementos. Como se explicó al inicio

de la sección 3.3, se usó DMSO como solvente, el cual es la fuente del S que interviene uniéndose con el Au.

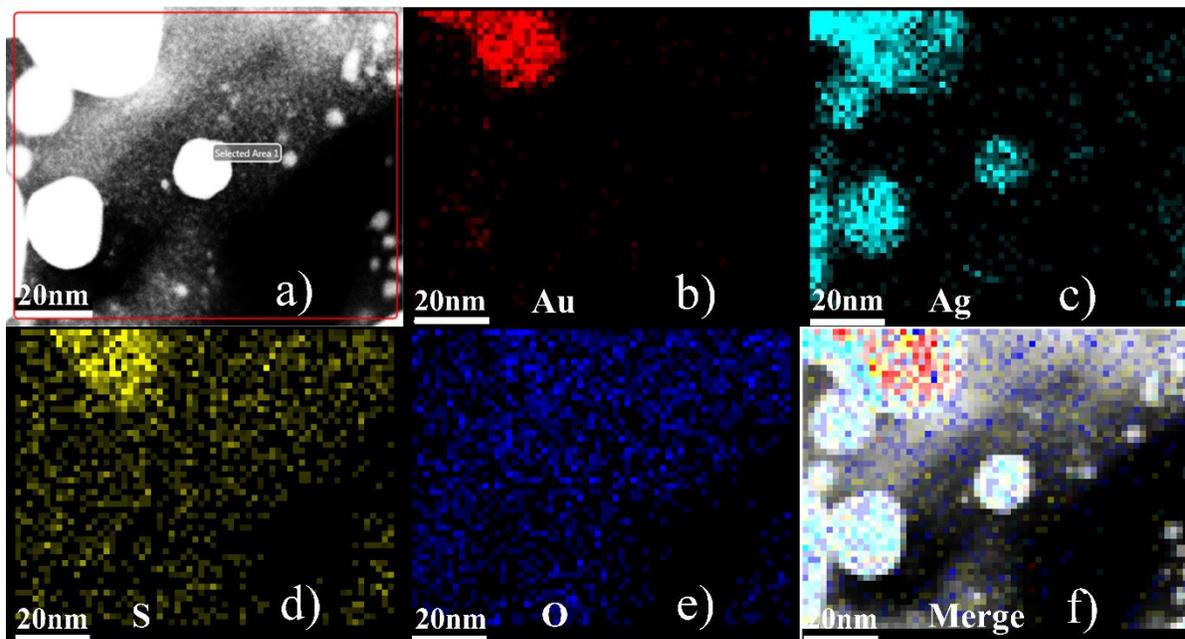
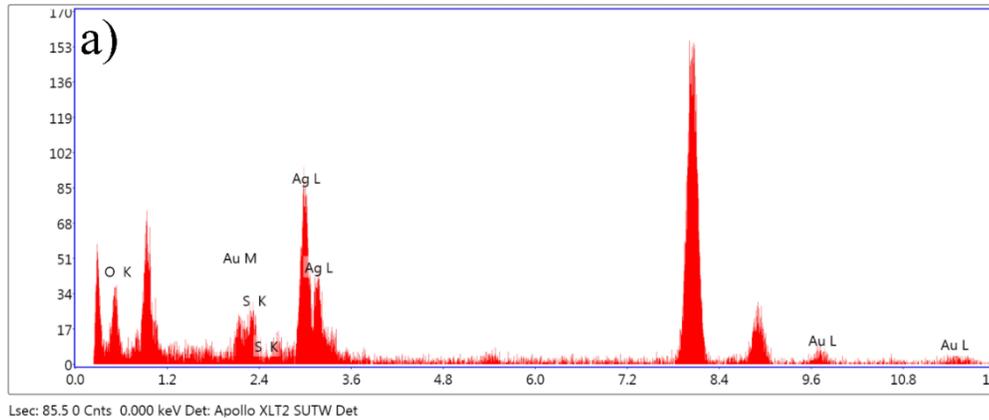


Figura 3.4.7 STEM EDS: mapeo de elementos del sistema Au@Ag. a): campo oscuro, b): mapeo de Au, c): mapeo de Ag, d): mapeo de S, e): mapeo de O y f): unión de los incisos anteriores

Por último, la figura 3.4.8 muestra el espectro de energías y la tabla de distribución elemental como complemento de la figura 3.4.7. tanto el espectro como la tabla muestran la presencia de los elementos constituyentes de las nanopartículas, entre los cuales figura el S, confirmando lo visto en la figura 3.4.7. En el trabajo citado antes de Ghosh *et. al.*, se habla de que las nanopartículas Au@Ag producidas consisten de $57.34 \pm 1.01\%$ Au y $42.66 \pm 0.97\%$ Ag de la masa total. La clara diferencia de cantidades entre esas nanopartículas y las aquí presentadas indica un exceso de precursor de Ag al momento de la síntesis, por lo que habrá que cambiar la cantidad añadida para evitar la presencia de nanopartículas Ag.



b)

| Elemento | % átomico | %Error |
|----------|-----------|--------|
| O K | 28.53 | 7.95 |
| S K | 9.96 | 12.8 |
| Ag L | 55.24 | 5.56 |
| Au L | 6.28 | 20.98 |

Figura 3.4.8 STEM EDS. a): espectro de energías y b): tabla de distribución elemental. Sistema Au@Ag

3.5 Resultados de DRX

La figura 3.5.1 muestra el difractograma realizado a las nanopartículas de Au, las cuales se encontraban en forma de película. En el difractograma aparecen cinco picos de intensidad que pertenecen cada uno a una familia de planos diferente (indicadas en la parte superior de cada pico), los cuales en conjunto pertenecen al sistema cristalino cúbico centrado en las caras (FCC por sus siglas en inglés). La cantidad L dentro de la imagen pertenece al tamaño (diámetro) de las nanopartículas, calculado mediante el uso de la ecuación de Scherer.

Comparando los tamaños obtenidos con la ecuación de Scherer y el tamaño promedio obtenido por TEM, se puede observar una discrepancia de tamaños de alrededor de 15 nm. Dado a que en TEM uno puede comprobar el tamaño de las partículas por medio de la imagen y su escala, parece ser que el tamaño de las nanopartículas calculado por DRX corresponde a una población diferente a la mostrada en TEM, además de ser abundante.

En relación con síntesis utilizando otros extractos, el espectro de DRX presenta similitudes con otros trabajos. En particular, los trabajos de Bhat *et. al.* y Dorosti *et. al.* presentan difractogramas de nanopartículas Au con picos que representan a las familias (111), (200), (220) y (311), del

sistema cristalino FCC. Estos cuatro picos coinciden con los aquí reportados. Además, Dorosti et. al. presentan un tamaño de nanopartícula calculado por la ecuación de Scherer de 23.7 nm, el cual discrepa de sus resultados de TEM (7.9 – 22.63 nm, promedio de 11 nm). Esto es un indicio de que la situación aquí presentada (discrepancia entre los tamaños de DRX y TEM) no es única a este trabajo, siendo posiblemente una característica resultado de la síntesis con extracto.

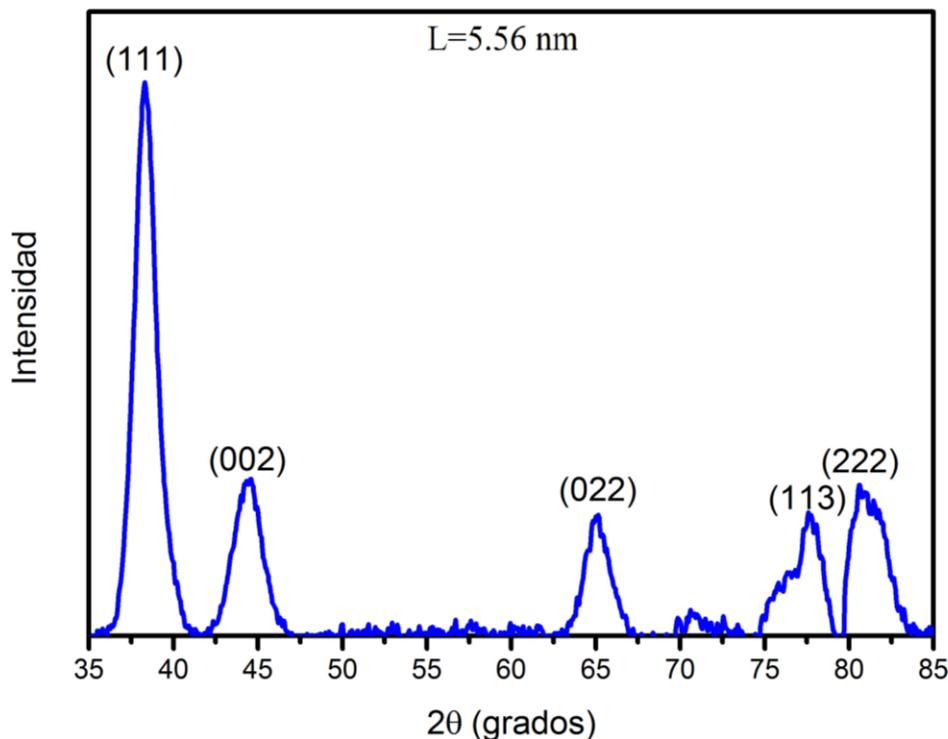


Figura 3.5.1 difractograma de las nanopartículas Au

En la figura 3.5.2 aparece el difractograma de las nanopartículas de Ag, también en forma de película. Al igual que en el sistema anterior, las nanopartículas de Ag presentan cinco picos de intensidad idénticos en posición a los del sistema Au, por lo que ambos sistemas de nanopartículas pertenecen al sistema cristalino FCC. Sin embargo, el tamaño de las nanopartículas resultó más grande que en el caso anterior lo cual indica que estas nanopartículas son más grandes que las de Au. Además, se presenta una discrepancia similar que en las nanopartículas Au, indicando que la situación no es de un único sistema.

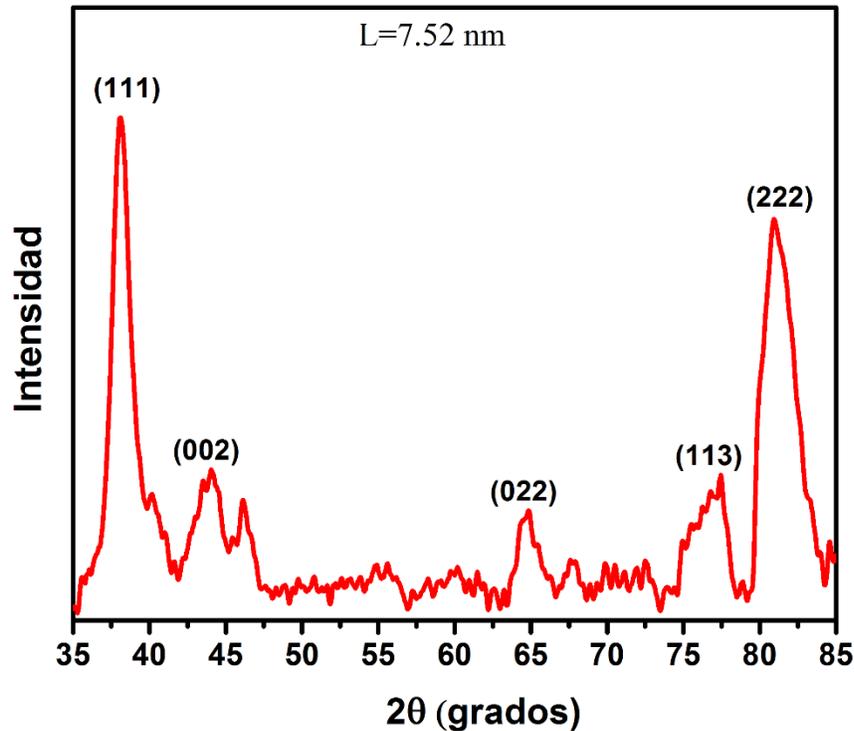


Figura 3.5.2 difractograma de las nanopartículas de Ag

La figura 3.5.3 presenta el difractograma realizado a las nanopartículas de Au@Ag, en las mismas condiciones que los sistemas monometálicos. En el difractograma aparecen cinco picos de intensidad que se ubican en la misma posición que los sistemas anteriores, indicando que estas nanopartículas también pertenecen al sistema cristalino FCC, consecuencia obvia ante la combinación de dos elementos que pertenecen al mismo sistema cristalino. En este caso la ecuación de Scherer arrojó un tamaño de nanopartícula mayor al de los dos anteriores, lo cual era de esperarse, ya que el método de síntesis implica el crecimiento de la coraza sobre un núcleo ya formado. Por otro lado, este resultado también difiere del obtenido en TEM.

Aunque no se encontró bibliografía específica sobre nanopartículas Au@Ag, se encontraron sistemas de aleación Au-Ag que reportan coincidencias entre el sistema cristalino de nanopartículas monometálicas de los materiales constituyentes de las bimetálicas. En particular, los trabajos de Alarfaj *et. al.* (síntesis en gelatina), Gopinath *et. al.* (extracto de hoja de *Gloriosa superba*) y Karthika *et. al.* (corteza de *Guazuma ulmifolia*) presentan síntesis de nanopartículas bimetálicas Au-Ag en forma de aleación. Estos trabajos presentan difractogramas de nanopartículas bimetálicas con picos pertenecientes a las familias de planos (111), (200), (220)

y (311) del sistema cristalino FCC [7-9]. Dado que las familias de planos coinciden con las aquí presentadas, se puede confirmar la obtención de nanopartículas bimetálicas del sistema FCC.

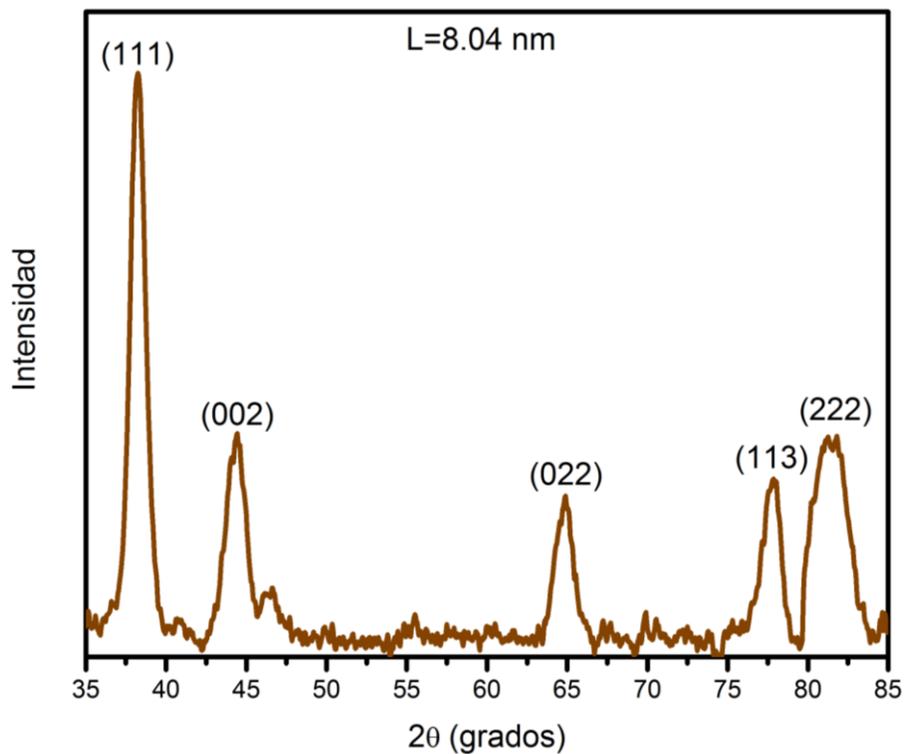


Figura 3.5.3 difractograma de las nanopartículas Au@Ag

La figura 3.5.4 es la comparación de los difractogramas de las figuras anteriores, confirmando que todos los picos coinciden en ubicación, comprobando así que todos los sistemas de nanopartículas pertenecen al mismo sistema FCC.

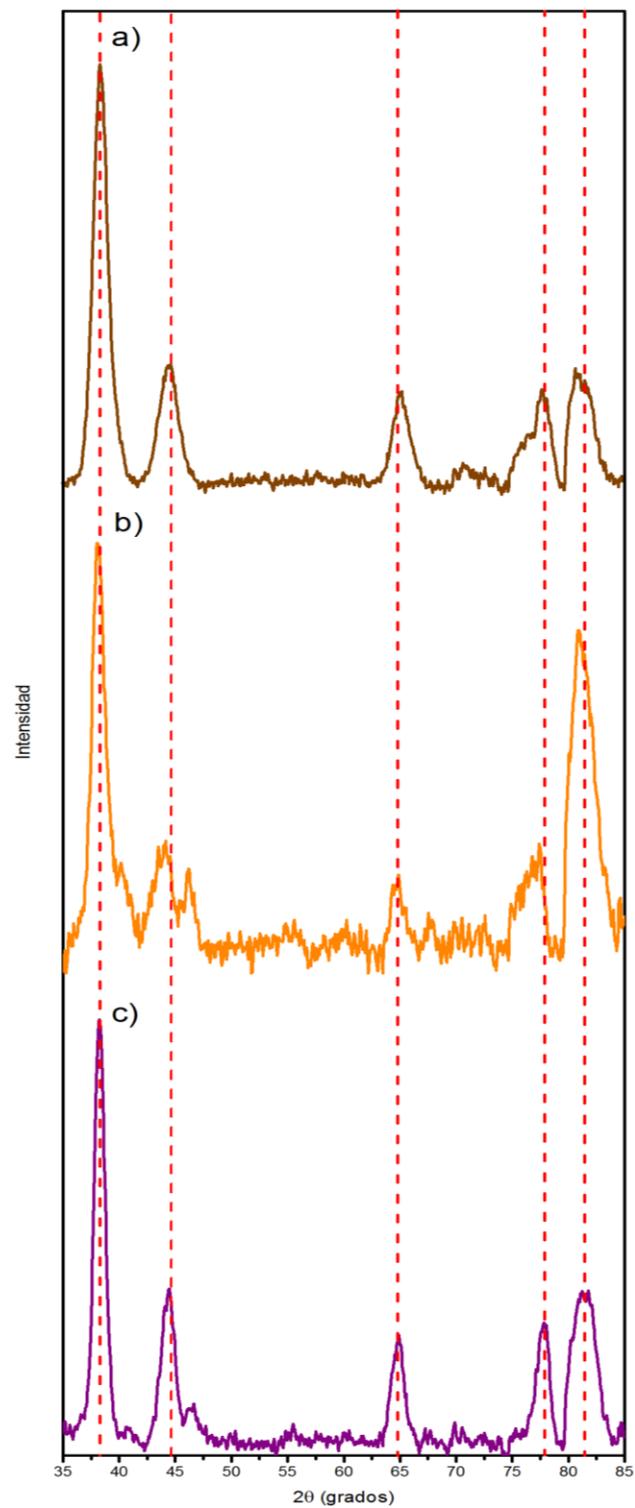


Figura 3.5.4 Comparación de los tres difractogramas. a): sistema Au@Ag, b): sistema Au y c): sistema Au@Ag

3.6 Resultados de potencial Z

A continuación se presentan los resultados para el potencial Z de los sistemas monometálicos de Au y Ag, así como el sistema bimetálico Au@Ag. Las gráficas que aparecen en esta sección fueron creadas a partir de la digitalización de las capturas de pantalla de las gráficas del software que maneja el instrumento, es decir, se obtuvieron los datos originales a partir de imágenes que contenían a las gráficas. Para cada muestra se hicieron tres repeticiones y, siguiendo las recomendaciones del software del equipo, se tomaron solo las gráficas resultantes de las corridas “buenas” (una corrida buena es aquella que es designada como tal en el reporte de resultados del software del equipo). Los valores de potencial Z que se presentan corresponden al promedio de las corridas “buenas” de cada muestra.

La figura 3.6.1 corresponde a una gráfica representativa para el sistema de nanopartículas de Au. El potencial Z promedio para este sistema es de -39.8 ± 8.1 mV, lo que indica que las nanopartículas son estables. Baharara et. al. reportan sus nanopartículas Au con un potencial Z entre los -30 a -50 mV, concluyendo la estabilidad de sus nanopartículas. Asumiendo la misma regla (± 30 mV indican estabilidad), las nanopartículas Au tanto como las Ag y Au@Ag que se muestran enseguida presentan alta estabilidad.

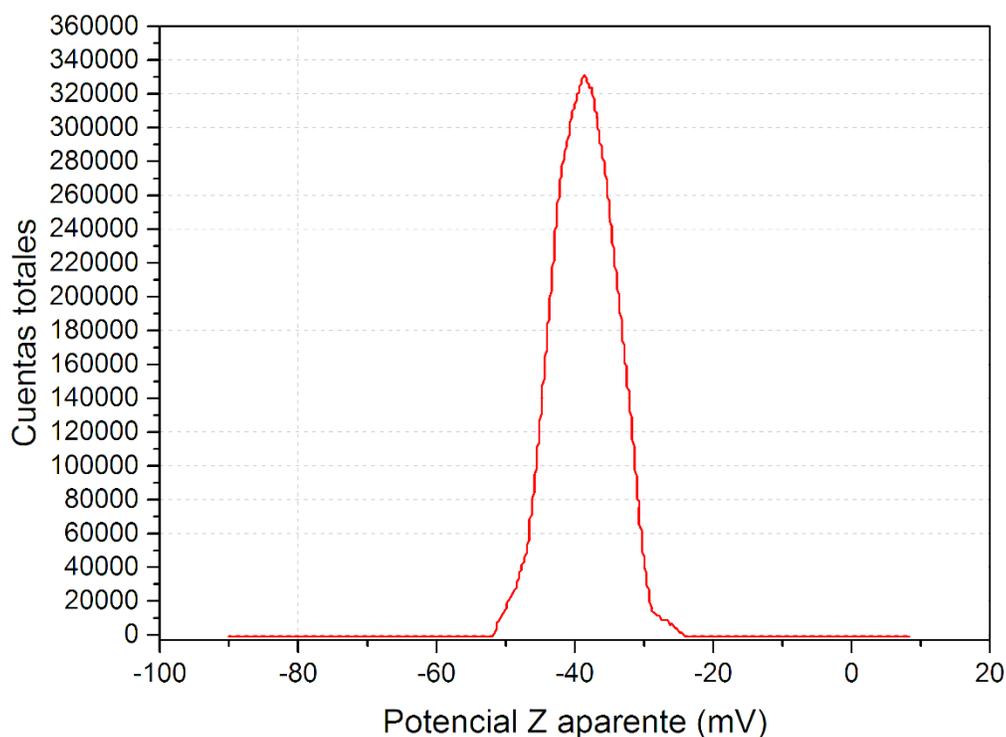


Figura 3.6.1 gráfica del potencial Z para nanopartículas Au

En la figura 3.6.2 se aprecia la gráfica representativa para el sistema de nanopartículas de Ag. El potencial Z promedio para este sistema es de -35.0 ± 7.1 mV, lo que indica que las nanopartículas son estables. En relación a todos los sistemas, éste resultó ser el menos estable de todos.

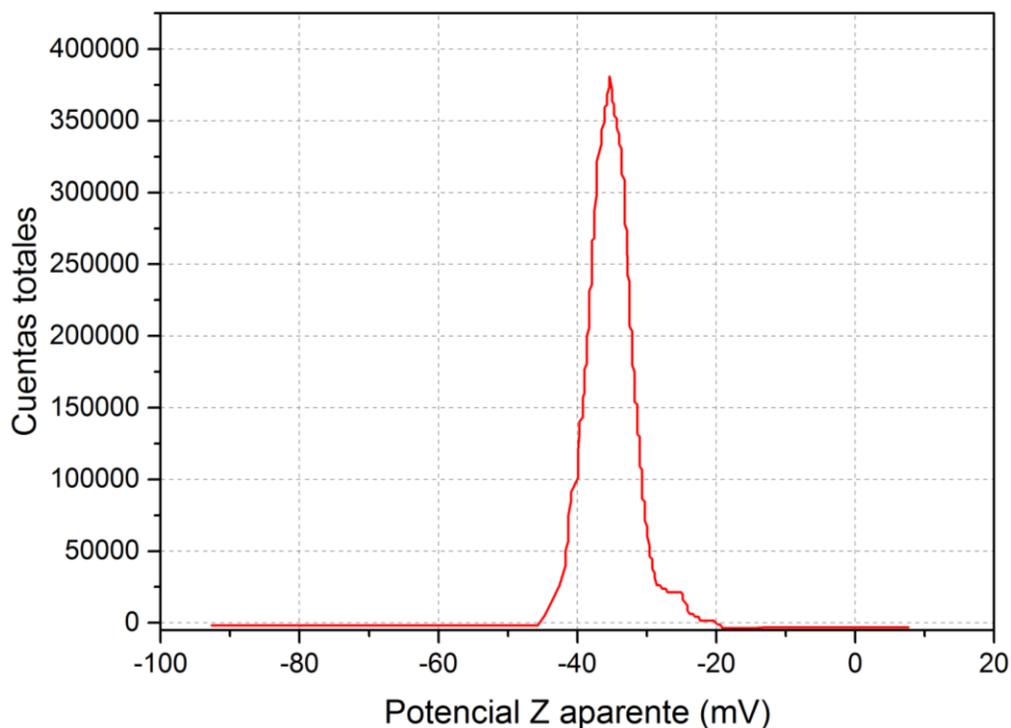


Figura 3.6.2 gráfica del potencial Z para nanopartículas Ag

En la figura 3.6.3 aparece la gráfica representativa para el sistema de nanopartículas de Au@Ag. El potencial Z promedio para este sistema es de -40.7 ± 6.0 mV, lo que indica que este sistema de nanopartículas es el más estable de todos.

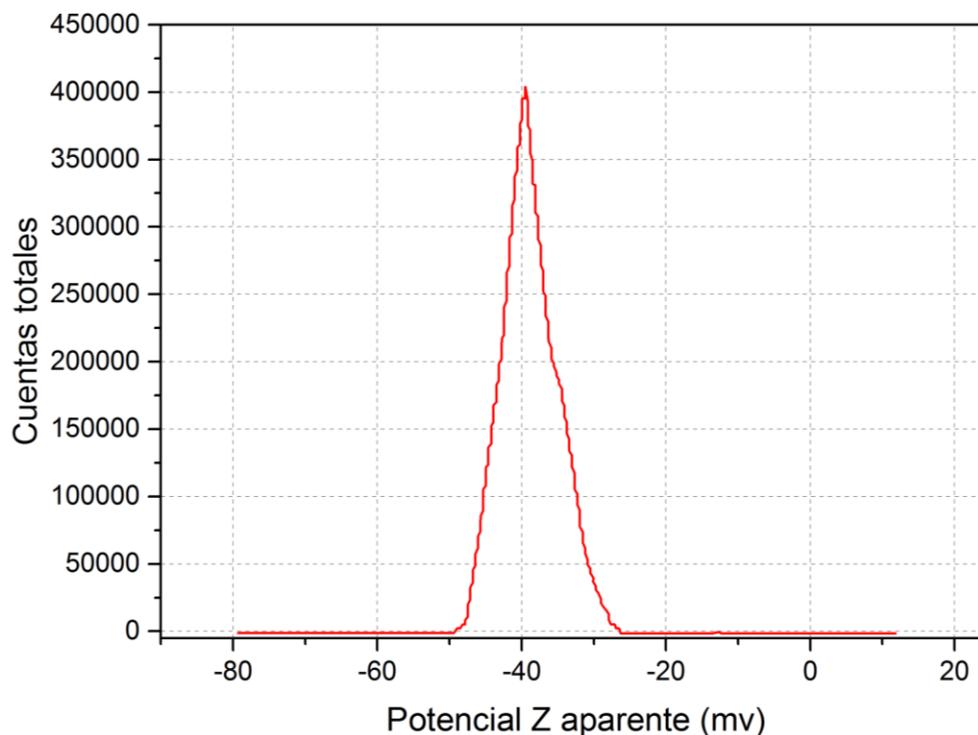


Figura 3.6.3 gráfica de potencial Z para nanopartículas Au@Ag

3.7 Resultados de pruebas biológicas

Azul de Tripano

A continuación se presentan los histogramas de viabilidad obtenidos por conteo en cámara de Neubauer con azul de tripano. El procedimiento para dicho conteo se encuentra en el apéndice correspondiente. Los datos crudos, el conteo de células vivas y muertas fue convertido a porcentaje de cada conteo para después ser promediados. Las barras de los histogramas representan a dichos promedios junto con su respectiva desviación estándar. La V en los histogramas significa vehículo, el solvente de los materiales, que en este caso fue dimetil sulfóxido (DMSO) al 5% en agua ultrapura.

Uno de los procedimientos más utilizados para contabilizar viabilidad celular es el ensayo MTT, el cual consiste en la verificación de la actividad metabólica celular por medio de la lectura en el espectro visible. La razón por la cual se decidió no incluir resultados de esta técnica fue debido a que el extracto de *Rumex hymenosepalus*, el cual contiene gran cantidad de polifenoles interfirió alterando los resultados de las mediciones de viabilidad realizadas. Este tipo de efectos ya ha sido reportado con anterioridad para extractos polifenólicos en pruebas de MTT [10, 11].

La figura 3.7.1 pertenece al histograma de las células HeLa en contacto con distintas concentraciones de extracto de *Rumex hymenosepalus*. La disminución del porcentaje de sobrevivencia al aumentar la concentración de extracto es un indicio de que este material es nocivo para las células cancerosas, encontrándose que la mitad de las células mueren a una concentración ubicada entre los 50 – 100 $\mu\text{g/mL}$.

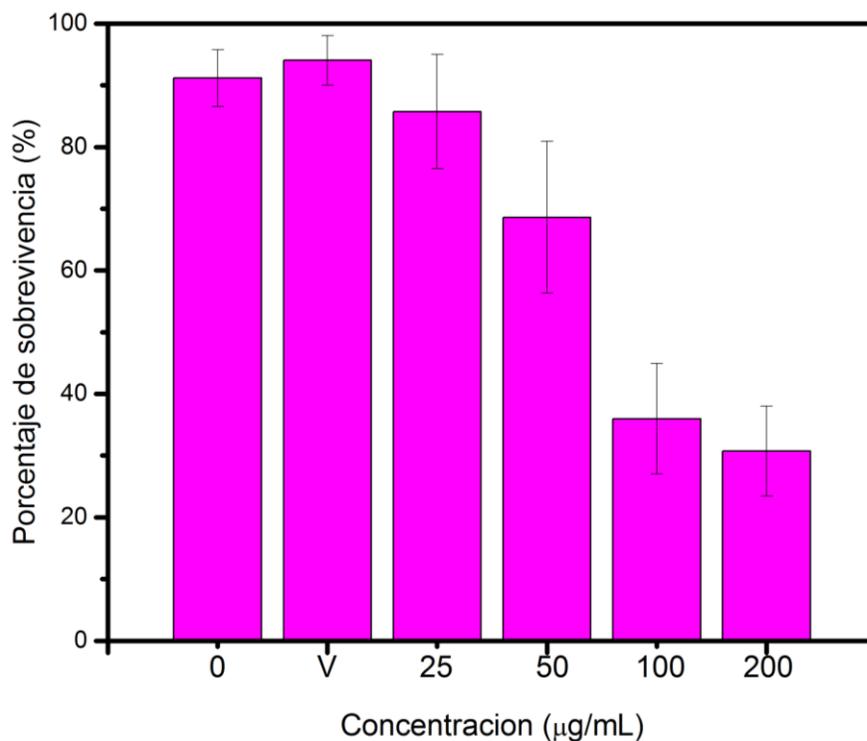


Figura 3.7.1 histograma de células HeLa en presencia de extracto de *Rumex hymenosepalus*

En la figura 3.7.2 aparece el histograma de las células HeLa en contacto con distintas concentraciones de extracto de nanopartículas de Au. Al contrario que en el caso del extracto, el porcentaje de sobrevivencia no disminuye al aumentar la concentración de nanopartículas, por lo tanto, este material no es tóxico para las células cancerosas.

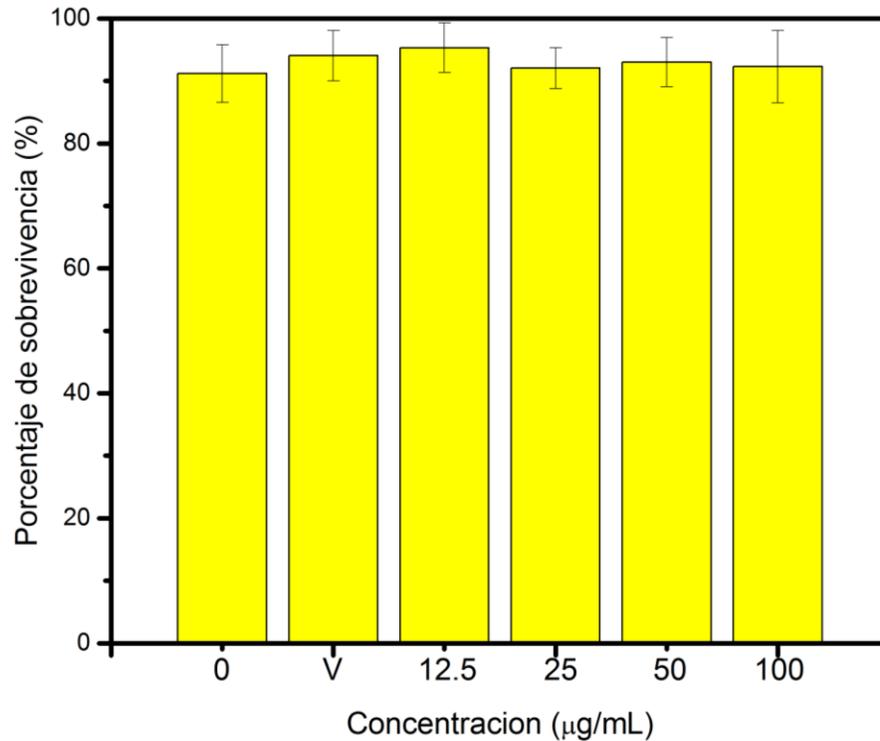


Figura 3.7.2 histograma de células HeLa en presencia de nanopartículas de Au

En la figura 3.7.3 se muestra el histograma de las células HeLa en contacto con distintas concentraciones de extracto de nanopartículas de Ag. Al igual que en el caso de las nanopartículas de Au, el porcentaje de sobrevivencia no se ve afectado al aumentar la concentración de nanopartículas, por lo tanto, las nanopartículas de Ag no son tóxicas para las células cancerosas.

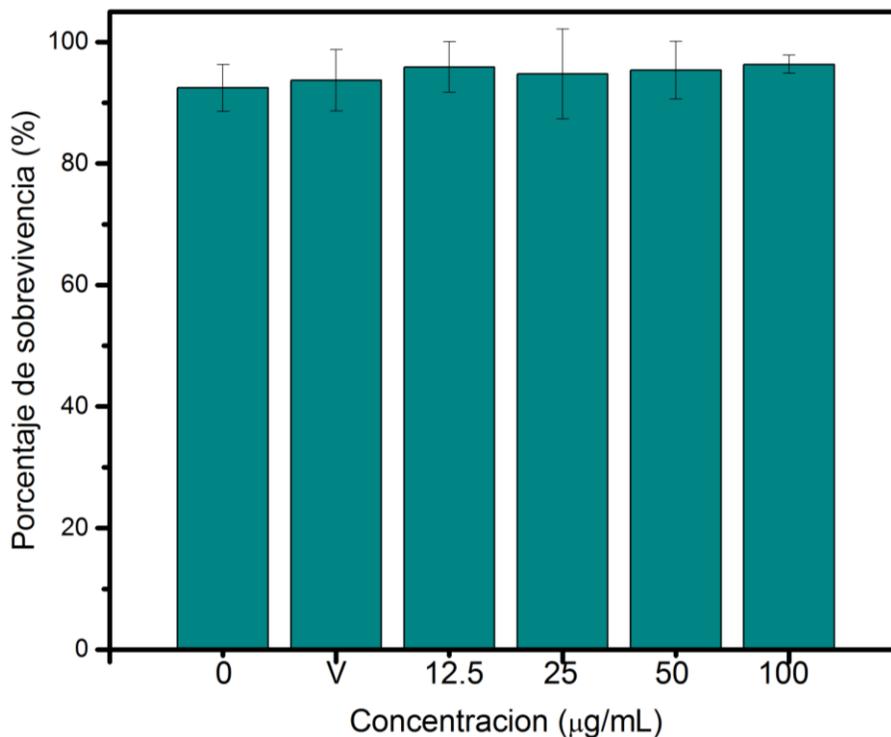


Figura 3.7.3 histograma de células HeLa en presencia de nanopartículas de Ag

En la figura 3.7.4 es el histograma de las células HeLa en contacto con distintas concentraciones de extracto de nanopartículas bimetálicas Au@Ag. Al igual que en los casos de nanopartículas monometálicas, el porcentaje de sobrevivencia no se ve reducido de forma considerable al aumentar la concentración de nanopartículas, por lo tanto, las nanopartículas bimetálicas no son tóxicas para las células cancerosas. El efecto de sinergia que se esperaba tampoco ocurrió, en consecuencia, las nanopartículas bimetálicas en forma núcleo@coraza no cuentan con un efecto de toxicidad celular aumentado en comparación con los sistemas monometálicos constituyentes. Respecto a las pruebas de citotoxicidad reportadas para sistemas similares, en los trabajos anteriormente citados de Baharara *et. al.* y Dorosti *et. al.*, se cuantificó la IC₅₀ de células HeLa con nanopartículas Au mediante el ensayo MTT, resultando en los respectivos valores de 100 y 196.32 µg/mL. De forma similar, Bhat *et. al.* y Balashanmugam *et. al.* reportaron valores de la IC₅₀ de 36.7 y 50 µg/mL, respectivamente [12, 13].

Sin embargo, la búsqueda de sistemas bimetálicos Au@Ag en líneas HeLa no arrojó ningún resultado satisfactorio, siendo trabajos de cercana similitud el de Karthika *et. al.* donde reportaron por medio de MTT una IC₅₀ de 24.83 µM, utilizando nanopartículas Au-Ag en forma

de aleación y el trabajo de Fakhri et. al., que presenta nanopartículas Ag@Ag con concentración de 1 mM con reducción de la proliferación de 51.61 % para la línea A549 (cáncer de pulmón humano) y 59.11 % para la línea MCF-7 (cáncer de mama humano) [14].

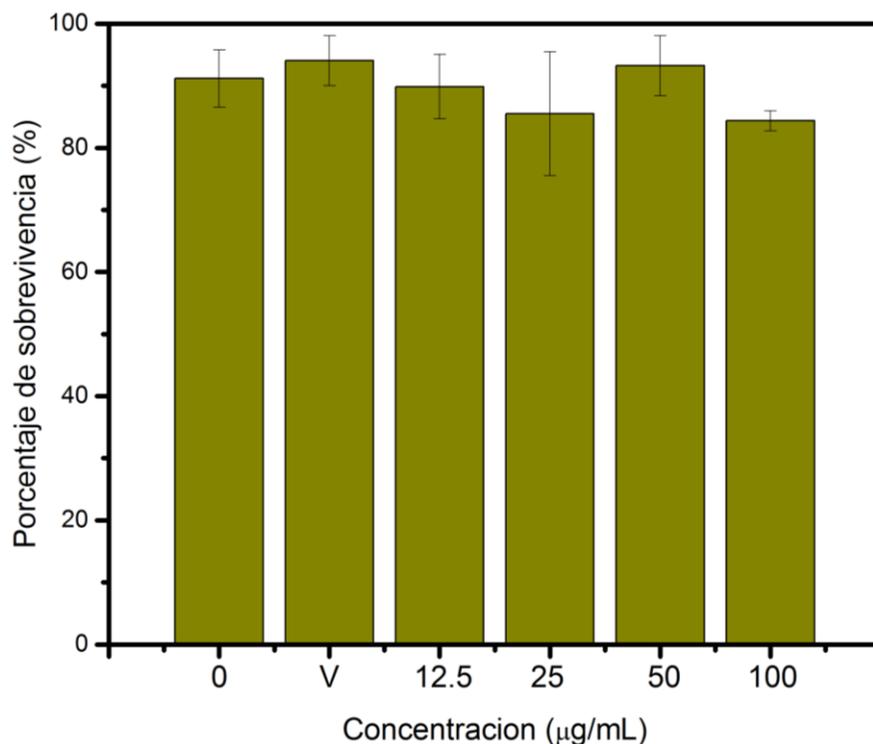


Figura 3.7.4 histograma de células HeLa en presencia de nanopartículas bimetálicas Au@Ag

Dado que los resultados de viabilidad indican que ningún sistema de nanopartículas no es citotóxico para las células HeLa, se sugiere que estas no sufren ningún daño significativo en presencia de las nanopartículas. Las siguientes pruebas cualitativas demuestran la internalización de las nanopartículas en las células, así como cambios de morfología en ellas, sin llegar a causar su muerte.

Marcaje en confocal

A continuación se presentan las imágenes de tinción de células en presencia de nanopartículas de Au a través del tiempo obtenidas por microscopía confocal. El procedimiento para dicho proceso se encuentra en el apéndice correspondiente. Se utilizaron tres canales para ubicar el anticuerpo anti-actina (referido de aquí en adelante como actina), DAPI y las nanopartículas. En

la tabla 3.7.1 aparece la información del microscopio confocal utilizado así como de los colorantes utilizados en las pruebas de marcaje para internalización y ROS.

Tabla 3.7.1 Información del microscopio confocal y colorantes utilizados

| | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|----------------------|
| Microscopio | Axio Observer.Z1 | | | |
| Objetivo | Plan-Apochromat 40x/0.95 Korr M27 | | | |
| Pinhole (μm) | 50 | 38 | 46 | 41 |
| $\lambda_{\text{láser}}$ (nm) | 561: 0.85 % | 405: 0.85 % | 488: 0.85 % | 488: 0.20 % |
| Colorante | Autofluorescencia AuNps | Anti-actina | DAPI | H ₂ DCFDA |
| Color | | | | |
| λ_{ex} (nm) | 577 | 353 | 495 | 495 |
| λ_{em} (nm) | 603 | 465 | 519 | 519 |
| λ_{det} (nm) | 585 – 700 | 400 – 565 | 400 – 565 | 400 – 565 |
| Detector | GaAsP | GaAsP | GaAsP | GaAsP |
| Ganancia | 650 V | 600 V | 650 V | 637 V |

La figura 3.7.5 muestra un conjunto de cuatro fotografías pertenecientes al control de células. Las primeras tres imágenes de la izquierda pertenecen a los canales de actina, DAPI y nanopartículas, mientras que la imagen de la derecha es la unión de los canales individuales. Por obvias razones, el canal de nanopartículas no muestra nada en el control.

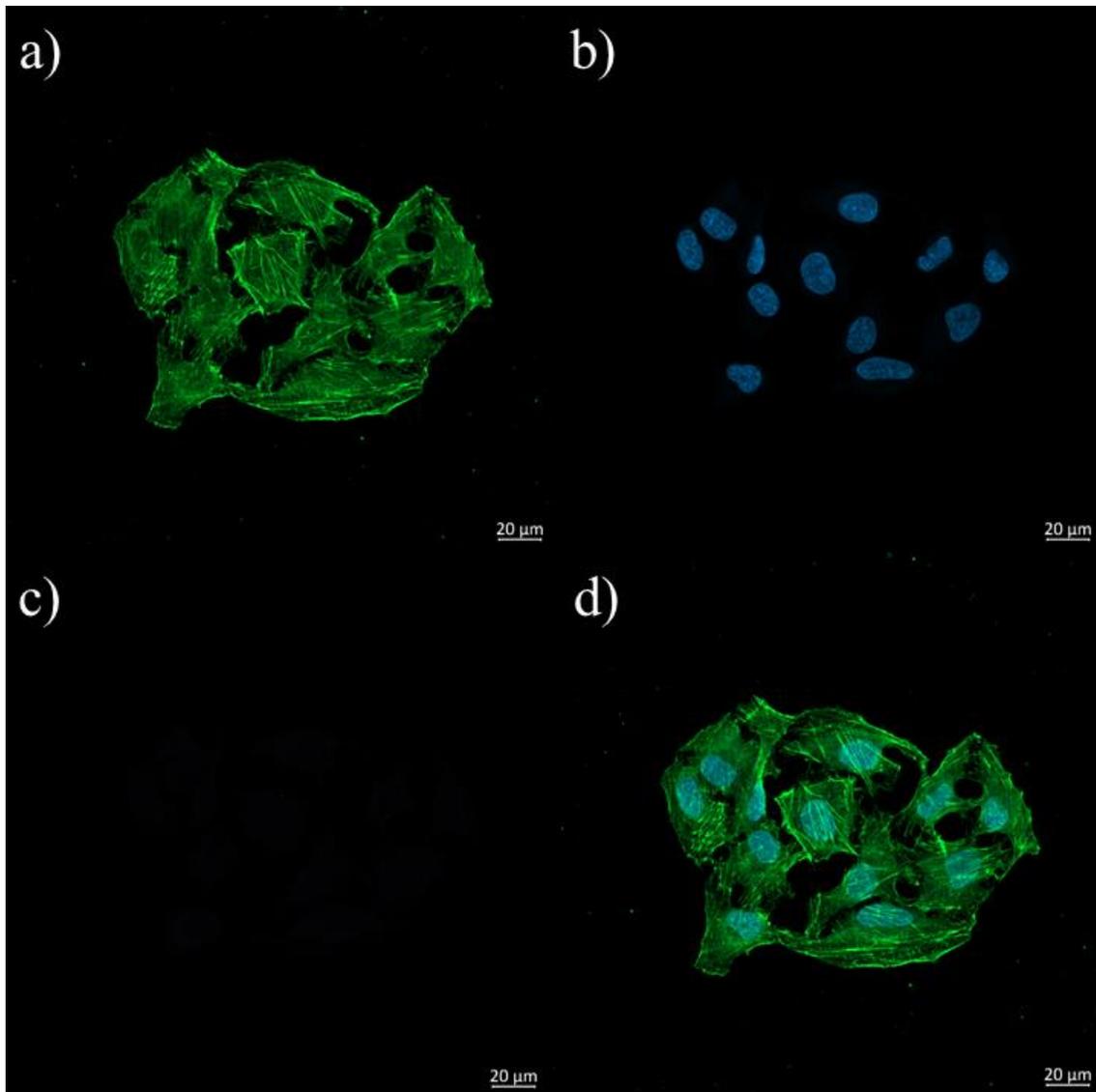
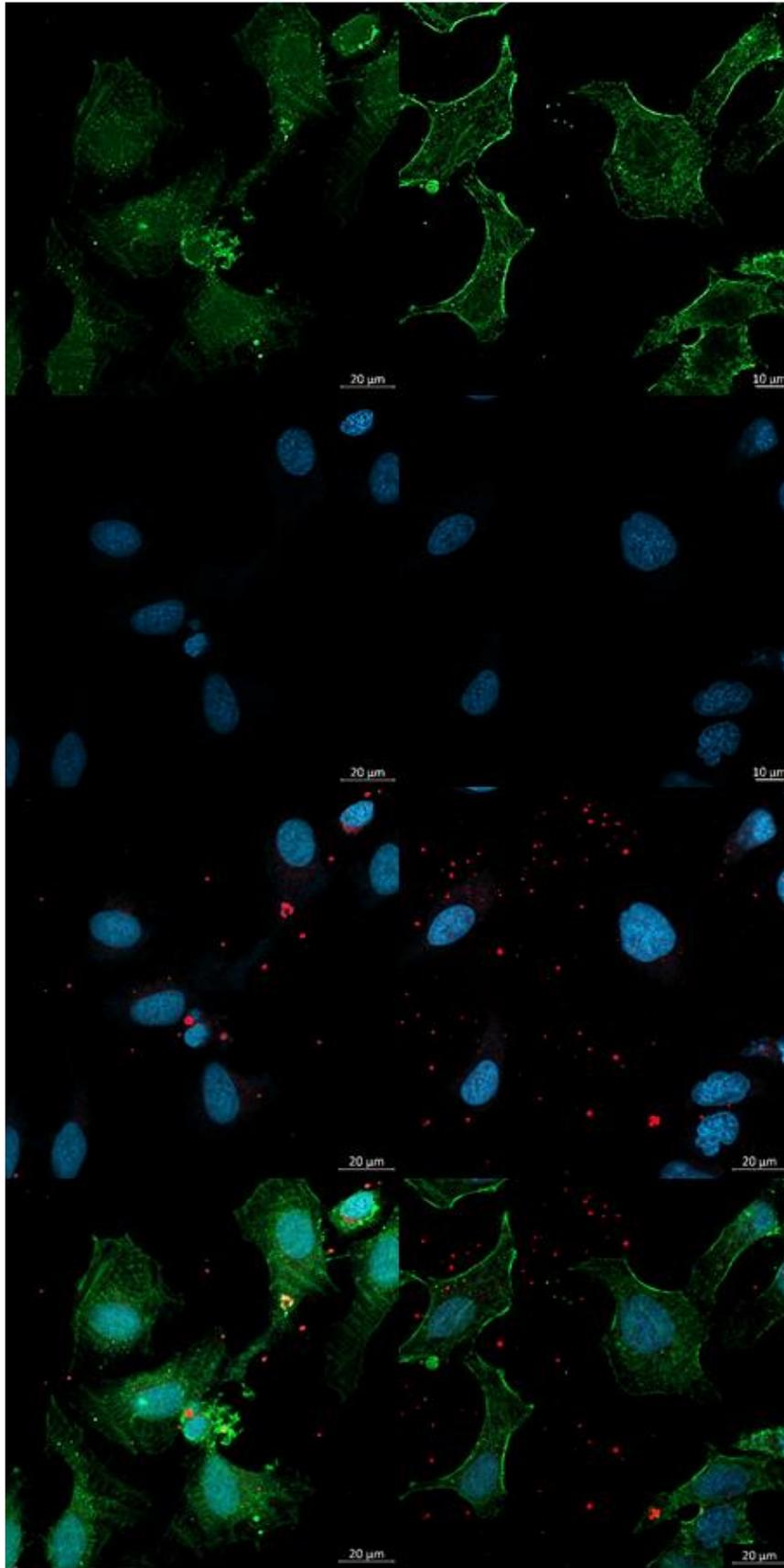


Figura 3.7.5 control de células HeLa. a): marcaje anti-actina, b): marcaje DAPI, c): nanopartículas Au y d): unión de los incisos anteriores

La figura 3.7.6 muestra la comparación entre los tiempos de 1 hora y 24 horas. En general, en ambos tiempos se observan dos diferencias significativas respecto al control: el tamaño de todas las células (incluyendo núcleos) se encuentra aumentado y presentan una forma irregular como consecuencia del estrés visible por medio del cambio en las fibras de soporte (en el control las fibras de actina se encuentran organizadas, mientras que en aquellas que están tratadas con nanopartículas se observa una reorganización de actina similar al efecto conocido como branching o derivación).

La diferencia particular entre los dos tiempos es la ubicación de las nanopartículas dentro de las células. En ambos tiempos, las nanopartículas se encuentran en su mayoría alrededor del núcleo, pero lo hacen en mayor cantidad en 1 h que en 24 h, lo que indica que, aunque las nanopartículas entran y causan efectos en las células relativamente rápido, al pasar el tiempo aquéllas desaparecen dentro de éstas.



1 h

24 h

Actina

DAPI

**DAPI+
AuNps**

**Actina+
DAPI+
AuNps**

Figura 3.7.6 canales y uniones para sistemas HeLa + AuNps a 1 y 24 h

La figura 3.7.7 muestra la comparación entre los tiempos de 3, 6 y 12 horas. Como estos intervalos están en medio de los de la imagen anterior, son adecuados para mostrar el cambio gradual de la forma de las células y de la ubicación de las nanopartículas de Au.

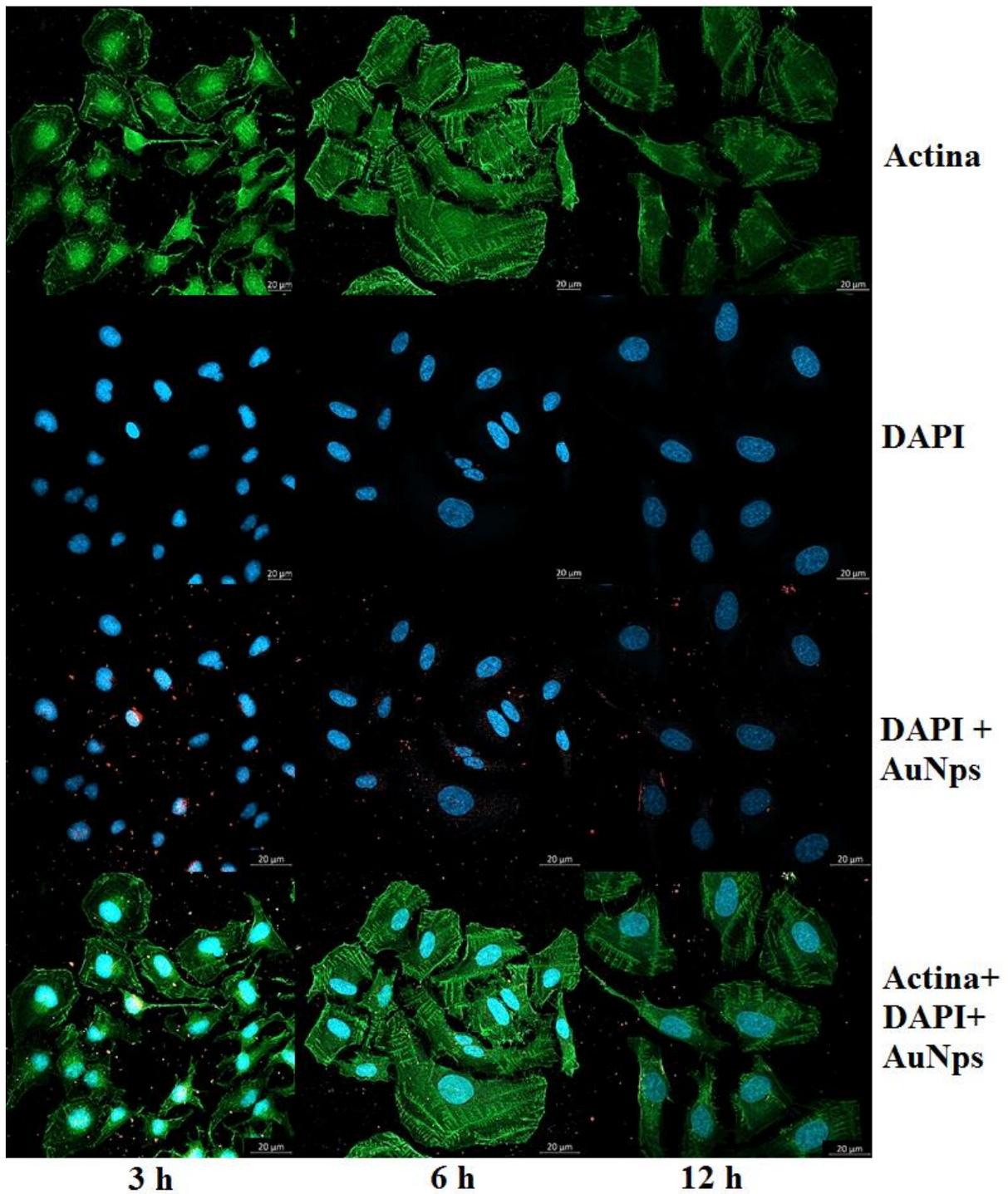


Figura 3.7.7 canales y uniones para sistemas HeLa + AuNps a 3, 6 y 12 h

ROS en confocal

En seguida se presentan las imágenes de tinción de células para detección de especies reactivas de oxígeno (en inglés Reactive Oxygen Species, ROS) obtenidas por microscopía confocal. El procedimiento para dicho proceso se encuentra en el apéndice correspondiente. Se utilizó solo un canal para detectar ROS por medio de fluorescencia (en color verde), además del campo claro.

La figura 3.7.8 muestra la comparación de las células control y las que contienen AuNps. La alta concentración de fluorescencia en el canal HeLa + AuNps indica que las células producen ROS al entrar en contacto con las nanopartículas de Au.

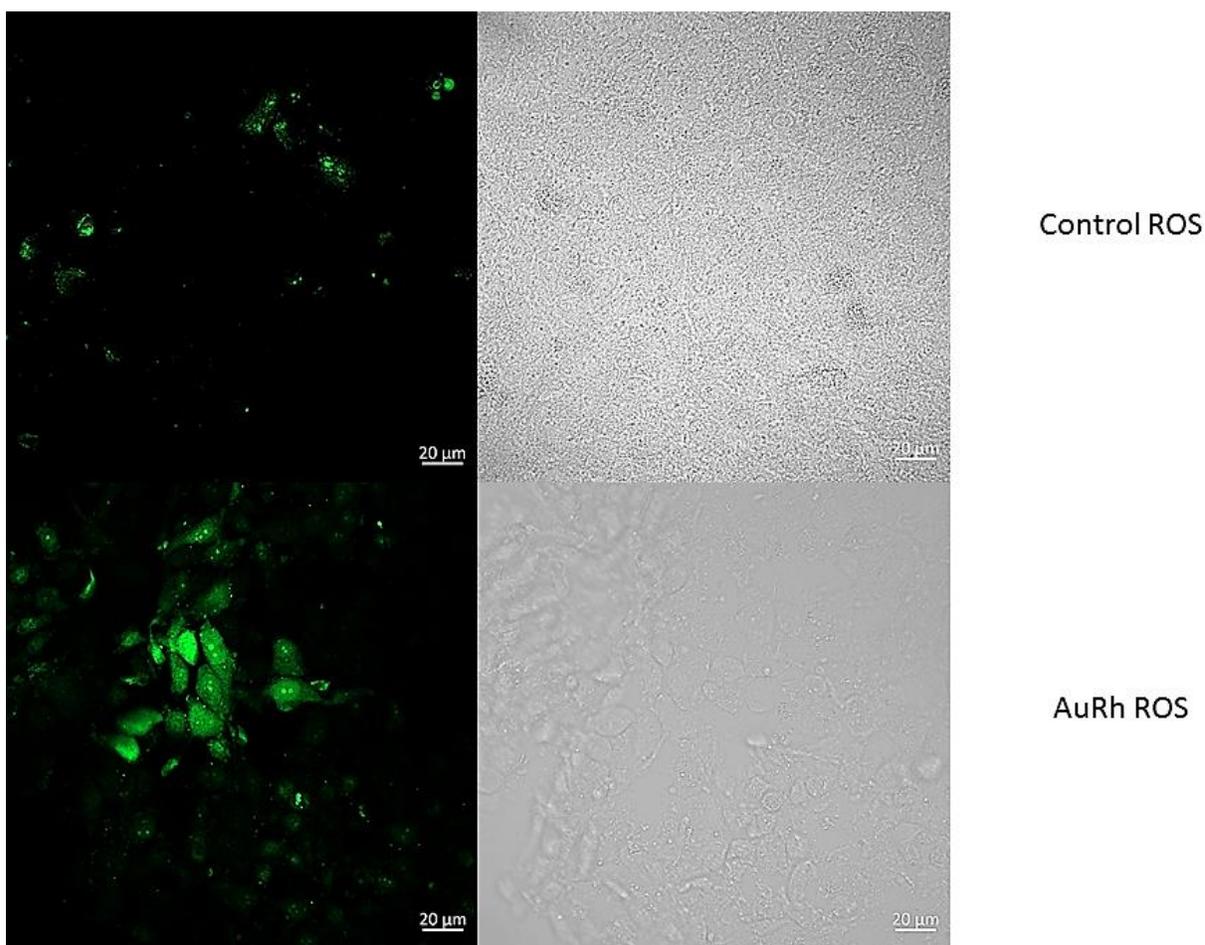


Figura 3.7.8 canal de fluorescencia verde y campo claro de control y HeLa + AuNps

La figura 3.7.9 pertenece a la comparación de las células con extracto de *Rumex hymenosepalus* (Rh) y las que contienen nanopartículas Au@Ag. La presencia de color verde en ambos canales de fluorescencia indica que las células producen ROS al entrar en contacto con los materiales, pero poseen distribuciones de color muy diferentes. La presencia de Rh en la células propicia

una alta producción de ROS traducida en bultos grandes de forma irregular en casi todas las células del campo visual. Sin embargo, la presencia de las nanopartículas Au@Ag en las células provoca producción de ROS que se manifiesta en su mayoría en puntos redondos pequeños a regulares presentes en pares.

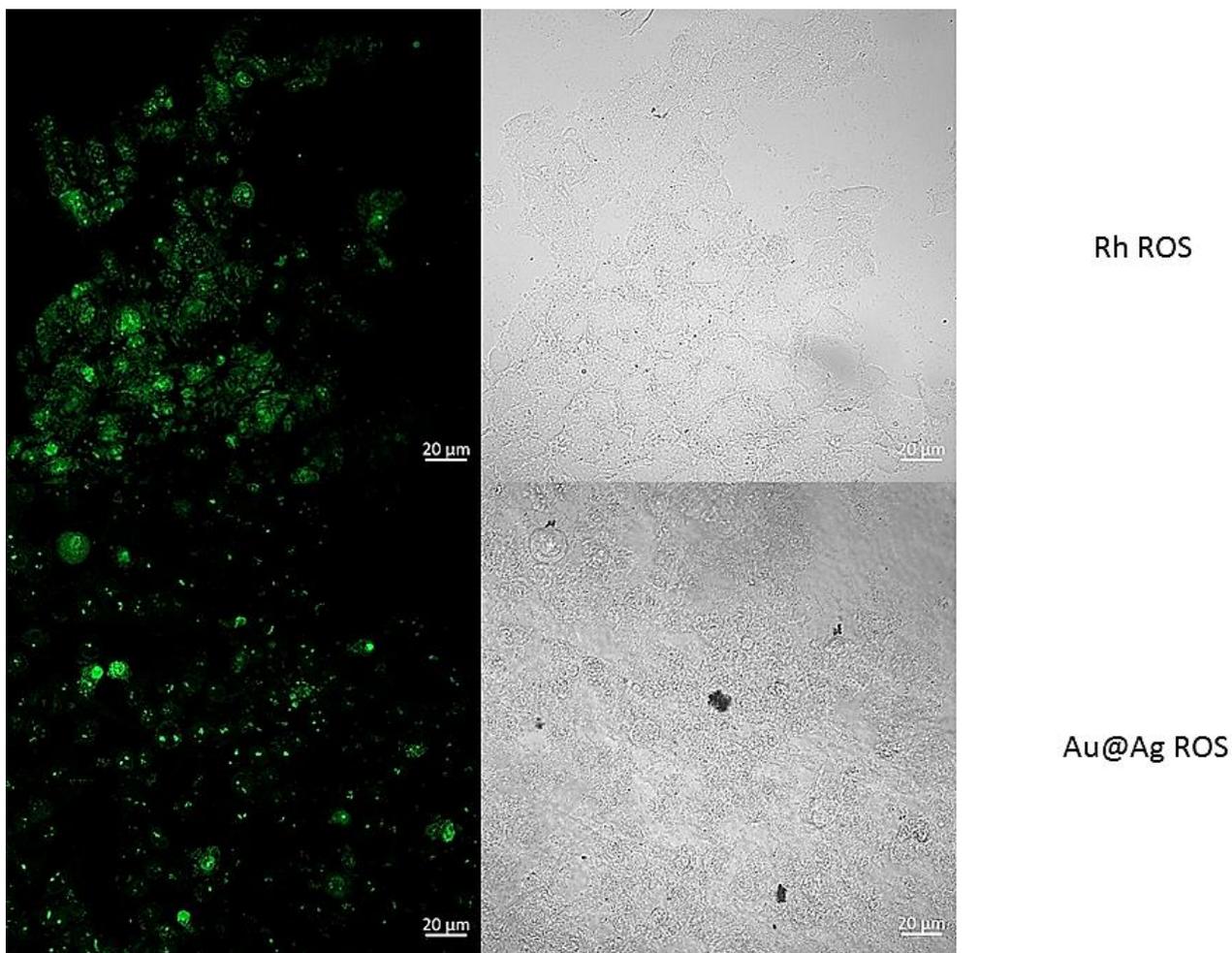


Figura 3.7.9 canal de fluorescencia verde y campo claro de HeLa + Rh y HeLa + Au@Ag

Referencias

- [1] Li, Y., Shi, Q., Zhang, P., Xiahou, Y., Li, S., Wang, D., & Xia, H. (2016). Empirical structural design of core@ shell Au@ Ag nanoparticles for SERS applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(27), 6649-6656.
- [2] Dhas, T. S., Kumar, V. G., Karthick, V., Govindaraju, K., & Narayana, T. S. (2014). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Sargassum swartzii* and its cytotoxicity effect

- on HeLa cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *133*, 102-106.
- [3] Baharara, J., Ramezani, T., Divsalar, A., Mousavi, M., & Seyedarabi, A. (2016). Induction of apoptosis by green synthesized gold nanoparticles through activation of caspase-3 and 9 in human cervical cancer cells. *Avicenna journal of medical biotechnology*, *8*(2), 75.
- [4] Dorosti, N., & Jamshidi, F. (2016). Plant-mediated gold nanoparticles by *Dracocephalum kotschyi* as anticholinesterase agent: synthesis, characterization, and evaluation of anticancer and antibacterial activity. *Journal of Applied Biomedicine*, *14*(3), 235-245.
- [5] Kamimura, S., Yamashita, S., Abe, S., Tsubota, T., & Ohno, T. (2017). Effect of core@ shell (Au@ Ag) nanostructure on surface plasmon-induced photocatalytic activity under visible light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, *211*, 11-17.
- [6] Ghosh, S., Jagtap, S., More, P., Shete, U. J., Maheshwari, N. O., Rao, S. J., ... & Pal, J. K. (2015). *Dioscorea bulbifera* mediated synthesis of novel Au core Ag shell nanoparticles with potent antibiofilm and antileishmanial activity. *Journal of Nanomaterials*, *16*(1), 161.
- [7] Alarfaj, N. A., & El-Tohamy, M. F. (2016). Eco-friendly synthesis of gelatin-capped bimetallic Au–Ag nanoparticles for chemiluminescence detection of anticancer raloxifene hydrochloride. *Luminescence*, *31*(6), 1194-1200.
- [8] Gopinath, K., Kumaraguru, S., Bhakayaraj, K., Mohan, S., Venkatesh, K. S., Esakkirajan, M., ... & Benelli, G. (2016). Green synthesis of silver, gold and silver/gold bimetallic nanoparticles using the *Gloriosa superba* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activities. *Microbial pathogenesis*, *101*, 1-11.
- [9] Karthika, V., Arumugam, A., Gopinath, K., Kaleeswarran, P., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., ... & Benelli, G. (2017). *Guazuma ulmifolia* bark-synthesized Ag, Au and Ag/Au alloy nanoparticles: Photocatalytic potential, DNA/protein interactions, anticancer activity and toxicity against 14 species of microbial pathogens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *167*, 189-199.

- [10] KARAKAŞ, D., Ari, F., & Ulukaya, E. (2017). The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 919-925.
- [11] Wang, P., Henning, S. M., & Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PloS one*, 5(4), e10202.
- [12] Bhat, R., Sharanabasava, V. G., Deshpande, R., Shetti, U., Sanjeev, G., & Venkataraman, A. (2013). Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus Florida* and its anticancer evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 63-69.
- [13] Balashanmugam, P., Durai, P., Balakumaran, M. D., & Kalaichelvan, P. T. (2016). Phytosynthesized gold nanoparticles from *C. roxburghii* DC. leaf and their toxic effects on normal and cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165, 163-173.
- [14] Fakhri, A., Tahami, S., & Naji, M. (2017). Synthesis and characterization of core-shell bimetallic nanoparticles for synergistic antimicrobial effect studies in combination with doxycycline on burn specific pathogens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 169, 21-26.

Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas

En este capítulo se resumen los resultados presentados en el capítulo anterior. De forma adicional, se agregan comentarios útiles para mejorar la caracterización del sistema de nanopartículas metálicas.

El extracto obtenido de la raíz de la planta *Rumex hymenosepalus* es un buen agente reductor para la síntesis de nanopartículas de metales nobles e implementando un procedimiento secuencial es posible sintetizar nanomateriales bimetalicos con estructuras núcleo@coraza los cuales forman dispersiones coloidales estables.

La espectroscopía UV-Vis indica que las nanopartículas de Au se sintetizaron aproximadamente a los 15 minutos dentro del espectrómetro UV-Vis y en menor tiempo en condiciones de laboratorio (bajo agitación y expuestas a luz blanca). El plasmón de resonancia de superficie correspondiente a las nanopartículas Au@Ag sugiere la distribución de los dos metales en forma de núcleo@coraza, lo cual es confirmado en la caracterización por TEM y STEM. La técnica de difracción de rayos X indica que la estructura cristalina del sistema es FCC con un tamaño de nanopartícula de 8.04 nm. Por otro lado, respecto al tratamiento de los nanomateriales en la línea de células HeLa a 24 horas, las pruebas con azul de tripano revelaron que tanto nanopartículas monometálicas como bimetalicas no mostraron citotoxicidad considerable, sin embargo, sí mostraron producción de ROS.

En conclusión, el extracto macerado de la raíz de *Rumex hymenosepalus* resultó un buen agente reductor para la síntesis de nanopartículas monometálicas de Au y Ag, donde se obtuvieron partículas de tamaños promedios menores a 30 nm. Por un método secuencial de síntesis es posible producir nanopartículas bimetalicas con estructuras núcleo@coraza Au@Ag con tamaños promedios de 39 nm. La espectroscopía IR revela que las nanopartículas poseen compuestos provenientes del extracto que pueden participar como agentes estabilizantes del sistema coloidal de nanopartículas metálicas. Las pruebas de viabilidad celular a 24 horas en la línea celular HeLa no mostraron una citotoxicidad apreciable para los nanomateriales evaluados, sin embargo, existe una considerable producción de ROS a las 24 hrs, lo que sugiere extender

el estudio de citotoxicidad a un mayor tiempo. La ubicación subcelular de las nanopartículas de oro en células HeLa se encuentran alrededor del núcleo en etapas tempranas del ensayo (3 hrs). La tabla 4.1.1 resume los resultados obtenidos en la caracterización de los productos generados en el presente trabajo.

Tabla 4.1.1 Integración de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas

| Materiales | Máximo de PRSL (nm) | Tamaño en TEM (nm) | Tamaño en DRX (nm) | Estructura cristalina | Efecto citotóxico |
|-------------------|----------------------------|---|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Au | 533 | 20.8 ± 5.1 | 5.56 | FCC | No |
| Ag | 412 | 28.1 ± 10.0 | 7.52 | FCC | No |
| Au@Ag | 490 | 38.9 ± 5.8 (núcleo+coraza) 13.5 ± 4.5 (coraza) | 8.04 | FCC | No |

Respecto a las sugerencias, se requiere la implementación de un método para el control de los tamaños de las partículas, así como los espesores de las corazas y considerar la inversión del sistema bimetalico (Ag@Au) como variante de sistema bimetalico. Además, se requiere de un método óptico de determinación de la viabilidad celular que no interfiera con el extracto, así como examinar la viabilidad a tiempos mayores, particularmente a 48 y 72 horas.

Apéndices

Apéndice 1: Metodologías de síntesis de nanopartículas metálicas

El siguiente es el procedimiento adoptado para llevar a cabo la producción de las nanopartículas, dividido en varias partes. Empezando primero por el extracto que estabiliza a las nanopartículas, después los precursores metálicos y las nanopartículas y por último la preparación para cada técnica.

Obtención del extracto

Obtención del extracto de la planta *Rumex hymenosepalus* (Rh) por medio de la técnica de extracción por maceración. La concentración del extracto será de 15 g Rh/100 mL de solución EtOH/H₂O al 70/30 en volumen.

Extracto de la planta Rh: raíz deshidratada y cortada en rodajas. Se adquirió en una tienda comercial.

Procedimiento de la extracción.

- Pesar 15 g de Rh y depositar la masa en un frasco de vidrio color ámbar.
- Preparar la mezcla de solventes para la extracción: medir con probeta 30 mL de agua ultrapura y depositarla en el frasco. En seguida, medir con probeta 70 mL de etanol y depositarlo en el frasco.
- Almacenar el frasco para una maceración eficiente en un lugar oscuro y a temperatura ambiente (25 °C) por 21 días.
- Filtrar la solución de la extracción con filtro de papel Whatman 40 (retención de hasta 8 µm. Filtrado por gravedad.

Preparación de los precursores metálicos

Precursor I. Preparación de una solución de ácido tetracloroáurico, H₂AuCl₄ (PM = 339.79 g/mol) 0.01 M. Reactivo adquirido de Sigma—Aldrich, pureza 99.999 %.

- Se pesaron 0.3398 g del reactivo (polvo granuloso naranja) y se colocó en un matraz aforado de 100 mL.
- Se completó el volumen con agua ultrapura Millipore (18.2 MΩ).

- Se cubrió el matraz con papel aluminio para evitar cualquier fotoreacción.
- Se colocó un imán en el matraz y éste sobre una placa agitadora. Se agitó a 700 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
- Al término, se depositó la solución en un frasco de vidrio recubierto con papel aluminio.

Precursor II.

- Preparación de una solución de nitrato de plata, AgNO_3 , (PM = 169.87 g/mol) 0.1 M. Reactivo adquirido de Sigma—Aldrich, pureza 99.99 %.
- Se pesaron 1.6987 g del reactivo (polvo semifino blanco) y se colocó en un matraz aforado de 100 mL.
- Se completó el volumen con agua ultrapura Millipore (18.2 M Ω).
- Se cubrió el matraz con papel aluminio para evitar cualquier fotoreacción.
- Se colocó un imán en el matraz y éste sobre una placa agitadora. Se agitó a 700 rpm durante una hora a temperatura ambiente.
- Al término, se depositó la solución en un frasco de vidrio recubierto con papel aluminio.

Procedimiento para la preparación de muestras (nanopartículas)

Lote monometálicas

Proporciones:

$$R = 1.0$$

2 mL AuCl_3 0.01 M, 2 mL Rumex, 64 mL agua ultrapura

Donde R es el cociente del volumen de Rumex utilizado entre el volumen de AuCl_4 .

Se colocaron los reactivos en un frasco de vidrio utilizando micropipetas de 1 mL y 5 mL. El orden fue: agua ultrapura—*Rumex*—(HAuCl_4 o AgNO_3). Se tomó la cantidad adecuada de cada reactivo y se depositó en el frasco lentamente y tocando primero la orilla de éste. Ya depositados se colocó un agitador magnético a cada muestra y se puso a agitar en una placa a velocidad media por una hora. Al término, se colocaron en una centrifugadora por una hora a 14,000 rpm. Después del centrifugado se les retiró el sobrenadante y se pesó cada sólido obtenido. Las muestras de sólido pesado se redispersaron en 5 mL de agua ultrapura.

De esta redispersión se tomó 1 mL de cada muestra para las pruebas de UV—Vis y 1 mL para las pruebas de TEM. Por otro lado, se formaron películas dejando secar el precipitado producto de la centrifugación presente en el tubo, tapado con Parafilm. Estas películas se utilizaron para las pruebas de difracción de rayos X.

Lote registrado núcleo@coraza

Proporciones

Nanopartículas Au 1 $\mu\text{g/mL}$ (1 mL), Rumex (variaciones en 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$), AgNO_3 (variaciones en 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$).

Se colocaron los reactivos en un tubo de ensaye de vidrio utilizando micropipetas de 1 mL y 200 μl . El orden fue: nanopartículas Au—Rumex— AgNO_3 . Se tomó la cantidad adecuada de cada reactivo y se depositó en el tubo lentamente y tocando primero la orilla de éste. Se colocaron a agitar en la placa a velocidad media por una hora asegurando la incidencia de luz solar al tubo. Al término se colocaron en tubos eppendorf donde se realizaron los mismos procedimientos de limpieza y separación para pruebas que en el caso de las nanopartículas monometálicas.

Técnicas experimentales

UV—Vis

Para obtener los espectros UV-vis se siguen los siguientes pasos:

- 1) Se define las condiciones en que se realizarán las mediciones: a) la longitud de onda inicial (900 nm) y la longitud de onda final (200 nm); b) se define el slit (0.5); se define la velocidad de barrido para el experimento (240 nm/min). A toda esta información se le conoce como el método del experimento.
- 2) A continuación se efectúa la corrida del “blanco” o solvente para fijar en cero la señal de referencia. Para ello se utilizan dos celdas de cuarzo para UV-vis donde se colocaron 3 mL del solvente empleado para dispersar las nanopartículas. En este caso es agua. La celda de referencia se coloca en la posición más alejada del usuario y la celda de la muestra en la posición más cercana.
- 3) Una vez tomada la señal del blanco o referencia se procede a tomar los espectros de las muestras en cuestión. La celda de referencia ya no se mueve de su lugar y solo la celda

para la muestra es la que se retira para colocar la muestra correspondiente. Antes de colocar la nueva muestra, la celda de cuarzo debe enjuagarse con etanol y agua ultrapura. Al finalizar las mediciones se procede a guardar los espectros generados y exportar los datos en formato ascii para su posterior tratamiento.

Proceso de limpieza de las nanopartículas

En primer lugar, se toma la muestra de nanopartículas previamente preparadas y se redispersa por medio de agitación con imán durante un minuto. De aquí se agarra el volumen necesario para la celda y se realiza un primer UV—Vis. A continuación, se traspasan 25 mL de muestra a un tubo de cultivo cónico de plástico de 50 mL y se centrifuga a 10,000 rpm durante una hora. De aquí se obtienen dos productos: el primer sobrenadante (cuyo solvente fue agua) al que se le realizó la prueba y las nanopartículas sólidas que fueron redispersadas en etanol (sonicación durante 10 minutos en tina, 42 kHz; 100 W, luego vortex, un minuto) para después tomar una muestra para el UV—Vis. Después, dicho redispersado se centrifugó de nuevo a 14,000 rpm durante una hora y al igual que antes se obtuvieron dos productos: el segundo sobrenadante (cuyo solvente fue el etanol usado para redispersar) que también se llevó al UV—Vis y de nuevo las nanopartículas sólidas, las cuales se llevaron a un desecador con bomba de vacío. La película obtenida se llevó para realizarle pruebas de difracción de rayos X.

Apéndice 2: Procedimientos de pruebas biológicas

Azul de tripano

Para analizar el efecto del tratamiento con los nanomateriales y el extracto en la viabilidad celular, se utilizan células HeLa (ATCC). Para esto primeramente las células se crecen en medio RPMI-1640 (Sigma) con 10% de suero a 37 °C al 5 % de CO₂. Una vez que las células alcanzaron confluencia, estas se tripsinizan (Sigma) y se centrifugan a 1500 RPM para después resuspenderse en medio fresco. Posteriormente las células se contabilizan con la finalidad de sembrar 50 000 células por pozo en placas de 48 pozos. Una vez que las células se adhirieron se da el tratamiento con el extracto y nanopartículas a diferentes concentraciones (200, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL para el extracto y 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL para las nanopartículas) mismos que se dejan en incubación por 24 horas. Transcurrido el tiempo las células se tripsinizan y se cuentan utilizando azul de tripano (Sigma) bajo las recomendaciones del fabricante. Se toman 10 µl de suspensión células y 10 µl del colorante, mismos que se mezclan por pipeteo, para después cargar 10 µl de la suspensión resultante en la cámara de Neubauer. Para el conteo se utiliza un microscopio óptico, donde se enfocan los cuadrantes de la cámara para el conteo. Se cuentan células vivas/muertas y el porcentaje de viabilidad se obtuvo utilizando la siguiente ecuación: % viabilidad= (Cel. Vivas/ cel. vivas + cel. muertas). Como control se utilizan células sin tratar, todos los experimentos se realizan por triplicados biológicos.

Tinción para confocal

Para estudiar la internalización y cambio en la estructura de células HeLa por el efecto de las nanopartículas y el extracto, se lleva a cabo tinción celular utilizando anticuerpo anti-actina (Abcam) y DAPI (Sigma). Primero se crecen las células en medio RPMI-1640 (Sigma) con 10% de suero a 37 °C al 5 % de CO₂. Una vez que las células alcanzan confluencia, estas se tripsinizan (Sigma) y se centrifugan a 1500 RPM para después resuspenderse en medio fresco y se dejan pegar en cubreobjetos. Una vez adheridas se llevan a cabo los tratamientos con extracto y nanopartículas, mismos que se dejan interaccionar por 24 h. Pasado el tiempo de interacción las laminillas con las células se lavan con buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4, para después fijarse con paraformaldehído al 4% (Roche) por 30 min a temperatura ambiente. Una vez fijadas

se lleva a cabo la permeabilización, la cual se realiza utilizando Tween 20 (Merck) al 0.5% en PBS por un lapso de 20 min. Para teñir las estructuras de β actina con el anticuerpo, este se prepara en una dilución de 1 μ l de anticuerpo en 99 de PBS 7.4, para posteriormente ponerlo en contacto con las laminillas, las cuales se quedan 12 h interaccionando a 4 $^{\circ}$ C. Consumado el tiempo se llevan a cabo 3 lavados con PBS para eliminar el anticuerpo residual no adherido. Posteriormente, se procede a teñir el núcleo con DAPI. Para esto el colorante se prepara a una concentración de 10 μ g/mL para después ponerlo sobre las laminillas, para luego dejarse durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. El colorante se aspira y lava 3 veces con PBS para finalmente montarlo en portaobjetos con Vectashield (Vectorlabs) y sellarlos con esmalte para uñas. Como controles se utilizan células no tratadas. Las laminillas se observan por microscopia confocal mediante un equipo Axio Observer.Z1 utilizando los filtros de FITC para actina (excitación: 488 /emisión: 525 nm) y DAPI para núcleo (excitación: 358 nm /emisión: 461 nm).

Radicales libres del oxígeno (ROS)

Para estudiar el efecto del extracto y los nanomateriales en la producción de radicales libres del oxígeno se utiliza H₂DCFDA (ThermoFisher). Primero se crecen las células en medio RPMI-1640 (Sigma) con 10% de suero a 37 $^{\circ}$ C al 5 % de CO₂. Una vez que las células alcanzaron confluencia, estas se tripsinizan (Sigma) y se centrifugan a 1500 RPM para después ser resuspendidas en medio fresco y dejarse a pegar en cubreobjetos. Una vez adheridas se llevan a cabo los tratamientos con extracto y nanopartículas, mismos que se dejan interaccionar por 24 h. Pasado el tiempo de interacción las laminillas con las células se lavan con buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4. Se agrega el reactivo a una concentración de 10 μ M en PBS y se deja incubar por 30 min a 37 $^{\circ}$ C en oscuridad, para después lavarlo 3 veces con PBS. Las muestras se sellan en un portaobjetos, donde se mantienen vivas para finalmente observarse por microscopia confocal para rastrear el colorante (excitación: 495 nm/emisión: 527 nm). Como controles se utilizan células no tratadas.