

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

TESIS:

**“Síntesis y caracterización de nanoestructuras de Au con diferentes recubrimientos
para aplicaciones teragnósticas”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

PRESENTA:

M.C. Amalia Inés Del Moral Gómez

DIRECTOR:

Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo

CO-DIRECTOR:

Dra. Tzarara López Luke

MORELIA, MICHOACÁN

MARZO 2023



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

Of. Num. IIMM-ST-008-2023
Morelia, Mich., a 09 de Marzo de 2023

M.C. AMALIA INES DEL MORAL GOMEZ
Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Doctora en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada: "SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOESTRUCTURAS DE Au CON DIFERENTES RECUBRIMIENTOS PARA APLICACIONES TERAGNOSTICAS", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

91002524	DR. GERARDO ANTONIO ROSAS TREJO	(PRESIDENTE)
91000251	DRA. TZARARA LOPEZ LUKE SAAVEDRA MOLINA	(Co-Presidente)
01001531	DR. JOSE LEMUS RUIZ	(Vocal)
97003581	DR. JUAN ZARATE MEDINA	(Vocal)
12000108	DR. MARIO ARMANDO GOMEZ HURTADO	(Vocal)
01000489	DR. JORGE ALEJANDRO VERDUZCO MARTINEZ	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente


Dr. Victor Hugo López Morelos
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

UMSNH



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales
DIRECCION

RESUMEN

En la presente investigación se sintetizaron nanopartículas de oro por medio de la planta *Cuphea aequipetala* a partir del precursor HAuCl_4 , las cuales fueron caracterizadas por medio de Ultravioleta Visible, Espectroscopía de Infrarrojo, Difracción de Rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía Electrónica de Trasmisión, Espectroscopía de fluorescencia, Microscopía confocal y Análisis de Potencial Z. Posterior a la síntesis se recubrieron con rosa de bengala para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas, para estudiar el efecto fototérmico que tienen éstas mismas al ser ligadas a agentes orgánicos. En una segunda fase del proyecto se sintetizaron nanopartículas de oro cubiertas con óxido de zirconio para corroborar el aporte térmico que pudiera tener el cerámico a las partículas metálicas. Como tercera fase del proyecto se sintetizaron nanopartículas de oro por medio de complejos organometálicos a partir de clonix (clonixinato de sodio) como agentes reductores y estabilizadores, evaluando su afinidad a diferentes cubiertas para aplicaciones teragnósticas evaluando la luminiscencia y la generación de calor a partir de radiación del infrarrojo cercano a 808 nm. Se incluye también la evaluación de los nanomateriales sintetizados en las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular eucariota y células de cáncer de cérvix. Las nanopartículas de oro fueron administradas de manera purificada y también con el extracto de la planta, de tal manera que logramos identificar todos los efectos posibles generados por los residuos de la síntesis. Debido a que se utilizó directamente el extracto, fue necesario también realizar pruebas de identificación de metabolitos de la planta y un análisis proximal. Éste trabajo buscará ser una alternativa de tratamiento quimioterapéutico, aprovechando que las nanopartículas de oro tienen afinidad por las células cancerígenas, funcionando, así como agente direccionado. Las propiedades fotocatalíticas del oro permitirán por medio de radiación, la detección del mismo manteniendo el control de su ubicación.

Palabras clave: Nanomateriales de oro, *Cuphea aequipetala*, fototerapia, clonixin, ZrO_2 .

ABSTRACT

In this investigation, gold nanoparticles were synthesized by using the *Cuphea aequipetala* plant extract with HAuCl₄ precursor salt, which were characterized by Ultraviolet Visible Spectroscopy, X-Ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Fluorescence Spectroscopy, Confocal Microscopy, Infrared Spectroscopy and, Z potential analyses. After the synthesis, they were covered with Bengal rose to be used in biomedical applications, to study its photothermal effect when linked to organic agents. In a second phase of the project, gold nanoparticles were synthesized with a shell of zirconium oxide, analyzing the thermal contribution that the ceramic could have on the metallic particles. As a third phase of the project, gold nanoparticles were synthesized by organometallic complexes from clonix (sodium clonixinate) as reducing and stabilizing agents, evaluating their affinity to different coatings for theragnostic applications as luminescence and heat generation from near-infrared radiation at 808 nm. Also, this investigation included the evaluation of nanomaterials synthesized in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria, in *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a eukaryotic cell model and, HeLa cancer cells. The Au nanoparticles will be administered with some residues of plant extract, in that case to identify all the possible effects generated by organic compounds from the synthesis, it was also necessary to carry out identification tests for plant metabolites and a proximal analysis.

This work will seek to be an alternative chemotherapy treatment, taking advantage of the fact that gold nanoparticles have an affinity for cancer cells, working as well as a targeted agent. The photocatalytic properties of gold will allow, through radiation, its detection while maintaining control of its location.

Key words: Gold nanomaterials, *Cuphea aequipetala*, phototherapy, clonixin, ZrO₂.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trabajo de investigación hubo muchas personas e instituciones, las cuales me brindaron el apoyo necesario para cumplir todas las metas y objetivos planteados desde el comienzo del doctorado, por lo cual no me queda más que externar mi más sincero agradecimiento.

Me gustaría empezar con el Dr. Gerardo Antonio Rosas Trejo ya que fue mi asesor de tesis y proyectos desde hace muchos años, dándome siempre las herramientas y oportunidades de crecer, además de su confianza siempre, me siento muy orgullosa de ser una alumna más que egresa bajo su tutoría.

También, le agradezco muchísimo a la Dra. Tzarara López Luke, ya que desde que decidimos trabajar juntas me brindo todo su apoyo en los aspectos personales y escolares, sin duda alguna fue para mí una gran codirectora y me alegra mucho que haya estado asesorándome durante todos estos años.

Por otra parte, le agradezco a cada uno de los investigadores que a lo largo del proyecto de investigación han aportado valiosa información y recursos para permitirme concluir esta tesis de doctorado. Dr. Juan Zarate Medina, Dr. Mario Armando Gomez Hurtado, Dr. José Lemus Ruiz, Dr. Alfredo Saavedra Molina, Dr. Jorge Verduzco Martínez, Dr. Juan Vivero-Escotto, Dra. Valeria Piazza, Dr. Pablo Martínez, Dr. Salomón Espinoza, Dr. Víctor Hugo López Morelos y gracias a todos aquellos que, aunque no los menciono son de gran importancia.

Agradezco también a todos los técnicos académico que siempre están servicio de todos nosotros los alumnos y que sin el esfuerzo de ellos muchos proyectos no se habrían logrado. M.C. Remedios Cisneros Magaña, M.C. Victoria Luke, M.C. Antonio.

Muchas de las horas que pasamos en la escuela o en congresos o viajando, las pase a lado de mis compañeros de doctorado, maestría o licenciatura a todos ellos les agradezco sus consejos y apoyo.

Sin restar importancia agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, a los proyectos aprobados por la CIC-UMSNH (2022-2023) a mis directores de tesis, a CONACYT por la oportunidad de entrar a un posgrado con apoyo económico.

Desde el fondo de mi corazón agradezco a mi familia por siempre estar a mi lado apoyándome en todas las decisiones que he tomado, los amo con todo mi ser y este trabajo y todos mis éxitos se deben a ustedes. A mis padres Yesica y Jorge, hermanos Rebeca y Jorge, mi Abuelita María Inés Cervantes Villalobos, mis tíos y primos.

Agradezco también a la familia de Mario Alejandro porque siempre han estado presentes en mi vida, sé que desde que decidimos formar una familia juntos él y yo, ustedes han estado a mi lado, a Alejandra Nieves y Mario Villalpando (siempre lo recordaré con cariño y respeto) y a sus hermanos Alondra y Fernando.

A mis amigos Iván Calderón y Marisol Bribiesca.

CONTENIDO

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
CAPITULO I	14
INTRODUCCIÓN	14
1.1 Justificación.....	15
1.2 Objetivo general	16
1.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	16
1.3 Hipótesis.....	17
CAPITULO II	18
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Nanociencia y nanotecnología	18
2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras.....	19
2.3 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta <i>Cuphea aequipetala</i>	22
2.4 Óxido de zirconio	23
2.5 Características del Clonixinato de lisina precursor de clonixinato de sodio.	24
2.6 Aplicaciones de los nanomateriales de oro	25
2.7 Cáncer de mama	26
2.7.1 <i>Terapias teragnósticas usando termofotoluminiscencia de nanomateriales.</i>	28
2.8 Bacterias, Levaduras y células HeLa.	30
2.9 Estado actual	32
2.9.1 <i>Síntesis de nanomateriales por vías verdes para aplicaciones de terapia fototérmica.</i> ..	32
2.9.2 <i>Recubrimiento de nanopartículas de oro utilizando Rosa de Bengala.</i>	35
2.9.3 <i>Síntesis de nanomateriales de oro con cubierta cerámica.</i>	37
2.9.4 <i>Síntesis de nanomateriales a partir de complejos organometálicos.</i>	38
CAPITULO III	41
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
3.1 Molienda de la planta <i>Cuphea aequipetala</i>	42
3.1.1 <i>Preparación de la infusión</i>	42
3.2 Análisis bromatológico y fitoquímico de la planta.	42

3.2.1 Análisis Fitoquímico	42
3.2.2 Análisis proximal.....	44
3.3 Síntesis de nanoestructuras de oro	49
3.4 Análisis del Potencial Z de nanopartículas de oro recubiertas de rosa de bengala.	50
3.5 Pruebas antibacteriales de las AuNps.....	51
3.6 Síntesis de nanopartículas de Au@ZrO ₂	51
3.7 Producción de clonixin para generación de complejos de oro.	52
3.8 Concentración de nanomateriales mediante espectroscopía de absorción atómica.....	53
3.9 Caracterización de los nanomateriales.	54
3.10 Pruebas biológicas de AuNps sintetizadas mediante <i>Cuphea aequipetala</i> y recubrimiento de rosa de bengala.	55
3.11 Análisis de Nanomateriales fluorescentes en Microscopio Confocal.	56
3.12 Pruebas de irradiación de las AuNps con láser de 808 nm, 532 nm y 390 nm.	56
3.13 Pruebas biológicas de las AuNps en levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
3.14 Pruebas ópticas de termofotoluminiscencia.	58
CAPITULO IV RESULTADOS	59
4.1 Síntesis de nanopartículas de Au mediante el extracto de la planta <i>Cuphea aequipetala</i>	59
4.1.1 Análisis Bromatológicos	60
4.1.2 Pruebas fitoquímicas del extracto de la planta <i>Cuphea aequipetala</i>	62
4.2 Síntesis de nanopartículas de Au mediante el extracto de la planta <i>Cuphea aequipetala</i>	65
4.2.1 Espectroscopía de Ultravioleta-Visible.....	65
4.2.2 Espectroscopía de Infrarrojo	67
4.2.3 Difracción de Rayos X.....	68
4.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido.....	70
4.2.5 Microscopía Electrónica de Transmisión	73
4.2.6 Análisis del Potencial Z de nanopartículas de Au recubiertas de rosa de bengala.	74
4.2.7 Pruebas antibacteriales con AuNps	76
4.2.8 Análisis de Nanomateriales fluorescentes en Microscopio Confocal	79
4.2.9 Replicación de síntesis y caracterización de AuNps mediante <i>Cuphea aequipetala</i> para aplicaciones termográficas.	86
4.2.10 Caracterización de las AuNps después de las radiaciones.	87
4.2.11 Pruebas biológicas con levaduras mediante radiación a 808 nm.....	95

4.3 Síntesis de nanopartículas de Au@ZrO ₂	98
4.3.1 Espectroscopía de UV-Vis.....	100
4.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido.....	102
4.3.3 Espectroscopía de Infrarrojo	104
4.3.4 Microscopía Electrónica de Barrido Convencional.....	105
4.3.5 Difracción de rayos X	106
4.4 Síntesis del complejo Au-Clonix.....	108
4.4.1 Obtención de clonixin y clonixinato de sodio.	109
4.4.2 Preparación del complejo Au-Clonix.....	110
4.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo	112
4.4.4 Difracción de Rayos X.....	111
4.4.5 EDS mediante Microscopía Electrónica de Barrido.....	114
4.4.6 Síntesis de AuNps a partir del complejo Au-Clonix.	114
4.4.7 Espectroscopía de UV-Vis.....	114
4.4.8 Microscopía Electrónica de Barrido.....	115
4.5 Metas científicas cumplidas	118
BIBLIOGRAFÍA.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 Comparación de tamaños en diferentes sistemas [2]	19
Figura 2. 2 Clasificación de las nanoestructuras de acuerdo a sus dimensiones [4].	20
Figura 2. 3 Enfoques de síntesis de nanoestructuras	21
Figura 2. 4 Proceso de formación de nanopartículas [6].	22
Figura 2. 5 Planta <i>Cuphea aequipetala</i> en su habitat natural.	22
Figura 2. 6 Posibilidades de coordinación orgánico-metálica.....	24
Figura 2. 7 Aplicaciones de las nanopartículas de plata en células.....	26
Figura 2. 8 Principales tejidos constituyentes del pecho materno [19].	27
Figura 2. 9 Micrografías de la variación de pH en las nanoestrellas de oro a) y b) espectro de UV-Vis de los mismos nanomateriales [24].....	33
Figura 2. 10 Micrografía de la nanoestrella de oro a), alta resolución de un nanopico b), difractograma de rayos X c) y patrón de difracción de electrones del oro [24].	34

Figura 2. 11 Fotografías termográficas de los viales con a) PBS como control y b) nanoestrellas de oro a los 5 min de exposición a la radiación [24].	34
Figura 2. 12 Tinción (trypan blue, AO y PI) de células MDA-MB-231 control, láser, AuNps y AuNps-láser [24].	35
Figura 2. 13 Espectro de UV-Vis de AuNps con rosa de bengala hasta 15 ml [25].	36
Figura 2. 14 Micrografías de nanopartículas de oro con recubrimiento de sílice con espesores de, a) 0 nm, b) 20 nm, c) 50 nm y d) 80 nm [26].	37
Figura 2. 15 Espectro de UV-Vis de nanopartículas de ZrO dopado con iterio y erbio [27].	38
Figura 2. 16 Micrografías de electrohilado con a) quitosano y afinin, b) nitrato de plata al complejo quitosano/afinin, c) nitrato de plata al quitosano y d) afinin-Ag-quitosano [28].	39
Figura 3. 1 Metodología general de la fase experimental.	41
Figura 3. 2 Rosa de bengala.	50
Figura 4. 1 Imágenes de resultados positivos ante las pruebas fitoquímicas en el extracto de la planta <i>Cuphea aequipetala</i> , a) prueba Liebermann-Buchard (precipitado rojo), b) prueba con Permanganato de potasio (Decoloración del reactivo añadido), c) prueba de Espuma (formación de espuma permanente), d) prueba Shinoda (formación de precipitado) y e) prueba con Cloruro Férrico (generación de precipitado).	64
Figura 4. 2 Cambio de color en el proceso de síntesis de las AuNps utilizando una relación 1:1 y 6 mL de solución.	65
Figura 4. 3 Espectros de UV-Vis de a) nanopartículas de oro sintetizadas y b) AuNps con diferente volumen de Rosa de bengala en su superficie.	66
Figura 4. 4 Espectro de IR de las AuNps, <i>C. aequipetala</i> , extracto de la planta y residuo de síntesis.	69
Figura 4. 5 Difractograma de RX, a) extracto de <i>C. aequipetala</i> y b) AuNps.	70
Figura 4. 6 Micrografías electrónicas de barrido de las AuNPs, a) mayor amplificación (1 μ m), b-c) menor amplificación (100 nm) y d) análisis químico elemental (EDS).	71
Figura 4. 7 Micrografías de AuNPs con Rosa de bengala a) 1 ml, b) 5 ml, c) 8 ml y d) 15 ml.	72
Figura 4. 8 Micrografías electrónicas de transmisión de las AuNps a-b y d) campo claro, c) patrón de difracción de electrones, e) alta resolución y f) transformada rápida de Fourier.	74
Figura 4. 9 Gráfica de estabilidad de materiales en coloide dependientes del pH [9].	76
Figura 4. 10 Resultados de la prueba antibacterial en a) <i>E. coli</i> y b) <i>S. aureus</i> .	78

Figura 4. 11 Evaluación mediante método de difusión de disco en bacterias <i>E. coli</i> para a) extracto de <i>Cuphea aequipetala</i> , b) HAuCl_4 y c) AuNpsC.	78
Figura 4. 12 Resultados de la evaluación de a) extracto, b) HAuCl_4 y c) AuNpsC en <i>S. aureus</i>	79
Figura 4. 13 Campo claro de observación directa a) y campo oscuro donde se obtendrían señales de fluorescencia b) del extracto de <i>Cuphea aequipetala</i>	80
Figura 4. 14 Células de cáncer de cervix teñidas en los núcleos apartado a), campo claro de observación celular apartado b) y campo oscuro sin señales fluorescentes apartado c).	81
Figura 4. 15 Campo claro de la orilla de la gota de muestra de AuNps (apartado a) y emisiones del oro nanométrico en campo oscuro en el apartado b).	82
Figura 4. 16 Campo claro de la orilla de la gota de muestra de nanopartículas de oro en el apartado a), en el apartado b) se distingue en el campo oscuro la efectiva emisión de la fluorescencia de las AuNps y en el apartado c) se aprecian anillos de la radiación térmica de las AuNps.	82
Figura 4. 17 Mezcla de AuNps en el medio con las células de cáncer de cervix (HeLa) apartado a), campo claro de observación celular apartado b), emisión de fluorescencia de las AuNps en campo oscuro apartado c) y suma de emisiones de fluorescencia de núcleos celulares y AuNps apartado d).	83
Figura 4. 18 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con rosa de bengala y d) suma de fluorescencia de imágenes.	84
Figura 4. 19 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con AuNps y d) suma de fluorescencia de imágenes.	85
Figura 4. 20 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con mezcla de AuNps y rosa de bengala y d) suma de fluorescencia de imágenes.	86
Figura 4. 21 Espectro de UV-Vis de las AuNps sintetizadas mediante extracto de <i>C. aequipetala</i>	87
Figura 4. 22 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las AuNps sintetizadas con extracto de <i>Cuphea aequipetala</i> , a) 10 000X, b) 40 000X, c) 100 000 y d) análisis químico (EDS) de la muestra.	88
Figura 4. 23 Diseño experimental del arreglo para las irradiaciones de las muestras.	88
Figura 4. 24 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf vacío.	89
Figura 4. 25 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf con agua desionizada.	89
Figura 4. 26 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf con extracto de <i>Cuphea aequipetala</i>	90

Figura 4. 27 Análisis de temperatura de las AuNps con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.....	91
Figura 4. 28 Análisis de temperatura de las AuNps con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 5 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.....	91
Figura 4. 29 Análisis de la temperatura de las AuNps usando un láser de 808 nm con un tiempo de permanencia de 10 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.....	92
Figura 4. 30 Las AuNps analizadas con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 15 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps....	93
Figura 4. 31 Las AuNps analizadas a 532 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura y b) imagen de MEB de las AuNps.	94
Figura 4. 32 Análisis de AuNps a 390 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura y b) imagen de MEB de las AuNps.....	94
Figura 4. 33 Modelo de la cámara de Neubauer para conteo celular.	95
Figura 4. 34 Levaduras en la cámara de conteo y a su lado derecho el tubo con medio de crecimiento y levaduras.....	96
Figura 4. 35 Levaduras en la cámara de conteo y a su lado derecho el tubo con medio de crecimiento de levaduras mezcladas con AuNps.	96
Figura 4. 36 Imagen de a) Grafica de comportamiento del incremento de temperatura a 3 min con láser de 808 nm y b) Levaduras en la cámara de conteo.	97
Figura 4. 37 Grafica de comportamiento del incremento de temperatura a 15 min con láser de 808 nm a) y Levaduras en la cámara de conteo b).	98
Figura 4. 38 Micrografías de las AuNpsC sintetizadas mediante extracto de <i>C. aequipetala</i>	100
Figura 4. 39 Espectro de UV-Vis de las AuNps con solución precursora de Zr.	101
Figura 4. 40 Espectro de UV-Vis de la mezcla de extracto de <i>Cuphea aequipetala</i> con solución precursora de Zr.	101
Figura 4. 41 Micrografías de la muestra de nanopartículas de oro con propóxido de zirconio (IV) y etanol absoluto: agua desionizada.	103
Figura 4. 42 Análisis químico elemental de la muestra de AuNpsC con solución precursora de Zr.	103

Figura 4. 43 Micrografías del mapeo químico de la muestra de AuNps con solución precursora de oro analizando Au, Zr y O.....	104
Figura 4. 44 Espectro de infrarrojo de AuNps@ZrO ₂	105
Figura 4. 45 Micrografías electrónicas de barrido convencional de AuNps@ZrO ₂ a diferentes magnificaciones a)10000X, b) 40000X y c)100000X.....	106
Figura 4. 46 Difractograma de las AuNps@ZrO ₂ sin tratamiento térmico.	107
Figura 4. 47 Difractograma de las AuNps@ZrO ₂ con tratamiento térmico a 800°C.	108
Figura 4. 48 Polvo de clonixin aislado de clonixinato de lisina y su estructura química.....	109
Figura 4. 49 Polvo de clonixinato de sodio y su estructura química.....	110
Figura 4. 50 Polvo del complejo sintetizado Au-Clonix y su propuesta de estructura química.....	110
Figura 4. 51 Espectros de IR de clonixinato de sodio a) y complejo Au-Clonix b).....	112
Figura 4. 52 Difractograma de rayos X de Clonixinato de sodio a) y complejo Au-Clonix b).....	112
Figura 4. 53 EDS del complejo Au-Clonix.	114
Figura 4. 54 Espectro de nanopartículas de oro sintetizadas mediante el complejo Au-Clonix.	115
Figura 4. 55 Micrografías de nanopartículas sintetizadas mediante complejo Au-Clonix, a) 40 000X, b) 300 000X, c) 500 000X y d) EDS de la muestra.....	116
Figura 4. 56 Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de Au mediante química de coordinación.	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4. 1 Análisis bromatológico de Cuphea aequipetala	62
Tabla 4. 2 Resultados cualitativos de las pruebas de identificación de diversos metabolitos.....	64
Tabla 4. 3 Resultados del análisis del potencial Z para muestras de nanopartículas de oro.	75
Tabla 4. 4 Solubilidad del complejo Au-Clonix mediante diversos solventes.....	111

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, la nanobiomedicina ha experimentado un crecimiento expansivo en el desarrollo de nanomateriales diseñados para mejorar el diagnóstico, monitoreo y tratamiento de diversas enfermedades incluídas cáncer, Alzheimer, Parkinson, entre otras. Tomando en cuenta que deban ser materiales altamente reproducibles controlando morfología, tamaño, carga superficial, composición, biocompatibilidad, especificidad en tejidos diana tiempo de circulación sanguínea y su potencial desecho del cuerpo humano, impulsando interesantemente sus propiedades dentro del área clínica [1]. Uno de los metales de mayor interés es el oro ya que presenta una significativa relevancia dentro de las aplicaciones biológicas, pero si bien, se espera que estos nanomateriales sintetizados representen una mejora a los tratamientos abrasivos que existen hoy en día, también se busca que sean amigables con el medio ambiente, esto quiere decir, que los residuos de la síntesis puedan ser desechados o degradados de manera segura para evitar la contaminación de la fauna y flora de nuestro planeta [2]. Por lo cual, los métodos de síntesis mediante extractos de plantas o complejos metálicos significan una solución para disminuir el uso de agentes contaminantes provenientes de la síntesis química convencional, los cuales generan en muchos casos ecotoxicidad que a largo plazo repercuten en problemas ambientales que actualmente enfrentamos [3]. Por otra parte, se espera que los complejos de oro sintetizados mediante extractos de plantas anticancerígenas, fármacos y compuestos termofotoluminiscientes, ayuden en la detección y destrucción de células cancerígenas antes de que puedan llegar a un estado metastásico, donde la expansión del cáncer a otros órganos pueda ser irreversible.

Ahora bien, el oro es un metal que presenta resistencia a la corrosión y oxidación, lo cual favorece sus aplicaciones médicas, además a nivel nanométrico, tiene propiedades ópticas únicas debido al fenómeno de resonancia del plasmón de superficie, lo cual indica que tendrá una dispersión o absorción de la luz en respuesta a la oscilación colectiva de los electrones libres cuando la partícula se expone luz en la longitud de onda de resonancia característica de dicho metal, que a su vez mediante agentes de superficie específicos, permiten modificar

los rangos de detección hacia el infrarrojo cercano, en donde la radiación poca o nualmente se absorbe por el cuerpo humano, lo cual reduce los daños abrasivos por terapias de radiación convencional y permite aplicar técnicas de bioimagen y agentes fototérmicos [4].

Por lo tanto, la idea central de esta investigación fue sintetizar nanoestructuras de Au, empleando la planta anticáncer *Cuphea aequipetala* como agente reductor de la sal precursora y estabilizante de los nanosólidos obtenidos, los cuales posteriormente fueron recubiertos de rosa de bengala como agente luminiscente, también las nanoestructuras de oro se sintetizaron a partir de complejos organometálicos de oro a manera de preservar sustancias en su superficie que actúen como anti- y ligantes (clonixin). Por otra parte, se agregó una capa cerámica de óxido de zirconio, demostrando que los cerámicos como agentes de recubrimiento resultan ser químicamente inertes, biocompatibles, fácilmente ligados a grupos funcionales, con gran área superficial y poros bioactivos. Proponiendo de esa manera 3 diferentes alternativas de nanomateriales para aplicaciones teragnósticas para su futura detección en células cancerígenas. Además, se determinaron tamaños, formas, cantidad, dispersión, termofotoluminiscencia y estructura cristalina por distintas técnicas de caracterización como son Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR), Microscopía Raman, Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), termografías, Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Transmisión (MET). Finalmente, se analizaron los compuestos orgánicos involucrados en la síntesis de los nanomateriales mediante análisis bromatológico, fitoquímico. Además, se evaluó la toxicidad de los nanomateriales recubiertos mediante ensayos de crecimiento y viabilidad celular, en cajas Petri mediante método de disco.

1.1 Justificación

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño tan singular que les confiere diferentes propiedades comparadas al material en granel, dando así nuevas posibles aplicaciones, pero que pasa si dichos nanomateriales presentan residuos de síntesis dañinos para la salud y el medio ambiente, tales como el citrato trisódico, tartrato de sodio y borohidruro sódico, en el caso de este último, produce ecotoxicidad aguda en la zona de vertido, ya que reacciona con el agua y es difícil de recuperar o limpiar, además es altamente flamable, y provoca quemaduras graves en la piel e irritación severa de los ojos y también

puede producir intoxicación por ingesta. Entonces la producción de nanomateriales se vuelve un problema, la gran solución que se ha encontrado a este tipo de daños es la generación de nanopartículas mediante síntesis verde basada en el uso de plantas o derivados de productos naturales como agentes reductores y estabilizantes.

Ahora bien, se conoce actualmente que la detección y tratamiento de tumores cancerígenos puede llevarse a cabo mediante nanomateriales, pero algunas veces las respuestas de la termofotoluminiscencia son bajas, lo cual limita sus aplicaciones, una herramienta que actualmente ha resultado útil para potenciarles dicho efecto es recubrir los nanomateriales con sustancias ya sea orgánicas, poliméricas o cerámicas con el fin de aumentar la generación de calor y luminiscencia para detectarlas en los sitios activos y hacerlas mayormente efectivas.

Por estas razones el presente trabajo está dirigido a la creación de materiales con aplicaciones teragnósticas, aprovechando sus ventajas térmicas y luminiscentes, para posteriormente en trabajos futuros ser aplicadas en células de cáncer de mama in vitro, mejorando así las actuales técnicas de detección y tratamiento contra dicha enfermedad.

1.2 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanoestructuras de Au utilizando métodos verdes mediante el extracto de la planta anticáncer *Cuphea aequipetala*, evaluando su afinidad a diferentes cubiertas como rosa de Bengala, óxido de zirconio y clonixinato de sodio, como agentes reductores y estabilizadores para aplicaciones teragnósticas,

1.2.1 Objetivos específicos

- Realizar estudios estructurales de la planta *Cuphea aequipetala* por medio de espectroscopía de infrarrojo, análisis bromatológicos y fitoquímicos.
- Sintetizar a través de métodos verdes nanoestructuras de Au a partir del extracto de la planta *Cuphea aequipetala*, variando agitación, concentración de la sal precursora, concentración del extracto, agentes nucleantes.
- Recubrir las AuNPs con rosa de bengala en la superficie.
- Sintetizar AuNPs con la capa de óxido de zirconio.
- Aislar el compuesto clonixin de productos farmacéuticos comerciales.

- Generar el complejo de coordinación organometálicos.
- Determinar la concentración química elemental de los nanomateriales sintetizados a partir de espectroscopía de absorción atómica.
- Caracterizar estructuralmente los nanomateriales de oro mediante las técnicas: espectroscopía ultravioleta visible, espectroscopía FT-IR y análisis del potencial Z.
- Describir morfológica y estructuralmente los nanomateriales mediante difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y transmisión.
- Evaluar la termofotoluminiscencia de las nanoestructuras de oro con las diferentes cubiertas a diferentes tiempos y rangos de radiación mediante cámaras termográficas.
- Determinar la toxicidad de los nanomateriales-recubiertos en bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3 Hipótesis

A partir de las sustancias presentes en el extracto de la planta *Cuphea aequipetala* en conjunto de variaciones estratégicas de síntesis será posible obtener nanomateriales de oro que se recubrirán con rosa de bengala para potenciar su luminiscencia, aprovechando a su vez que si hubiese residuos de la planta éstos mismos poseen características anticancerígenas, los cuales actuarán conjuntamente para la destrucción celular, por otra parte, sintetizar favorablemente nanomateriales de oro a partir de complejos de clonixinato de sodio como agente de reducción, estabilización y anti-inflamatorio para mejorar su potencial anticancerígeno y finalmente producir nanomateriales de oro a cubiertos con óxido de zirconio como agente de amplificación de la termoluminiscencia. Siendo así 3 posibles nanomateriales de oro evaluables en futuros tratamientos contra células de cáncer de mama in vitro.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el siguiente capítulo se presentará información precisa sobre antecedentes y teoría acerca de la síntesis de nanomateriales de oro y la conjugación de compuestos organometálicos precursores de nanomateriales, los cuales han tenido éxito en diversas aplicaciones, principalmente en el área de la biomedicina. Además de las propuestas más significativas de lo que se realizó en el desarrollo del presente trabajo de investigación, apoyados en la literatura actual.

2.1 Nanociencia y nanotecnología

La nanotecnología representa ser hoy en día, un camino revolucionario para el desarrollo tecnológico refiriéndose a la gestión del material a escala nanométrica que representaría ser la milmillonésima parte de un metro (Figura 2.1). La nanotecnología abarca literalmente la fabricación y aplicación de sistemas químicos, físicos y biológicos a escalas que van desde moléculas o átomos individuales hasta dimensiones submicrónicas, y también la integración de estos nanomateriales resultantes en sistemas más grandes. El descubrimiento y uso de nanomateriales ha permitido la introducción de muchas áreas nuevas de tecnología en nanomedicina, biosensores, bioelectrónica, catálisis, conversión de energía solar y tratamiento de agua [5].

A medida que disminuyen las escalas de longitud de los materiales, los efectos de área de superficie se vuelven extremadamente importantes y aparecen efectos cuánticos que conducen a cambios profundos en las propiedades de los materiales y dispositivos. Un efecto del pequeño tamaño de los materiales es el creciente porcentaje de átomos que están situados en la superficie de los objetos [6].

En los últimos años, la nanotecnología ha emergido como un campo multidisciplinario, en el que se debe adquirir una comprensión fundamental de las propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas y mecánicas de las nanoestructuras prometiendo entregar en la próxima generación de materiales, funciones con una amplia gama de aplicaciones, debido al área superficial. Un resultado importante de la gran área de superficie por unidad de masa es la

reactividad de los materiales con tamaño nanométrico. Si, por ejemplo, la superficie de las nanopartículas no está protegida por la pasivación de la superficie, las interacciones entre las partículas se producirán fácilmente. Por lo tanto, en nanotecnología, los conceptos comunes de la química pierden su validez [6].

Es un error pensar que la nanotecnología es un invento humano reciente, de hecho, existen muchos organismos que, a lo largo de millones de años, mediante procesos tan comunes como la fotosíntesis logra manipular la materia en la escala atómica, ya sea para separar cargas eléctricas, transportar protones y convertir la energía solar en energía químicamente útil con la finalidad de construir subestructuras especializadas, como almacenar información, reproducirse o moverse [7].

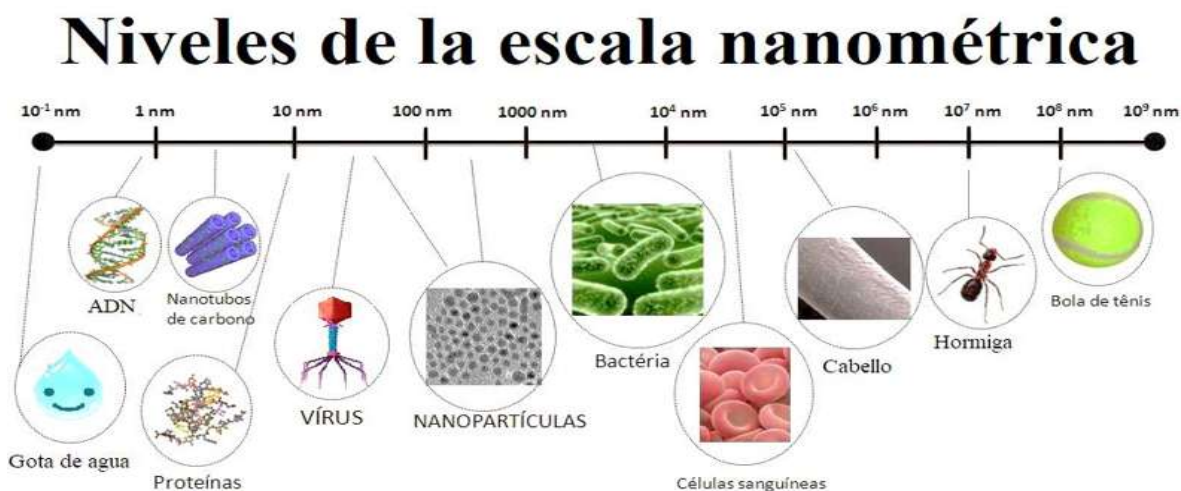


Figura 2. 1 Comparación de tamaños en diferentes sistemas [6] .

2.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras

Muchas de las propiedades de los materiales dependen de cómo se comporten los electrones, ya sea en movimiento u ordenados, limitándose por las dimensiones del propio material. Además, la proporción de átomos en el área superficial con respecto al interior es mayor en materiales nanométricos que en materiales de tamaño más elevado. Por consiguiente, si se reducen las dimensiones de un material, se modifican sus propiedades y en consecuencia se pueden diseñar materiales con propiedades específicas.

De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico [8], los nanomateriales pueden clasificarse en cuatro diferentes tipos (Figura 2.2):

1. Materiales 0D: Las tres dimensiones del material se ubican en el régimen nanométrico, estos nanomateriales incluyen pequeños agregados atómicos (clúster) compuestos por una pequeña cantidad de átomos, a esta categoría corresponden las nanopartículas.
2. Materiales 1D: Tienen una longitud variable, conservan dos de sus dimensiones en el régimen de nanómetros, como es el caso de los nanoalambres y nanotubos.
3. Materiales 2D: Presentan áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como el caso de las películas delgadas.
4. Materiales 3D: En este régimen, los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas.

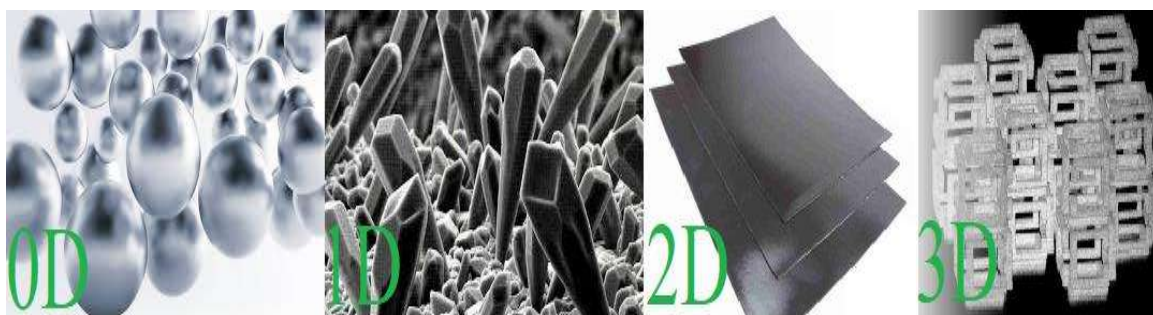


Figura 2. 2 Clasificación de las nanoestructuras de acuerdo a sus dimensiones [4].

Ahora bien, el procedimiento y las condiciones de síntesis influyen directamente en la forma y tamaño de los nanomateriales, por lo que existen diversos tipos de elaboración que utilizan métodos químicos, físicos y biológicos, los cuales pueden ser establecidos por medio de diferentes criterios dependiendo si son arriba-abajo o abajo-arriba (Top- down y bottom-up, por sus siglas en inglés) [9]. En los primeros se reestructura un material a granel para obtener individuos más pequeños, parcialmente separados, procesados o depositados, ya sea por medio de molienda, métodos químicos y la volatilización de un sólido seguido de la condensación del mismo, con el fin de formar los nanomateriales. En segundo caso, los nanomateriales se ensamblan a partir de bloques de construcción básicos como moléculas o

nanoclusters con propiedades adecuadas que ayudan a crecer, a partir de precursores elementales formando un montaje de mayor tamaño (Figura 2.3)

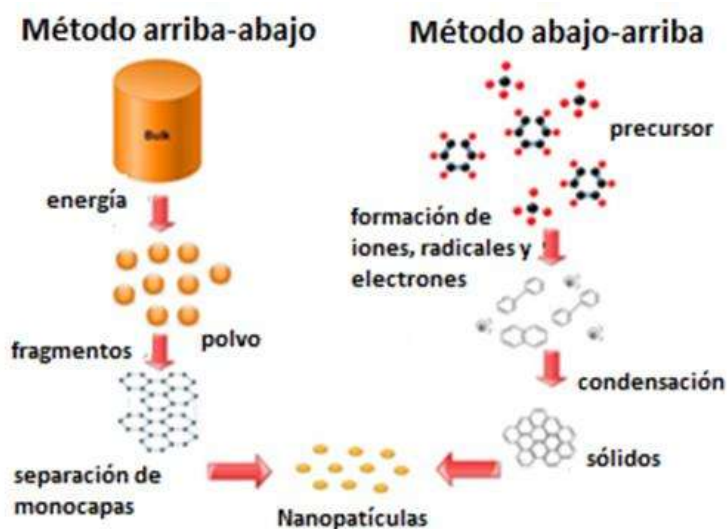


Figura 2. 3 Enfoques de síntesis de nanoestructuras [10].

Para el caso de la presente investigación se utilizó el método de abajo-arriba con el cual se pretende que los iones, se reduzcan y se formen agregados, de tal manera que se formen nanopartículas estables, mediante el método de síntesis verde [11], basado principalmente en la síntesis química convencional a partir de una sal precursora del metal a utilizar, que en nuestro caso de estudio es ácido tetracloro áurico (HAuCl_4), y los agentes estabilizadores y reductores son los componentes de la planta *Cuphea aequipetala* los cuales se encuentran presentes en el extracto de la misma (Figura 2.4), en clonixinato de sodio, respectivamente. Algunos de los factores que comúnmente afectan la síntesis de nanopartículas son la temperatura, agitación, pH, concentraciones de la solución de la sal precursora, concentración del extracto de la planta, agitación mecánica o ultrasónica y uso de microondas, los cuales nos afectan directamente en el tamaño, forma y estructura de los nanomateriales. Los mecanismos de síntesis biológica por medio de plantas son aún desconocidos, debido a que es difícil predecir cuál de los componentes de la planta o conjuntos de ellos mismos son los encargados de estabilizar y reducir la sal precursora para obtener las nanopartículas, pero mediante métodos de análisis estructural orgánico, es posible tener un buen acercamiento

sobre aquellas sustancias que podrían ser las encargadas del proceso de formación de nanopartículas.

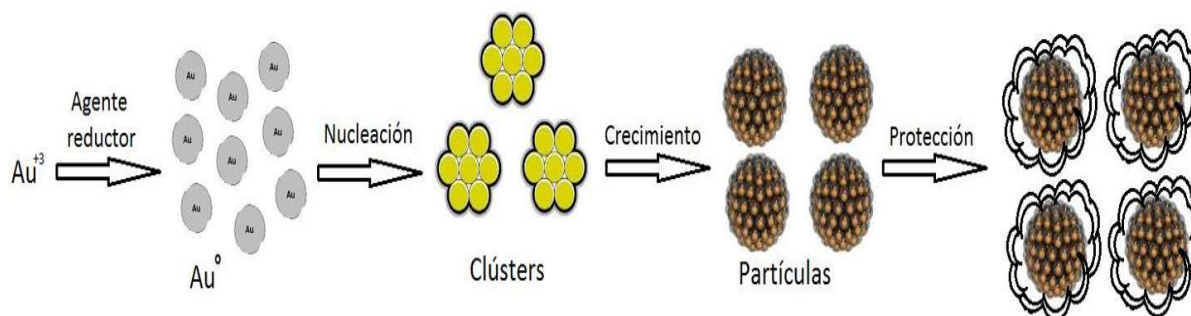


Figura 2. 4 Proceso de formación de nanopartículas [6].

2.3 Características y constituyentes fitoquímicos de la planta *Cuphea aequipetala*.

Esta planta es la *Cuphea* más común de México, crece preferentemente a la orilla de los prados y caminos, sobre todo en lugares semi húmedos. De manera popular se le conoce como hierba del cáncer y se encuentra en los estados de Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz [12]. Ésta misma es una hierba grande, a veces algo leñosa hacia la base, en otras ocasiones se presenta con pelos rígidos y erectos combinados con otros largos y muy entrecruzados, el fruto es una cápsula, la cual tiene semillas aproximadamente 8 a 14, frecuentemente 5, casi globosas, de aproximadamente 2 mm de largo (Figura 2.5).



Figura 2. 5 Planta *Cuphea aequipetala* en su hábitat natural [13].

Prefiere crecer en zonas climáticas con pastizales, selva baja subperennifolia, bosques de pino y encino, es perenne, aunque en zonas del bajío prolifera de mayo a noviembre. Se

utiliza como antiinflamatorio, para curar golpes, infecciones, disentería, diarrea, paperas y calentura; se dice que también cura el cáncer [14].

2.4 Oxido de zirconio

Los materiales cerámicos poseen características interesantes, que permiten su aplicación en diferentes áreas, debido a su morfología porosa, su posible biocompatibilidad y su elevada dureza, aspectos que surgen como consecuencia de su composición química y su estructura cristalina. El ZrO_2 puede presentarse en tres fases cristalinas, las cuales dependen de la temperatura de obtención. La fase monoclinica es estable termodinámicamente, desde temperatura ambiente hasta 1170 °C. Esta fase se utiliza para producir recubrimientos abrasivos, pigmentos inorgánicos y componentes eléctricos. La fase cristalina tetragonal obtenida de 1170 °C hasta 2370 °C, se la fabricación de piezas dentales y prótesis de cadera, debido a su elevada dureza y resistencia al desgaste. La fase cúbica se considera estable hasta su punto de fusión (2650 °C). Esta fase posee una excelente conductividad iónica, por tal motivo el material en esta fase, se puede utilizar como sensor de oxígeno y adsorbente de gases en cámaras de vacío [15].

En general, los materiales con base en ZrO_2 tienen excelentes propiedades mecánicas y son químicamente inertes. Además, son resistentes al calor, tienen un alto índice de refracción y son adecuados para diversas aplicaciones ópticas. Por ejemplo, las micropartículas a base de zirconia se han utilizado para la fabricación de vidrios fotónicos y para el diseño de nuevos absorbentes/emisores NIR para mejorar la eficiencia en sistemas TPV.

El ZrO_2 se puede sintetizar mediante el método hidrotérmico, sin embargo, este método es de alto costo, además de ser tóxico y requerir bastante consumo de energía. Una alternativa es utilizar la técnica sol-gel modificado, la cual, es considerada un método sencillo, económico, que requiere baja temperatura de procesamiento y permite lograr una pureza homogénea, minimizando la contaminación del aire [16]. El ultrasonido y las microondas son dos técnicas importantes en la síntesis de compuestos químicos, por la energía que aportan a los procesos; la primera se basa en el fenómeno de la cavitación, y la segunda se fundamenta en que la radiación emitida incide sobre los átomos o moléculas de los

materiales. En el presente trabajo se utilizó un método modificado de sol-gel para producir la cubierta cerámica de ZrO_2 en las AuNPs.

2.5 Características del Clonixinato de lisina precursor de clonixinato de sodio.

El clonixinato de lisina es un medicamento que actúa impidiendo la formación de prostaglandinas en el organismo, ya que inhibe a la enzima ciclooxigenasa [17]. Las prostaglandinas se producen en respuesta a una lesión o a ciertas enfermedades y provocan inflamación y dolor. Está indicado como analgésico, reduce la fiebre y actúa como antiinflamatorio en pacientes que cursan con dolor agudo o crónico. Se utiliza también para tratamiento de afecciones de tejidos blandos, cefalea, otalgias, sinusitis y herpes zoster. Intervenciones ginecológicas, ortopédicas, urológicas y de cirugía general. Este fármaco, al liberarse de la lisina se enlazará al sodio permitiendo de esta manera la formación de un compuesto que permite la coordinación mediante los grupos carboxilato con iones de Au para la formación de nanopartículas que en su superficie contengan el fármaco, dándole una doble funcionalidad a los nanomateriales. Los grupos carboxilato son importantes por su versatilidad en el campo de la química inorgánica [18], debido a los modos de coordinación que pueden adoptar (Figura 2.6), esperando de esta manera que el oro proveniente de la solución precursora pueda enlazarse de alguna de estas coordinaciones [19], para que posteriormente se logre la reducción del metal a cero valente y se formen las nanoestructuras de oro con residuos de clonixinato de sodio, que futuramente actúen como agentes antiinflamatorios en los pacientes con cáncer de mama, ya que uno de los síntomas que acompañan la metástasis celular son las inflamaciones.

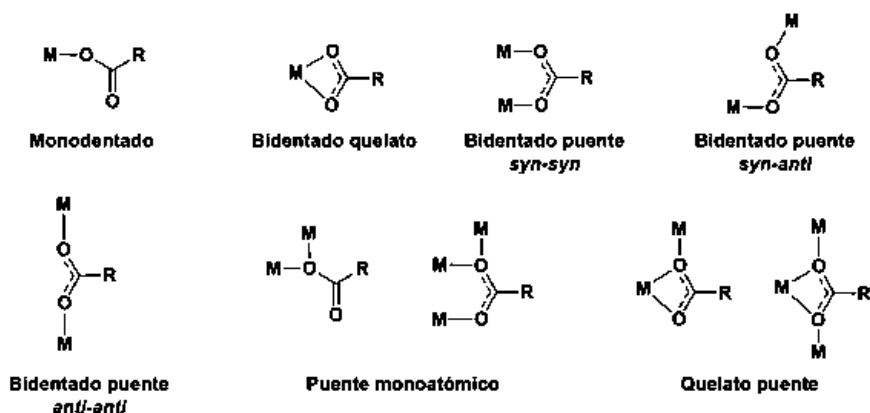


Figura 2. 6 Posibilidades de coordinación orgánico-metálica [19].

2.6 Aplicaciones de los nanomateriales de oro

Las Nps de metales nobles y específicamente, las de oro (AuNPs), exhiben propiedades físicas (punto de fusión bajo y mayor área superficial específica), químicas (mayor número de átomos en la superficie y elevada reactividad) y biológicas (no destruyen las células comparado con las de AgNps), intrínsecas a su tamaño nanométrico, además, las AuNPs pueden ser producidas en distintos tamaños y formas, lo que implica que puedan ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, cerámicos, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.), esto genera gran interés en utilizarlas en múltiples campos [20]. La aplicación de oro en la medicina no es una técnica del todo nueva, el descubrimiento por Robert Koch del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis, marca el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920 [21]. Hoy en día, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas (Figura 2.7). En presencia de luz láser las AuNPs se activan y desprenden calor, siendo muy útiles en el tratamiento selectivo de células tumorales para detección precoz, diagnóstico y tratamiento contra el cáncer [22]. Además de su extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, las AuNPs pueden utilizarse en la elaboración de partículas nanoestructuradas para el transporte y la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas, así como en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA, etc.) [23]. También destaca el empleo de las AuNPs en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes que permiten controlar, en el espacio y en el tiempo, la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya sea por activación de un estímulo biológico interno o externo [24]. Ahora bien, no solo son de gran importancia en el campo de la medicina sino también en la producción de alimentos, donde se emplean las AuNPs como parte integrante de nanocompuestos poliméricos. Éstos se utilizan en la fabricación de envases con propiedades antimicrobianas o para incrementar la resistencia a la abrasión de los envases [25]. Asimismo, ya se han elaborado indicadores de tiempo-temperatura a partir de AuNPs [26]. La empresa Timestrip UK Ltd. ha desarrollado un dispositivo a partir de oro coloidal, que permite establecer si los alimentos procesados y congelados, han sido mantenidos a temperatura adecuada a lo largo de la cadena de producción y distribución. El funcionamiento de este dispositivo adherido al envase, se basa en un fenómeno simple, ya

que a temperaturas inferiores a la de congelación, se produce una aglomeración irreversible de las AuNPs dando lugar a una solución transparente. Por otra parte, cuando la temperatura sobrepasa el valor establecido, las AuNPs coloidales se dispersan en la suspensión, dando como resultado un color rojo intenso. Pero que nuevos desarrollos se tienen dentro del área biomédica, se ha demostrado que eficazmente mediante nanomateriales de oro se puede erradicar por lo menos un 80% de células cancerígena [27] ampliando así las expectativas de vida de los pacientes con dicha enfermedad, generando así daños abrasivos menores a los empleados en la medicina convencional con base en tratamientos de termofotoluminiscencia los cuales les llaman métodos teragnósticos [28].

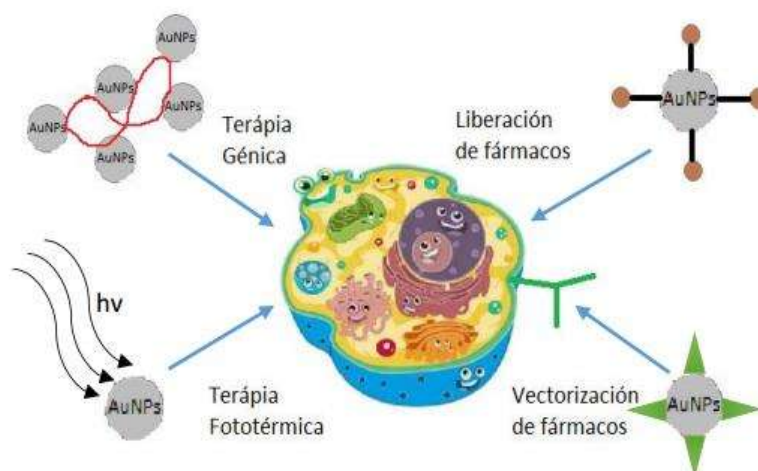


Figura 2. 7 Aplicaciones de las nanopartículas de Oro en células [29].

2.7 Cáncer de mama

El pecho o mama se compone de tres principales tipos de tejidos, glandulares, estromales y además tejido linfático. Los primeros tejidos albergan las glándulas productoras de leche (lóbulos) y los conductos (los pasajes de la leche) mientras los segundos incluyen tejidos grasos y fibroso-conectivos de la mama, por último, el tejido linfático el cual contiene el sistema inmunitario que elimina los líquidos y los desechos celulares (Figura 2.8).

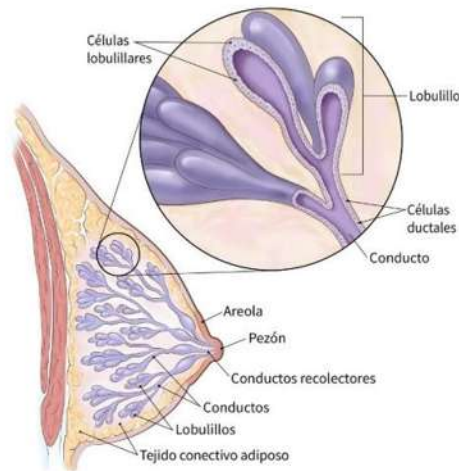


Figura 2. 8 Principales tejidos constituyentes del pecho materno [30].

Hoy en día, el cáncer de mama es el cáncer mortal potencialmente más diagnosticado y la principal causa de decesos en mujeres. Éste tipo de cáncer es originado en las células del tejido mamario, la mayoría comúnmente desde el revestimiento interno de los conductos lácticos o los lóbulos, éste cáncer presenta un ADN Y ARN muy similar a las células de las cuales éste se originó, lo que hace que el sistema inmune no las detecte [30].

Las células cancerígenas se forman a partir células normales debido a una modificación (mutación de ADN y/o ARN). Éstas pueden ocurrir espontáneamente o pueden ser inducidos por otros factores tales como: radiación nuclear, radiación electromagnética (microondas, Rayos X, Rayos Gamma, Rayos Ultravioletas, etc.), virus, bacterias, hongos, parásitos (debido a la inflamación de los tejidos o irritación), productos químicos en el aire, agua y comida, lesión mecánica a nivel celular, radicales libres, evolución y envejecimiento de ADN y ARN, dieta pobre (entorno celular no saludable), personas con predisposiciones genéticas y personas de avanzada edad (más de 80), por lo cual los métodos de detección y tratamiento son muy variados.

Las técnicas de tratamiento dependen de la etapa en la cual se encuentre desarrollado el cáncer, pueden variar desde una extracción del tumor (lumpectomía) hasta la extirpación del seno (mastectomía) o pueden llevarse a cabo cirugías de ganglios linfáticos centinela que contienen al cáncer, para así permitirle a las mujeres conservar el seno. Otros tipos de tratamiento son la radioterapia que implica el uso de rayos X de alta energía o rayos gamma que apuntan a un tumor o sitio de tumor post cirugía, la quimioterapia que es el uso de

medicamentos anticáncer para tratar células cancerosas, siendo esas las más comunes aunque actualmente se encuentra en desarrollo el uso de terapia génica, inactivación oncogénica, inducción de suicidio celular, aumento de genes supresores tumorales, quimioprotección, expresión de citoquinas ectópicas, oncólisis mediada por virus, mejoramiento del sistema inmune y medicina nanotecnológica [30].

2.7.1 Terapias teragnósticas usando termofotoluminiscencia de nanomateriales.

Los nanomateriales termosensibles destacan por su capacidad para apuntar a sitios preseleccionados en respuesta a un cambio en la temperatura. Esto los hace candidatos fuertes para lograr intervenciones terapéuticas mínimamente invasivas [31].

Estos mismos, son materiales muy prometedores para los sistemas de administración de fármacos, dispositivos analíticos y de diagnóstico y terapia térmica. Los vehículos de nanoentrega poseen claras ventajas sobre los métodos convencionales de administración de fármacos [32]. Como primer ejemplo, debido a su pequeño tamaño, los nanomateriales son capaces de sortear las barreras biológicas, como las membranas celulares y la barrera hematoencefálica, lo que permite que se administren mayores concentraciones de agentes terapéuticos. En segundo lugar, los nanotransportadores pueden funcionalizarse con agentes de direccionamiento activos para permitir el suministro selectivo, minimizar los efectos secundarios y limitar el desperdicio de medicamentos. En tercera posición pero no de menor importancia, tenemos que cuando los nanomateriales alcanzan la máxima acumulación en los sitios requeridos, ellos mismos pueden ser desencadenantes para la eliminación no invasiva de células dañadas [33]. La temperatura es un ejemplo típico de "desencadenantes" no invasivos en el sitio enfermo, lo cual representa que se podrían tener agentes localizados para destrucción celular, ya que en esos sitios las células del tejido tumoral son más hipóxico, ácidas y deficientes en nutrientes, en comparación con los tejidos normales, haciéndolas un blanco perfecto para las pruebas terapéuticas basadas en generación de calor [34].

La síntesis de nanopartículas de oro ha sido ampliamente explorada debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones, sin embargo, en la actualidad se busca que dichos materiales sean multifuncionales principalmente con actividad biológica, a partir de ligantes y/o surfactantes

con propósitos bien establecidos como luminiscencia, liberación de fármacos, enlace a células tangentes mediante proteínas, etc [35, 36].

El área de investigación que involucra la interacción láser-material ha crecido con el descubrimiento del láser por Maiman en 1960. El conocimiento sobre el mismo es esencial para analizar los procesos en varios campos como aplicaciones de defensa, médicas, industriales y energéticas [37].

La irradiación con láser es un proceso fototérmico mediante el cual el objetivo absorbe la energía del láser y se calienta. Cuando la intensidad del láser es lo suficientemente alta, calienta el objetivo y podrían dar como resultado la formación y el crecimiento de burbujas dentro del líquido, lo cual podría generar en el material la liberación de electrones, iones, átomos neutros y/o fragmentos. Los electrones libres absorben la parte restante del pulso láser incidente a través de bremsstrahlung inverso y dan como resultado un estado de ionización más alto, formando especies calientes de iones y electrones [38, 39]. Por lo cual, en este capítulo se irradiaron las nanopartículas de Au con diferentes longitudes de onda de láser para poder demostrar el efecto térmico generado por la radiación o el cambio de tamaño en las AuNps.

Para esta investigación se utilizaron 3 tipos distintos de laser en diferentes longitudes de onda siendo 808 nm, 532 nm y 390 nm; sabiendo que la primer longitud tiene alta penetración en la piel por lo cual puede ser utilizada perfectamente para el análisis de nanomateriales en el cuerpo humano mediante la generación de calor en las AuNps; las otras dos longitudes por su dimensión de onda corta no permiten mucho tiempo de exposición en la piel ya que podrían generar daño celular, por lo cual solamente se utilizaron para analizar el cambio de tamaño de las AuNps.

Existen algunos trabajos ya reportados en la literatura como lo es el realizado por Zhang et al [40], ellos en ese caso sintetizan nanopartículas de Au a partir de un método hidrotermal, utilizando PVP, etilenglicol, citrato de sodio y HAuCl_4 , con mezclas de etanol agua en agitación. Sus AuNps funcionaron como decoración de nanopartículas de manganeso en forma de flor de aproximadamente 1 micra con espesor de 8 nm, las AuNps mostraron tamaños cercanos a 36 nm. Mediante su análisis térmico en sus nanopartículas mostraron

diferenciales de temperatura de 20 °C, indican que su temperatura inicial fue la ambiental (25 °C), lo cual indica que su máximo de temperatura alcanzado fue aproximadamente 45 °C en un tiempo máximo de exposición de 45 minutos. Este trabajo previo y algunos otros fueron utilizados como modelos para el análisis de las AuNps mediante laser en 808 nm.

Por otra parte, Simon et al.[41] Sintetizaron nanopartículas de Au mediante PVP y HAuCl₄, con la radiación a 532 nm para analizar el cambio de tamaño de las mismas a diferentes tiempos de exposición como lo fueron 0, 5, 15 y 30 minutos. Con lo cual obtuvieron incremento del tamaño y forma de las nanopartículas de Au desde 10 nm (forma esférica) hasta generar tamaños cercanos a 100 nm (forma cuasiesférica). Concluyen que el tiempo de exposición al laser genera la agregación de las nanopartículas pequeñas coalesciendo hasta tamaños superiores. Debido a este efecto se propuso analizar las nanopartículas de Au que se sintetizaron previamente con el láser a 532 nm y se decidió utilizar el láser en 390 nm para determinar si existe un efecto similar a lo ya reportado.

2.8 Bacterias, Levaduras y células HeLa.

Cualquier organismo modelo representan un recurso invaluable para la investigación fundamental y aplicada, permitiendo la predicción, modelado e identificación de mecanismos de acción en el campo de la nanotecnología biomédica, los nanomateriales, la nanocatálisis y evaluación de la toxicidad. Los organismos modelo son aptos para iteraciones rápidas del ciclo de diseño-construcción-prueba-aprendizaje, para la investigación biotecnológica industrial debido a su amplia caracterización y bajo costo de reproducción.

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa coliforme con forma de bastón que se encuentra comúnmente en la parte inferior del intestino de los organismos de sangre caliente [42]. La mayoría de las cepas son inofensivas, pero algunos serotipos pueden causar intoxicación alimentaria. La inofensiva *E. coli* beneficia a los huéspedes al prevenir la colonización de bacterias patógenas en el intestino. Crece masivamente en condiciones aeróbicas durante tres días y, luego de este período, su tasa de crecimiento disminuye. Las células sobreviven fuera del cuerpo por un tiempo limitado. Son excelentes indicadores para las pruebas ambientales de contaminación fecal. Es fácil de cultivar en el laboratorio y ha sido muy estudiado como organismo huésped para trabajos de ADN recombinante. Es el

organismo microbiano más popular; debido a su alta disponibilidad facilitado una excelente caracterización bioquímica y fisiológica. *E. coli* podría considerarse una piedra angular en el avance de estudios enfocados en biorremediación, medicina y enfoques catalíticos; se sabe que se utiliza como modelo para evaluaciones antibacterianas y contaminación del agua.

Staphylococcus aureus es adaptable [43], coloniza en alrededor del 30 % de los humanos [44], pero también tiene la capacidad de ser un patógeno oportunista grave, a menudo a través de lesiones o intervención médica [45]. Al ingresar a un huésped, *S. aureus* puede infectar un amplio repertorio de sitios alrededor del cuerpo, causando infección de piel y tejidos blandos [46]. Además, las infecciones son inherentemente dinámicas a medida que avanza puede potencialmente lograr la mortalidad del huésped. Tal versatilidad se manifiesta por la adaptación fisiológica a un entorno cambiante. Por lo cual, es de suma importancia conocer los mecanismos de eliminación de esta bacteria, incluyendo métodos de acción mediante el uso de nanopartículas.

Saccharomyces cerevisiae se estableció como la levadura más utilizada para la producción de cervezas, así como un modelo principal para la genética y la biología celular, es un eucariota unicelular pequeño, por lo tanto, contiene un núcleo y otros orgánulos unidos a la membrana [47]. Las células de levadura son relativamente fáciles de cultivar en el laboratorio mediante condiciones simples ya que no necesitan un medio complejo para su crecimiento. Además, las células se dividen rápidamente, cada 90 min, en condiciones óptimas de laboratorio a través del proceso de brotación, donde una célula hija más pequeña y genéticamente idéntica brota de la célula madre durante la mitosis [48]. Las características de la levadura como el ciclo de vida corto, la facilidad de manipulación, el genoma bien anotado, hacen de esta levadura un organismo modelo excelente para estudiar los procesos celulares homologados a las células de los humanos, por lo cual ayuda a predecir comportamientos de los nanomateriales previos a su uso en células humanas que resultan ser muy costosas.

Las células HeLa son cancerosas y tienen como muchos tumores, genomas llenos de errores, con una o más copias de muchos cromosomas: una célula normal contiene 46 cromosomas, mientras que las células HeLa contienen de 76 a 80 cromosomas en total, algunos de los cuales están mutados, lo que hace que se acumulen errores en el genoma a medida que se

producen divisiones celulares descontroladas [49]. Crecen inusualmente rápido, incluso considerando su estado canceroso, duplicando el número de células en solo 24 horas, lo que las hace ideales para pruebas a gran escala. Las células HeLa parecieran ser son inmortales, lo que significa que se dividirán una y otra vez. Este desempeño puede explicarse por la expresión de una telomerasa hiperactiva que reconstruye los telómeros después de cada división, previniendo el envejecimiento celular y la senescencia celular, y permitiendo divisiones perpetuas de las células. Debido a lo anterior, se considera un modelo celular importante ya que, si se logra su eliminación, representara un logro significativo para la ciencia y la humanidad, de ahí el motivo de utilizar en el presente estudio líneas celulares de HeLa.

2.9 Estado actual

En la actualidad ha aumentado el interés por el uso de nanomateriales de oro como tratamiento en diversos tipos de cáncer para disminuir los efectos que conlleva la quimioterapia tradicional, por lo cual se han desarrollado diversas investigaciones conjugando fármacos a las nanopartículas, funcionalizándolas por medio de agentes de dirección específica a células cancerígenas reduciendo así la toxicidad y actualmente generando nanomateriales con propiedades fototérmicas.

2.9.1 Síntesis de nanomateriales por vías verdes para aplicaciones de terapia fototérmica.

Como ya se ha hablado anteriormente, los nanomateriales de oro presentan muchas aplicaciones potenciales en la medicina actual, la cual aprovecha la generación de termofotoluminiscencia con el fin de localizar y destruir células con cáncer, como lo es en el caso de Phan y Col. [50], en cuya investigación utilizan quitosano como agente estabilizante y vitamina C como agente reductor, de la solución precursora HAuCl_4 (0.01M), haciendo modificaciones de pH pero manteniendo la síntesis por el método verde, para así formar nanoestrellas de oro estables con un tamaño promedio de 225 ± 52.9 nm (Figura 2.9a), con respuestas en el espectro de UV-Vis entre 500 y 900 nm como se puede apreciar en la Figura 2.9b.

Por otra parte, en este mismo estudio demuestran mediante la Figura 2.10a-b un mayor acercamiento de los nanomateriales donde se aprecia notablemente el núcleo y las puntas de

los mimos, además mediante DRX (Figura 2.10c) se demuestra la naturaleza cristalina de las nanoestrellas obteniendo repuestas en 38.1° , 44.3° , 64.5° y 77.7° correspondientes a los planos (111), (200), (220) y (311) de la estructura cúbica centrada en las caras del oro, corroboradas mediante el patrón de difracción de electrones obtenido en MET(Figura 2.10d).

Con lo que, sin duda alguna, se comprueba que efectivamente sus nanoestrellas son de oro, por lo que se prosigue a realizar las pruebas fototérmicas mediante cámara termográfica con una incidencia de radiación en el infrarrojo cercano (808 nm , 1.5 W/cm^2) por 5 minutos, utilizando PBS como control (Figura 2.11), con lo cual llegan hasta 48.5°C .

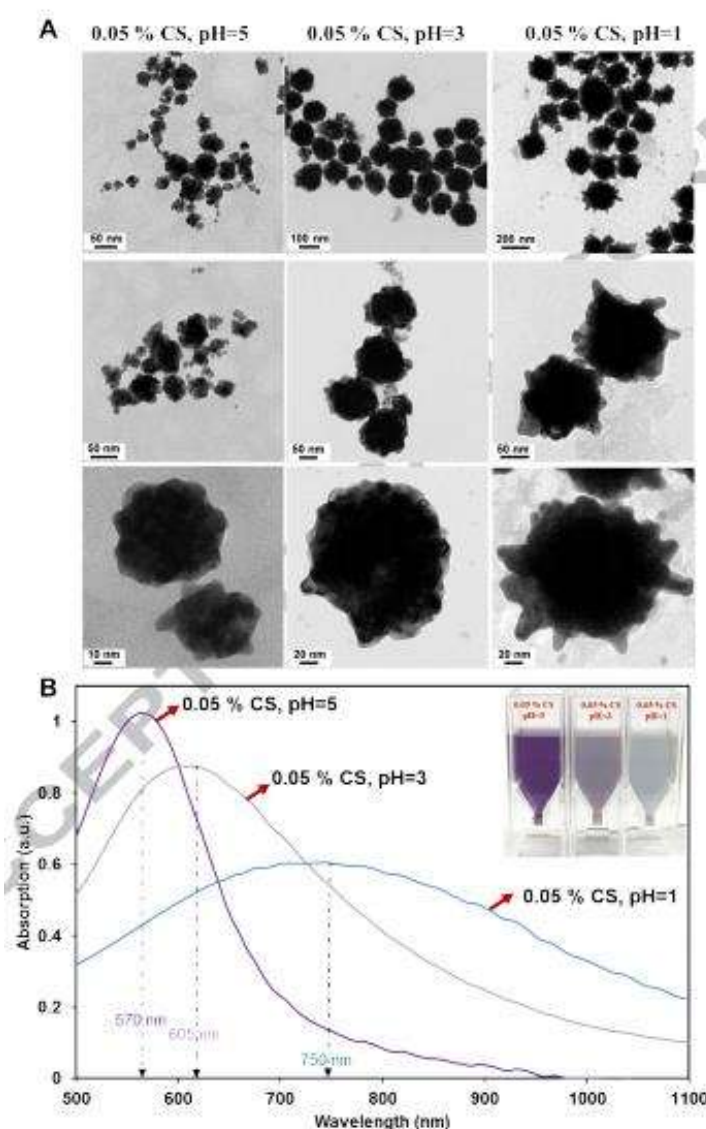


Figura 2. 9 Micrografías de la variación de pH en las nanoestrellas de oro a) y b) espectro de UV-Vis de los mismos nanomateriales [50].

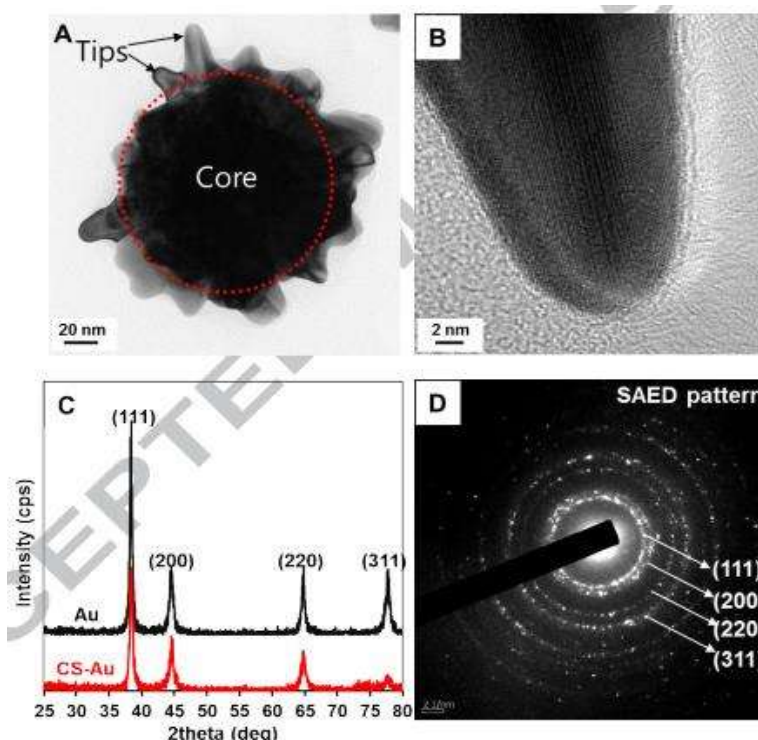


Figura 2. 10 Micrografía de la nanoestrella de oro a), alta resolución de un nanopico b), difractograma de rayos X c) y patrón de difracción de electrones del oro [50].

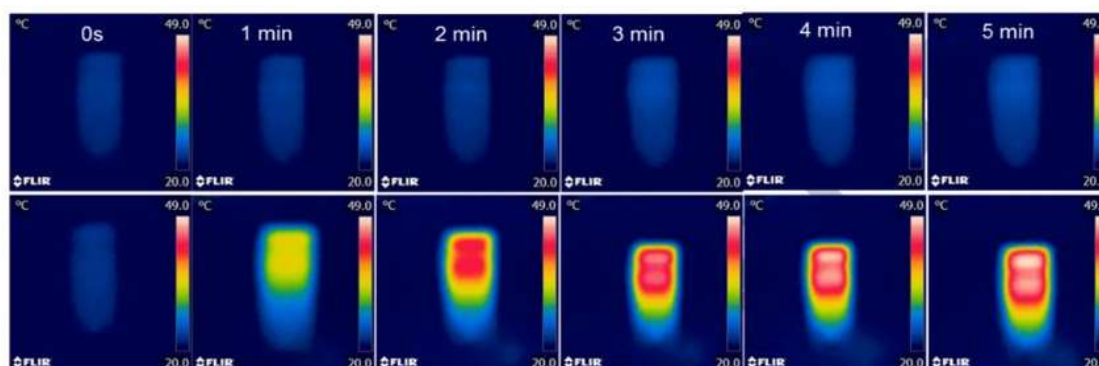


Figura 2. 11 Fotografías termográficas de los viales con a) PBS como control y b) nanoestrellas de oro a los 5 min de exposición a la radiación [50].

Finalmente, concluyendo con las pruebas biológicas, generan tinciones de las células MDA-MB-231 con colorante Trypan Blue (azul tripano), AO (naranja de acridina) y PI (ioduro de propidio), probando el control sin ninguna modificación, el láser incidiendo solamente en las células, colocando solo nanoestrellas y como última prueba las nanoestrellas con el láser a 808 nm por 5 minutos, con lo que demuestran la generación de luminiscencia y calor, con lo

que proponen una eficaz fotoabsorción del infrarrojo cercano para destruir las células tumorales *in vitro* (Figura 2.12). Mediante el trabajo desarrollado por Phan y Col., se demuestra que es posible llevar a cabo las investigaciones del presente trabajo doctoral proponiendo utilizar metodologías similares a excepción de que se utilizarán nanopartículas de oro sintetizadas por métodos verdes para todas las pruebas.

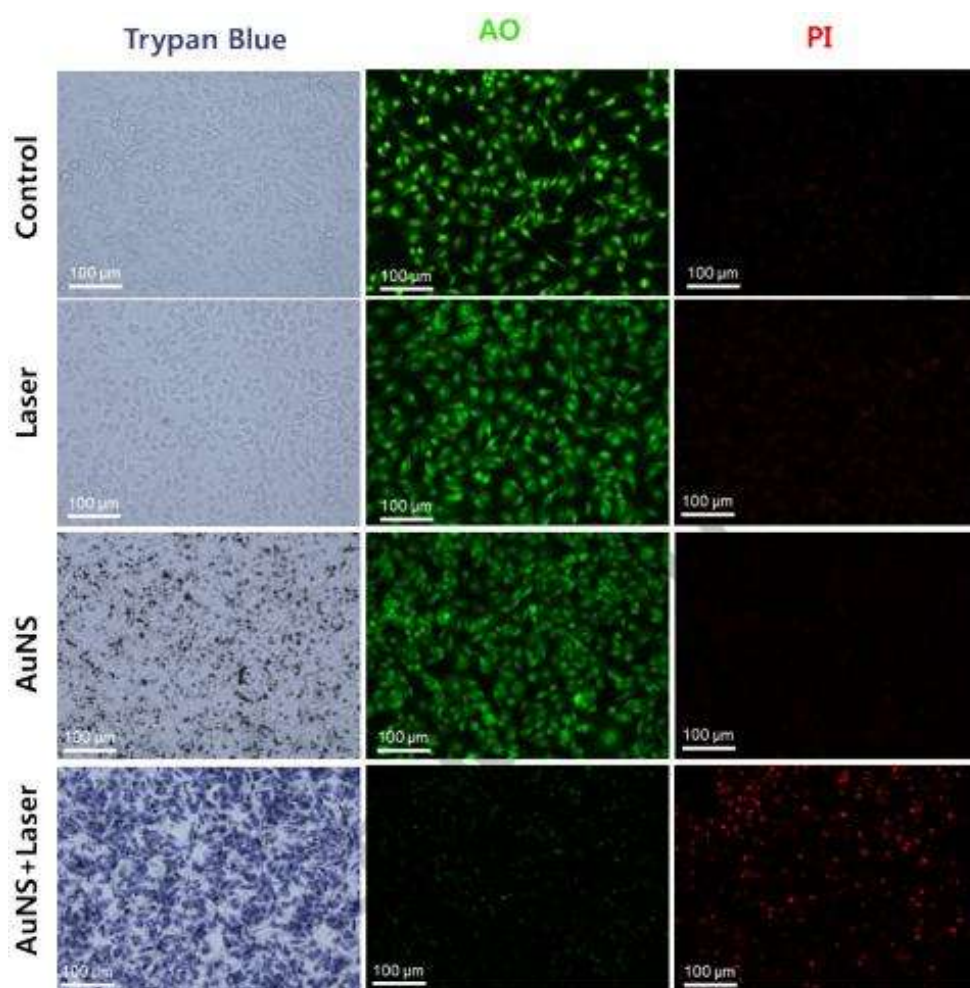


Figura 2. 12 Tinción (trypan blue, AO y PI) de células MDA-MB-231 control, láser, AuNps y AuNps-láser [50].

2.9.2 Recubrimiento de nanopartículas de oro utilizando Rosa de Bengala.

Si bien ya se ha comentado que los nanomateriales de oro tienen una amplia gama de aplicaciones es importante desarrollar nuevas investigaciones mediante uso de métodos verdes como síntesis de materiales a modo de reducir los contaminantes del medio ambiente

con propiedades de luminiscencia para ser detectadas en líneas celulares y conocer así sus efectos en las mismas. Ahora bien, una investigación enfocada a la síntesis de nanopartículas de oro es la realizada por Kitching y Col.[51], donde utilizan el método de síntesis convencional con HAuCl_4 como solución precursora a 5 mM y citrato de sodio a 20 mM,

una vez formadas las nanopartículas adicionaron rosa de bengala a 20 μM , mililitro por mililitro hasta llegar a 15 ml, en una solución inicial de 1 ml de nanopartículas dispersadas en 15 ml de agua desionizada, con lo que generan recubrimientos hasta obtener un comportamiento equilibrado del pico de plasmón de superficie del rosa de bengala y de las nanopartículas (Figura 2.13). Ellos demuestran que, si se excede de 6 ml la dosis de rosa de bengala, se llega a un desequilibrio donde predomina el pico de plasmón del rosa de bengala y se disminuye el de las nanopartículas de oro y viceversa en dosis inferiores a 3 ml, por lo que mediante síntesis química convencional la mejor dosis obtenida fue 5 ml. Se espera de esta manera mediante síntesis verde lograr mejores enlaces del rosa de bengala en la superficie a modo que se potencie la luminiscencia de las nanopartículas de oro, ellos no realizan pruebas biológicas ni estudios de caracterización, lo cual en esta investigación si se realizará.

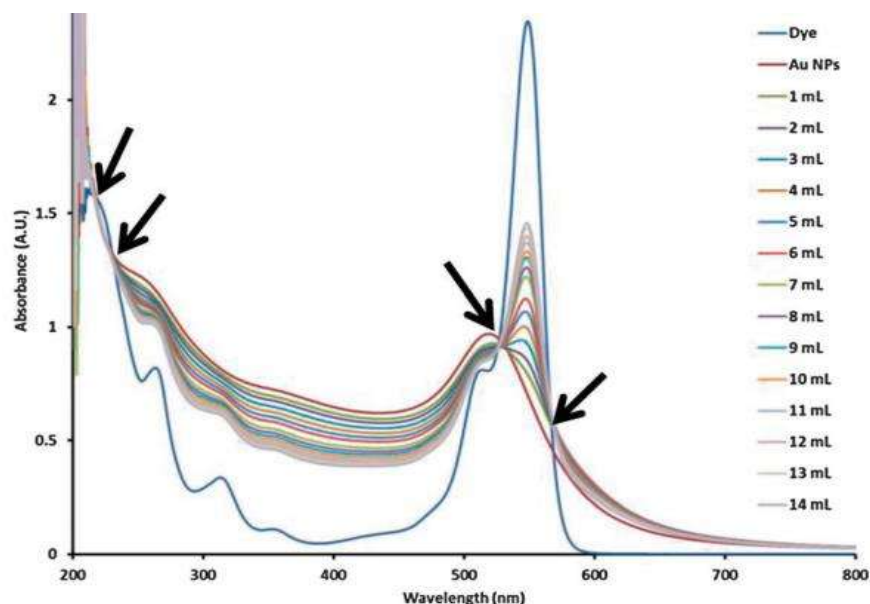


Figura 2. 13 Espectro de UV-Vis de AuNps con rosa de bengala hasta 15 ml [51].

2.9.3 Síntesis de nanomateriales de oro con cubierta cerámica.

Por otra parte, una de las propuestas del presente trabajo de investigación es generar una cubierta de ZrO_2 , por lo cual es importante analizar la literatura respecto a nanopartículas cubierta con cerámicos, como lo hicieron Lee y Col [52], donde producen semillas de oro mediante síntesis química convencional, utilizando HAuCl_4 y citrato de sodio y recubriendo las nanopartículas sintetizadas mediante el método sol-gel. Este procedimiento incluyó hidrólisis por tetraetoxisilano (TEOS, 98%), condensamiento de sílice en la superficie del oro, seguida de la nucleación del mismo. Ellos utilizaron una solución de amoníaco para catalizar la hidrólisis de TEOS. Se añadió solución de semilla de oro (4 ml) a 20 ml de etanol (95%), con agitación constante, y luego agregaron 0,6 ml de solución de amoníaco y varias cantidades de TEOS a la mezcla de iones reactivos. La reacción se llevó a cabo durante 24 horas a temperatura ambiente con agitación continua. Las variaciones de concentración de los reactivos les permitieron tener distintos espesores de sílice recubriendo las nanopartículas de oro, lo cual se aprecia en la Figura 2.14, donde demuestran espesores de 0, 20, 50 y 80 nm, proponiendo que su mejor resultado fue a 20 nm con lo que es necesaria poca cantidad de reactivos para obtener las cubiertas de sílice.

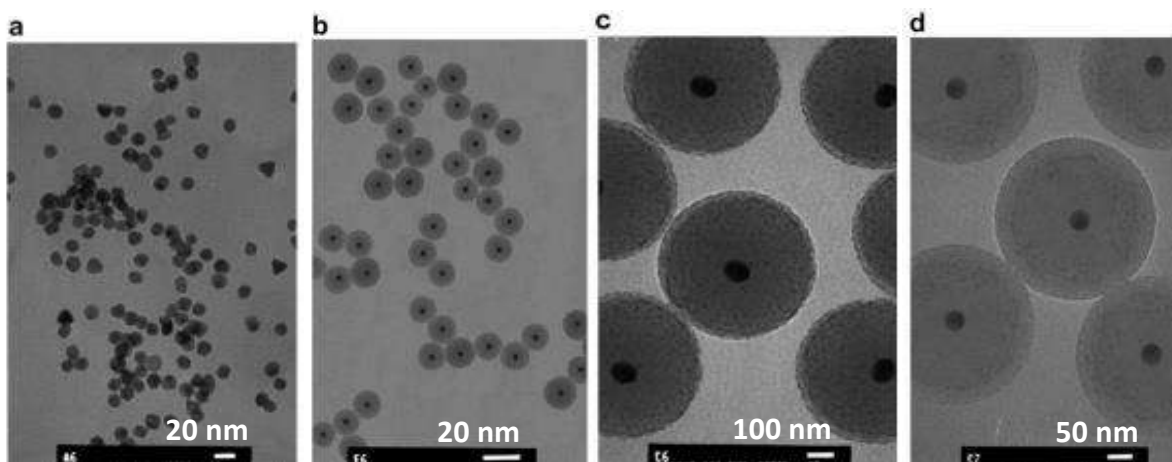


Figura 2. 14 Micrografías de nanopartículas de oro con recubrimiento de sílice con diferentes espesores, a) 0 nm, b) 20 nm, c) 50 nm y d) 80 nm [52].

Pero en el caso de la presente investigación, no se seguirá de manera estricta dicho método si no que se harán modificaciones en conjunto con el estudio realizado por Ceja-Fdez y Col. [53], cuya metodología se propondrá en el apartado experimental 3.5, proponiendo cubiertas de ZrO_2 , para aplicaciones de fotoluminiscencia en con infrarrojo cercano sin causar daño celular (a excepción de ellos, en este caso no se conjugaran con biotina ni se aplicarán en células HeLa), esperando bandas de emisión roja con picos a 653 y 657 nm (Figura 2.15), con una combinación de la excitación de oro entre 500 y 600 nm.

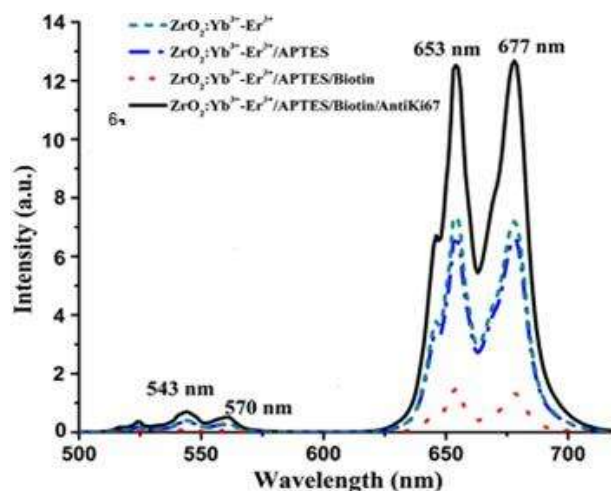


Figura 2. 15 Espectro de UV-Vis de nanopartículas de ZrO_2 dopado con iterio y erbio [53].

2.9.4 Síntesis de nanomateriales a partir de complejos organometálicos.

Finalmente, una de las aportaciones que se espera lograr mediante ésta investigación es generar complejos de oro a manera de que sean los precursores del oro que será reducido mediante síntesis verde por medio del extracto de la planta *Cuphea aequipetala*, sin embargo hay poca literatura enfocada a éste tipo de método, no obstante, existe el trabajo previo realizado por Bedolla-Cázares [54], con el cual apoyados de sus metodologías se generarán modificaciones de las mismas para obtener los productos deseados en la presente investigación, ellos en ese caso sintetizan nanopartículas de plata a partir de quitosano, nitrato de plata cristalino sólido (AgNO_3 , 99%), ahora bien, mediante las raíces de *H. longipes*, (comúnmente conocida como Chilcuague o "Raíz de Oro"), realizaron una maceración con hexano (250 ml) durante 3 días y posteriormente las filtraron para finalmente producir un aceite amarillento (afinin), el cual mezclaron con AgNO_3 y acetonitrilo en reflujo por 24 h, para seguidamente realizar lavados y separar el sólido amorfo café, el cual caracterizaron

demostrando el enlace de la plata con el afinin, y cuyo proceso posterior fue mezclar dicho sólido con quitosano expuestos a luz solar por 2 h, hasta obtener la síntesis de nanopartículas de plata, como paso final ellos realizaron un electrohilado hasta obtener nanofibras detectando de esa manera, que en el caso del apartado a de la Figura 2.16a, mediante quitosano y afinin, solamente se favorece el hilado aunque se aprecian grandes agregados orgánicos, para la Figura 2.16c, se distingue que la adición de nitrato de plata al quitosano, (proceso posterior a la reducción), genera mayor cantidad de hilos pero las partículas de plata se encuentran separadas de los mismos y nuclean en diversos tamaños aun con grandes formas aglomeradas de orgánico, en los apartados b y d de la Figura 2.16 en donde se agregó para el primer caso nitrato de plata al complejo quitosano/afinin se formaron nanopartículas mejor distribuidas que en el proceso anterior pero aun así nucleaban de manera independiente con diversidad de tamaños aunque, localizadamente se distinguen mejor dichos nanomateriales como puntos brillantes entre los hilos de la fase orgánica. Por último, en el caso del apartado d, donde se utilizó un complejo de afinin-Ag-quitosano, la síntesis y generación de nanopartículas se vio favorecida creciendo en la superficie de los hilos de la fase orgánica garantizando de esa manera que los nanomateriales van a contener restos de compuestos orgánicos en la superficie y que se promueve el crecimiento en diámetros menores a 100 nm.

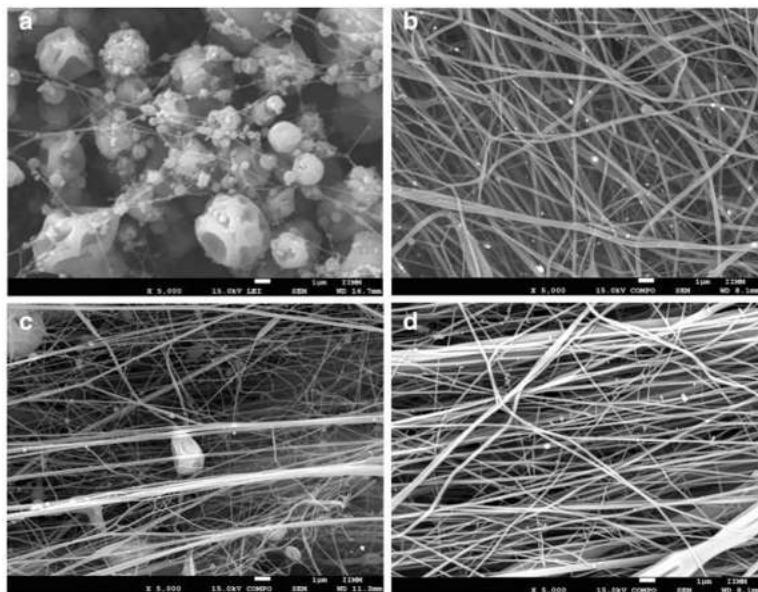


Figura 2. 16 Micrografías de electrohilado con a) quitosano y afinin, b) nitrato de plata al complejo quitosano/afinin, c) nitrato de plata al quitosano y d) afinin-Ag-quitosano [54].

Como se ha visto a lo largo de este capítulo se demuestra que es posible realizar todas las propuestas objetivas de la presente investigación, apoyados de la literatura antes descrita, tomando como base la síntesis verde por medio de plantas.

Caracterizando estructuralmente los nanomateriales de oro mediante las técnicas: Espectroscopía Ultravioleta Visible, Espectroscopía FT-IR, Análisis del Potencial Z, Difracción de Rayos X, Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión.

Evaluando la termofotoluminiscencia de las nanoestructuras de oro con las diferentes cubiertas a diferentes tiempos y rangos de radiación mediante una cámara termográfica y determinando la toxicidad de los nanomateriales-recubiertos en bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la propuesta experimental de investigación. A continuación, la Figura 3.1 incluye de manera general las principales etapas del proceso que consisten inicialmente en la adquisición planta *Cuphea aequipetala* en un mercado local de la ciudad de Morelia, México, así como obtención de los compuestos clonixin derivado del clonixinato de lisina, para posteriormente proceder a la preparación de la sal precursora y los agentes de recubrimiento. Posteriormente, se realizarán los análisis fitoquímicos y bromatológicos de la planta. Subsecuentemente, se realizará la síntesis con las diferentes estrategias planteadas y se caracterizará por las diferentes técnicas estructurales y morfológicas. Finalmente, se evaluarán los nanomateriales sintetizados en varios modelos celulares.

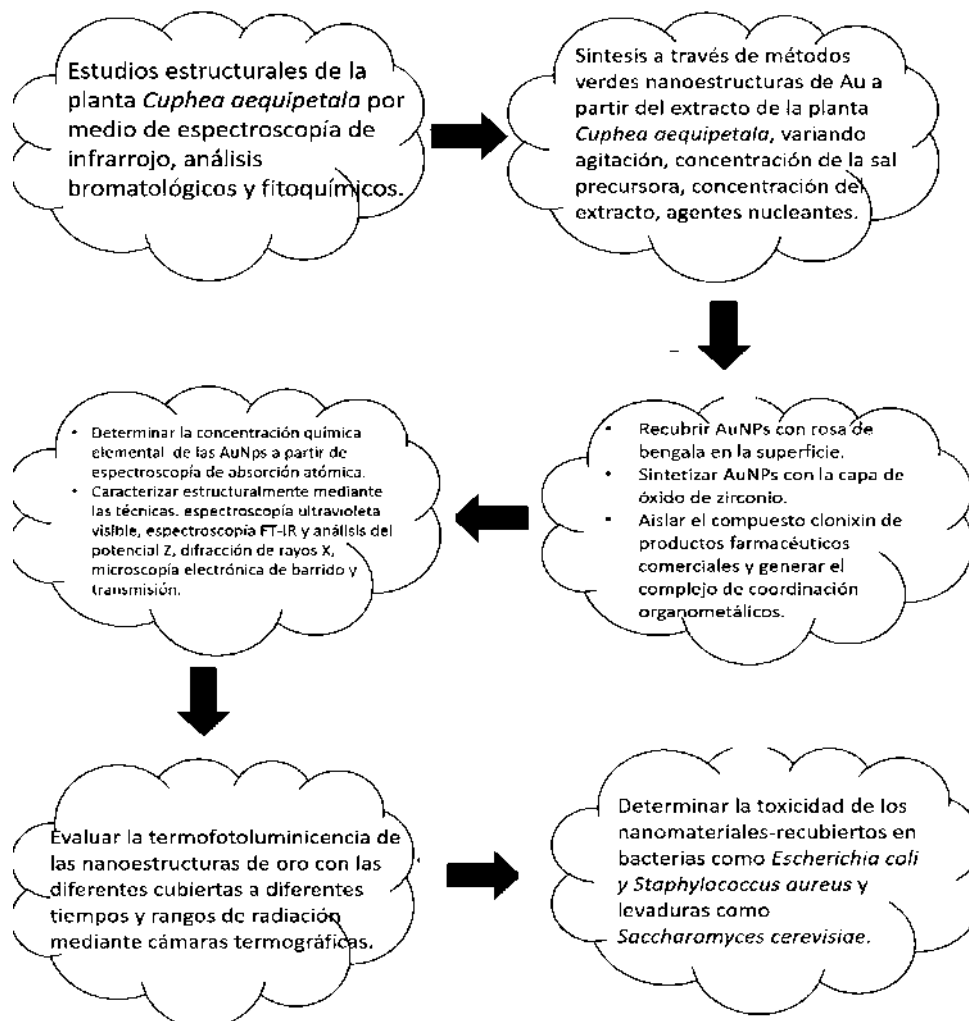


Figura 3. 1 Metodología general de la fase experimental.

3.1 Molienda de la planta *Cuphea aequipetala*.

Una vez adquirida la planta, se somete a un proceso de molienda mecánica hasta formar polvos finos homogéneos sin un tamaño de partícula específico, se toma la planta entera, esperando obtener la mayoría de los compuestos presentes en la misma. El propósito de la molienda es incrementar el área superficial de contacto entre el polvo con el solvente para permitir una mejor extracción de las sustancias contenidas en la planta, en este caso se utilizará agua desionizada.

3.1.1 Preparación de la infusión

Se pesa 2 g de la planta finamente molida con anterioridad para ser colocada en un vaso de precipitado con 100 mL de agua desionizada. Posteriormente, la mezcla se cubre con papel aluminio, se coloca en un termoagitador (Termo Scientific) y se extraen los compuestos provenientes de la planta mediante una infusión a una temperatura de 55 °C, mediante agitación constante por un tiempo de 25 min. Finalmente, el extracto preparado se filtra utilizando un papel filtro Whatman No. 4, y se deja reposar hasta temperatura ambiente.

3.2 Análisis bromatológico y fitoquímico de la planta.

3.2.1 Análisis Fitoquímico

Seguidamente, se realizan diferentes ensayos que nos permiten hacer un análisis cualitativo de ciertos compuestos presentes en la planta *Cuphea aequipetala*, los resultados se interpretan de acuerdo a positivo o negativo mediante colorimetría, formación de precipitados o espumas. Por lo tanto, estas pruebas fungen solo como indicadores de la presencia de determinados compuestos tales como esteroides, terpenoides, acetilénicos, saponinas, benzopirona (flavonoides), taninos, compuestos aromáticos, monosacáridos, nafto y antraquinonas [55]. Las metodologías planteadas para el desarrollo de este trabajo se describen enseguida:

1. **Prueba Liebermann-Buchard:** Consiste en mezclar 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfría a una temperatura de 0 °C y se le adiciona una gota de ácido sulfúrico concentrado. Finalmente, una porción de este reactivo se pone en contacto con

- la infusión de la planta en donde el criterio principal para que la prueba sea positiva para la formación de esteroides, es mediante la formación de colores azul, verde, rojo y naranja.
2. **Prueba de permanganato de potasio:** Se adiciona 0.1 g de la planta en 2 mL de agua desionizada, se añade una solución de KMnO_4 al 2% gota a gota con agitación, hasta la desaparición del color púrpura del KMnO_4 . La prueba es positiva con la decoloración del permanganato para compuestos con enlaces etilénicos y acetilénicos.
 3. **Prueba de espuma:** Se coloca 1 mL de la planta en un tubo de ensaye para añadirle agua caliente. Se agita la solución y si hay formación abundante de espuma, y ésta es estable, indica la presencia de saponinas (prueba positiva).
 4. **Prueba Shinoda:** Esta prueba sirve para indicar núcleos benzopirona (flavonoides). Se emplea 1 mg de la infusión de planta con 0.5 mL de HCl al 10%. Inmediatamente, se añade limadura de Mg para producir una reacción exotérmica, si la prueba es positiva, muestra una tonalidad roja (pálido-oscuro).
 5. **Prueba de cloruro férrico:** Consiste en poner en contacto unas gotas de FeCl_3 al 20% con unos cuantos mg de la muestra del extracto de planta. La prueba es positiva para taninos si aparece un precipitado de un tono azul-verdoso.
 6. **Prueba de Mayer para alcaloides:** Se preparó el reactivo disolviendo por separado 1.36 g de HgCl_2 y 5 g de KI en 60 mL y 10 mL, respectivamente. Inmediatamente, se mezclaron ambas soluciones y se aforó a 100 mL. Se añadieron cuatro gotas de este reactivo a la solución que contiene la muestra previamente acidificada con HCl diluido (obteniendo un precipitado). El criterio positivo de la prueba ocurre cuando el precipitado se disuelve al adicionarle el reactivo de HgCl_2 y KI .
 7. **Prueba formaldehído-ácido sulfúrico:** Se preparó una solución con 30 mg de la planta en 1 mL de hexano. Se le añadieron 2 gotas de este reactivo (preparado al momento), el cual consiste en una gota de formalina (formaldehído al 40 %) a 1 mL de H_2SO_4 concentrado (agitando ligeramente la solución). En este caso, se debe observar el color en la capa superficial del reactivo, posterior a la adición de la planta, y el color del reactivo después de que el tubo sea agitado. Los indicativos de que la prueba positiva para compuestos aromáticos es la presencia de una coloración rosa, naranja, azul, verde, púrpura, que con un mayor tiempo de reposo cambiará a café o negro.

8. **Reactivo Benedict:** Se preparó una solución con 0.2 g de la planta, 5 mL de agua desionizada y 5 mL de la solución de Benedict, en donde se observa la producción un precipitado amarillo o amarillo-verdoso. Posteriormente, se calienta la mezcla hasta ebullición y se examinó la formación del precipitado, así como su color. La prueba es positiva para azúcares reductores. El reactivo se preparó disolviendo 173 g de citrato de sodio y 100 g de carbonato de sodio anhidro, empleando 800 mL de agua destilada, en donde, posteriormente, se ajustó el volumen de la solución final a 850 mL con agua desionizada. Se disuelve por separado 17.3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua desionizada, en donde la solución resultante se vierte lentamente en la solución de citrato y carbonato empleando agitación. La solución final se aforó a 1 L añadiéndole agua desionizada.
9. **Reactivo de Barfoed:** Para la preparación del reactivo, se disuelven 16.6 g de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ en 245 mL de agua desionizada y 2.4 mL de ácido acético glacial. Una vez preparado el reactivo, se tomaron 2 mL y se le añadieron 15 mg de extracto de la planta en un tubo de ensaye y se calentó en baño María por 3 min. La formación de un precipitado amarillo-naranja indica resultado positivo para monosacáridos.
10. **Prueba de Nafto y antraquinonas:** Para la detección de este tipo de metabolitos secundarios se empleó la reacción de Bornträger-Kraus. Para ello, el extracto etanólico seco de la planta se mezcló con 5 mL de una solución etanol-agua (1:7), a la cual se adicionó 0.5 mL de H_2O_2 y 0.5 mL de H_2SO_4 y se procedió a calentar; bajo estas condiciones se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas, las cuales se extraen con tolueno y se agitaron en presencia de 0.5 mL de una solución de NaOH al 5% que contiene a su vez NH_4OH al 2%. En caso de la presencia de nafto o antraquinonas, al dejar separar las fases, la capa alcalina (inferior) toma una coloración de rosa a rojo intenso, lo cual resulta ser positivo para nafto y antraquinonas.

3.2.2 Análisis proximal

Para esta metodología se tomaron las pruebas realizadas por Silva y col [55]. además de Susanto y col [56]. Primeramente, se determinó la humedad del polvo fino de la planta, para lo cual se secó en una cápsula de aluminio aproximadamente 2 g de muestra hasta peso

constante a una temperatura comprendida entre 95-100 °C en un horno cuya presión no debe exceder la presión de 100 mm Hg. La operación requiere un tiempo aproximado de 5 h y se considera la humedad como la pérdida de peso. Para el caso de la determinación de materia mineral o cenizas, se pesaron 2 g de la muestra en un crisol de porcelana y se calcinaron durante 3 h, en una mufla precalentada a 550-600 °C. Se enfrió el crisol en el desecador y se pesó rápidamente calculando el % de ceniza hasta la primera cifra decimal. Es de suma importancia mencionar, que se debe evitar abrir la mufla durante el periodo de calcinación para evitar pérdidas de la misma. Por otro lado, para la determinación de proteína cruda o nitrógeno total en forma de amonio (está prueba no determina el contenido de N en forma de nitratos o nitritos) se empleó el método Kjeldahl. Los reactivos y metodología son descritos enseguida:

- a) Ácido sulfúrico concentrado (93-95).
- b) Catalizador; mezcla de K_2SO_4 con HgO en proporción 20:1 con $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ en la misma proporción.
- c) Solución de hidróxido de sodio aproximadamente al 33% (500 g NaOH en 1lt H_2O). La densidad de la solución debe ser 1.36.
- d) Zinc en gránulos
- e) Solución de ácido bórico; 40g en 1 L de H_2O .
- f) Solución aproximadamente 0.1 N de HCl, titulada con Na_2CO_3 , anhidro, usando naranja de metilo como indicador.
- g) Solución indicadora de rojo de metilo-verde de bromocresol. Mezclar 1 parte de una solución alcohólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de una solución de alcohólica de verde de bromocresol al 0.2%.

Para la digestión los pasos del proceso a seguir se describen a continuación:

- 1) Pesar de 1 a 2 g de muestra sobre una hoja de papel filtro, doblar cuidadosamente el papel y se introducirlo en un matraz Kjeldahl de 500 mL.
- 2) Añadir 6 g de catalizador.
- 3) Adicionar 20 mL de H_2SO_4 concentrado.
- 4) Calentar en el digestor, primeramente, a temperatura moderada (80°C) hasta que la formación de espuma cese y después a modo de mantener una ebullición activa hasta que la solución se clarifique. Continuar por 15 min más después de alcanzar este punto.

5) Dejar enfriar y añadir aproximadamente 200 mL de agua con agitación constante.

El proceso a seguir es la destilación:

1) Colocar 75 mL de solución de ácido bórico en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 500 mL marcado a 225mL. Añadir 2 o 3 gotas de indicador. Asegurarse de que la punta del condensador se encuentre bajo la superficie del líquido en el Erlenmeyer.

2) Introducir unos 8 o 10 gránulos de Zn al matraz Kjeldahl.

3) Sosteniendo el matraz Kjeldahl en posición inclinada, añadir cuidadosamente una mezcla de 100 mL de solución de NaOH al 33%, a modo que resbale por las paredes y se formen dos capas.

4) Conectar inmediatamente al destilador, mezcla el contenido del matraz Kjeldahl mediante agitación rotatoria y calentar hasta que todo el NH_3 haya sido destilado (150 mL de destilado son generalmente suficientes).

5) Bajar el matraz Erlenmeyer de manera que el extremo del condensador quede fuera de la solución de ácido bórico y apagar el sistema de calentamiento. Enjuagar con agua destilada la punta del condensador.

El último paso del proceso fue realizar una titulación:

Titular con una solución 0.1 N de ácido clorhídrico el contenido del matraz Erlenmeyer hasta el cambio de color del indicador (debe titularse inmediatamente). Los cálculos para determinar el porcentaje de nitrógeno o proteína cruda se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 3. 1

$$\text{Porcentaje de Nitrogeno } (\%N) = \frac{(\text{ml de ácido} \times \text{normalidad del ácido}) \times (1.40)}{(\text{peso de la muestra en gramos})}$$

Ecuación 3. 2

$$\text{Porcentaje de Proteína calculada} = \%N \times 6.25$$

En el caso de la determinación de extracto etéreo o grasa cruda, se cuantifican las sustancias extraíbles en éter etílico. El procedimiento de manera general consistió en extraer en un aparato Soxhlet aproximadamente 2 g de muestra seca con el solvente en un dedal de papel

filtro que permita el paso rápido del disolvente. El tiempo de extracción es variable (4-16 h), dependiendo de la velocidad de condensación, 5- 6 gotas o 2-3 por segundo, respectivamente. Se recupera el éter y se evapora el disolvente residual sobre baño María en un lugar ventilado. Se seca el residuo a 100 °C durante 30 min, se enfría y pesa.

El proceso de fibra cruda se realizó por el método de filtrado con fibras cerámicas. Este análisis determina la fibra común como la pérdida por calcinación del residuo de las digestiones ácidas y alcalinas de la muestra. Los reactivos empleados, así como la metodología paso a paso son enunciadas a continuación:

- a) Solución de ácido sulfúrico 0.255 N (1.25 g de N_2SO_4 /100 mL de agua).
- b) Solución de hidróxido de sodio 0.313 N (1.25 g de NaOH/100 mL de agua libre de Na_2CO_3).
- c) Fibra cerámica preparada. Se colocaron 60 g de fibra cerámica (Cat. No. 1740 M Lab. Safety Supply) en un vaso de licuadora y se le agregó 800 mL de agua y se mezcló por 2 min a baja velocidad.
- d) Alcohol etílico al 95%
- e) Antiespumante (Antiespumante A de Dow Corning diluido 1:4 con éter de petróleo que a su vez también esta diluido 1:4 con agua).
- f) Fragmentos de porcelana como cuerpos para regular la ebullición.

Los aparatos empleados para esta prueba, son los mismos que para el análisis anterior los cuales son:

- 1) Aparato digestor con vasos de Berzelius de 600 mL. (Labconco Corp.)
- 2) Crisoles de porcelana de 70 x 15 mm de 30 mL.
- 3) Desecador con material desecante.
- 4) Aparato para filtración con embudos Büchner cubiertos con criba No. 200 tipo 304 de acero inoxidable tipo California (Labconco Corp.)
- e) Aparato para succión de matraces en línea con lo embudos, con una válvula para detener la succión.
- f) Aparatos de calentamiento automático para ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y agua.

El procedimiento requiere tener la muestra totalmente molida en polvo fino, posteriormente para la digestión ácida se realizaron los siguientes pasos:

1) Pesar 2 gramos de muestra seca y desengrasada con éter etílico y transferir a un vaso de 600 mL.

2) Agregar de 1.5 a 2 g en peso seco de fibra cerámica preparada (20-26 mL), 200 mL de ácido sulfúrico 1.25% hirviendo y 1 gota de antiespumante. También se le agregaron algunos pocos gránulos para regular la ebullición. Colocar el vaso inmediatamente en el digestor precalentado y hervir exactamente por 30 min, rotando el vaso cada 10 min a manera de mantener las partículas sólidas dentro de la solución.

3) Filtrar el contenido a través de una capa delgada de cerámica en un crisol Gooch y lavar con 4 porciones de agua hirviendo de 50 mL cada uno. Cuidadosamente se evitó que la capa de fibra cerámica no se secase antes de pasar todo el contenido restante a un vaso para la digestión alcalina.

Seguidamente de la digestión ácida, se procede a realizar la digestión alcalina, para lo cual una vez transferido el residuo al vaso incluyendo la cubierta de fibra cerámica de la filtración anterior, se le añadieron 200 mL de la solución de NaOH 1.25% hirviendo y se colocó en una estufa a hervir por 30 min. Se filtró como el paso descrito con anterioridad en la digestión ácida e inmediatamente se lavó con una porción de 25 mL de H₂SO₄ 1.25% con tres porciones de 50 mL de agua y 25 mL de alcohol. Se secó el residuo y transfirió a un crisol de porcelana. Después, se secó este crisol y su contenido a 130 °C por 2 horas. Posteriormente, se enfrió en desecador y se pesó. Finalmente, se calcinó a 600 °C por 30 min. Enfriar nuevamente en desecador y volver a pesar (balanza analítica de precisión +/- 5 mg). Las fórmulas para los cálculos del % de fibra cruda se muestran a continuación:

Porcentaje de fibra cruda en la muestra seca y desengrasada = %C

Ecuación 3. 3
$$\%C = \frac{(\text{Peso del crisol con residuo seco} - \text{Peso después de la calcinación}) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Ecuación 3. 4
$$\%FC = (C)(100 - \% \text{húmedad} - \% \text{grasa cruda})/100$$

Una vez obtenidos los cálculos de los procesos anteriores por diferencia a 100 se obtiene el extracto libre de nitrógeno (ELN), para lo cual:

Ecuación 3. 5
$$\%ELN = 100 - (\%H + \%M.M. + \%P.C. + \%E.E. + \%F.C.)$$

Donde:

% H= % Humedad

% M.M.= % Materia Mineral

% P.C. = % Proteína Cruda

% E.E = % Extracto Etéreo

% F.C. = % Fibra cruda

3.3 Síntesis de nanoestructuras de oro

Primeramente, se preparó la sal precursora de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) con una pureza del 99 % de la marca Sigma-Aldrich en agua desionizada a una concentración de 5 mM.

Para el primer ensayo de formación, se empleó el extracto acuoso de la planta *Cuphea aequipetala* a una concentración final de 0.02 g/mL a temperatura ambiente, para hacerla reaccionar con 2 mL de la solución de sal precursora HAuCl_4 para formar una relación volumétrica 1:1. La reacción se llevó a temperatura ambiente, con y sin la presencia de agitación a 4 revoluciones por minuto durante 30 minutos. Posterior al cambio de color, la muestra se sometió a centrifugado a 12 000 rpm por un tiempo de 5 min en una microcentrífuga (Premiere) con una doble operación de éste mismo proceso, inmediatamente se analizó por medio de la espectroscopía UV-Vis. Las concentraciones finales del ensayo fueron de 0.01 g/mL para el extracto de la planta, 2.5 mM de la sal precursora.

Es importante mencionar que la concentración del extracto y sal precursora se variaron de acuerdo al comportamiento observado en la síntesis inicial. Aunque para dar un planteamiento inicial, a continuación, se enuncia de manera resumida los parámetros iniciales sujetos a modificación, tomando en cuenta antecedentes de síntesis verde de nanopartículas de oro, anteriormente realizadas por el presente grupo de trabajo.

Para la posterior cubierta con Rosa de bengala (Figura 3.2) se tomaron como base la metodología planteada por Kitching y Col. [51], se preparó una solución a 20 μM (0.01017.6 g en 50 mL de agua desionizada), se caracterizó el colorante mediante espectroscopía UV-Vis, luego se tomó 1 ml de las nanopartículas y se disolvieron en 15 ml de agua desionizada, seguido de esto se mezcló 1 mL de colorante en los 16 mL de nanopartículas y se agitó. La

mezcla se midió en el espectrofotómetro de UV-Vis y se recuperó en el tubo de origen, para que, ahí mismo se le adicionarán 14 ml más (uno a uno) y se midió respectivamente hasta generar picos característicos de la mezcla del colorante y las nanopartículas entre 500 y 600 nm, hasta obtener picos simétricos equilibrados, lo cual indicó la correcta recubierta.

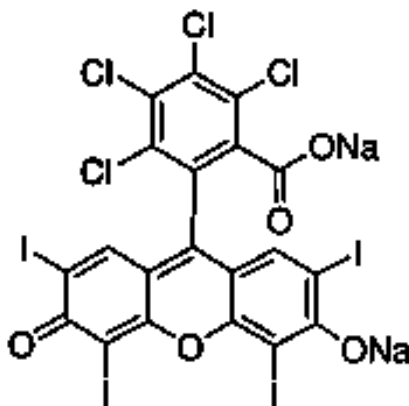


Figura 3. 2 Rosa de bengala [57].

3.4 Análisis del Potencial Z de nanopartículas de oro recubiertas de rosa de bengala.

La carga superficial normalmente se cuantificó por el potencial zeta (PZ), un parámetro que proporciona información sobre la carga neta de partículas en un entorno líquido. Su valor está estrechamente relacionado con la estabilidad de la suspensión y el recubrimiento de la superficie de las partículas. Para lo cual se debe considerar que, una partícula es dispersa en un líquido que la solvata y se desarrolla una doble capa eléctrica de modo que la carga superficial de la partícula se neutralice por una capa adyacente en solución que contiene un exceso de iones de carga opuesta a la de la superficie [58].

Esta prueba se realizó en la Universidad de Carolina del Norte en Charlotte, con ayuda del Dr. Juan Viviero-Escoto, en la cual se analizaron las nanopartículas de Au individuales sin centrifugar, AuNps centrifugadas y AuNps con recubrimiento de 5 ml de rosa de bengala a 20 mM, todas a una concentración de 980 ppm. Dicho estudio se realizó en un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (laser He-Ne rojo a 633 nm) que utiliza la dispersión de luz electroforética, las muestras fueron dispersadas en PBS para obtener un pH de 7.4, el equipo tiene un rango de detección para nanopartículas entre 3.8 nm y 100 μ m de diámetro.

3.5 Pruebas antibacteriales de las AuNps.

Diversos estudios en la literatura sugieren que algunas de las nanopartículas de oro pueden llegar a tener algún efecto antibacterial, lo cual podría afectar los resultados en líneas celulares de cáncer, generando un falso positivo. Debido a esto se realizó un análisis de las AuNps en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Dichos análisis se realizaron en la Universidad de la Ciénega con ayuda de la Dra Yvain De los Ángeles Salinas Delgado.

La actividad antibacterial de las AuNps fue determinada por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) modificado de acuerdo a lo reportado por Bernal y co [59]. Las cepas sujetas a estudio fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, liofilizadas y cultivadas en caldo Mueller-Hinton. Posteriormente, se preparó el inóculo de las bacterias, se tomó con asa bacteriológica las cepas previamente cultivadas y se colocaron en un tubo con solución salina (0.85%) ajustando el inóculo a 0.5 unidades (10⁸ cel/ml) según la escala de Mc Farland, verificándose con la absorbancia a 580 nm. Después, se tomaron discos de papel filtro y fueron sumergidos en cada una de las soluciones a evaluar por un tiempo de 30 min, esto se realizó así ya que, si se agregaban gotas de nanomateriales directamente a la caja de Petri, la gota se dispersa en la caja y no permite tener una medida exacta del halo de inhibición. Los discos de papel con muestra, fueron colocados en las cajas de Petri las cuales contenían agar Mueller-Hinton con los inóculos de las diferentes cepas. Las soluciones que se evaluaron fueron extracto de la planta *C. aequipetala* (0.02, 0.001, 0.0005, 0.00025 g/ml), solución de H₂AuCl₄ 5 mM (1007 ppm) y diferentes concentraciones (400, 150, 50, 1 ppm), AuNps sin centrifugar con la mezcla de extracto (980 ppm) y AuNps centrifugadas a la concentración de 980, 400, 150, 50 y 1 ppm. Finalmente se compararon los halos de inhibición después de un tiempo de incubación de 24 h a 37 °C.

3.6 Síntesis de nanopartículas de Au@ZrO₂.

Para esta prueba se utilizó el método de precipitación propuesto por Zhou y co [60], para el cual es necesario tener las nanopartículas de oro como semillas de crecimiento para la cubierta de ZrO₂. Las AuNps se sintetizaron mediante la mezcla de 7.5 ml de extracto de la planta de *C. aequipetala* con 7.5 ml de solución de H₂AuCl₄, la síntesis se llevó a cabo en un periodo de tiempo de 2 minutos y posteriormente cambió de color de amarillo claro a morado se monitoreó mediante espectroscopía de UV-Vis, una vez confirmada la síntesis se

centrifugaron las AuNps a 10000 rpm, quitando el sobrenadante y adicionando agua desionizada hasta un volumen 15 ml, esto se realizó 3 veces adicionando agua desionizada en cada repetición y monitoreando el sobrenadante hasta que ya no tuviera residuos de nanopartículas.

El segundo paso fue recubrir la superficie de las AuNps con una capa de zirconia, para lo cual se añaden 0.6 μ L de una solución de propóxido de zirconio (IV) (obtenida con 10 μ L de propóxido de zirconio (IV) a 10 ml de etanol absoluto), mientras se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Las nanopartículas de Au@ZrO₂ formadas en el paso final se concentran por centrifugación a 8000 rpm y luego se lavaron con una mezcla de etanol y agua desionizada (1:1 v/v) varias veces. Como control negativo se utilizó una mezcla de 7.5 ml de extracto con 0.6 μ L de una solución de propóxido de zirconio (IV).

La literatura indica que se puede añadir un ion competitivo al medio como lo podría ser el silicio, sin embargo, esas pruebas utilizan síntesis química convencional para producir las nanopartículas semilla [60], lo cual no tiene demasiados agentes químicos en el medio, como lo es en la síntesis verde, debido a esto se decidió solamente adicionar el precursor de zirconio para analizar la situación con AuNps producidas mediante extracto de *Cuphea aequipetala*.

3.7 Producción de clonixin para generación de complejos de oro.

El clonixin, se obtuvo a partir de pastillas de venta comercial de clonixinato de lisina 250 mg con 10 tabletas por caja. Se utilizaron 3 cajas del fármaco y se molieron en un mortero hasta obtener polvo fino, el cual se colocó en agitación con acetato de etilo durante 30 minutos, posteriormente se filtró y se evaporó a presión reducida, el sólido obtenido se disolvió en 300 mL de agua desionizada y se le adicionó HCl al 10% hasta obtener un pH cercano a 4 para favorecer la precipitación del clonixin. La extracción de este precipitado se realizó mediante un embudo de separación, utilizando nuevamente acetato de etilo como fase orgánica, con este solvente se hicieron cuatro extracciones mediante volúmenes de 50 mL por extracción. Los lavados se realizaron en un matraz bola y seguidamente fueron sometidos a evaporación por presión reducida, obteniendo así 4.2 g del clonixin solido color blanco cuyo punto de fusión es 235 °C.

Para la obtención del clonixinato de sodio se disolvió 1 g de clonixin en 20 mL de metanol, a los cuales se les agrego 0.178 g de NaOH (1.2 equivalentes), dejándose en agitación por 24 h a temperatura ambiente, la solución final se evaporo en un rotovapor, el sólido obtenido se extrajo con acetona. El sólido presento una coloración amarilla cuyo punto de descomposición fue de 250 °C.

Posteriormente, para formar un complejo con oro se pesaron 0.1 g clonixinato de sodio mezclándose con 5 mL de agua desionizada, se agitó por 30 minutos y seguidamente se le adicionaron 175 μ L de solución precursora de oro (HAuCl_4) 10 mM, la reacción se dejó en agitación por 24 h, una vez transcurrido ese tiempo se le adicionaron 500 μ L nuevamente de solución de oro 10 mM, dejándose en agitación sin temperatura por otras 24 h, después de este tiempo, se separó la fase solida del agua sobrenadante, agregando 5 mL de acetato de etilo, en un embudo de separación, se eliminó la fase acuosa y el solvente, recolectándose solamente el sólido, dicho producto se dejó secar a temperatura ambiente por 2 días y una vez seco el polvo se caracterizó.

Posterior a la fase de caracterización, se procedió a sintetizar nanopartículas de oro mediante la adición de 0.1 mg de complejo Au-Clonix con 1.5 mL de agua desionizada y 1.5 mL de extracto de la planta *Cuphea aequipetala*, de tal manera que el extracto actúe como agente estabilizador y reductor del metal oro, permitiendo que parte del clonixin se quede en la superficie de las nanopartículas combinado con restos del extracto, dejándose reaccionar sin agitación y a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente a este proceso de realizaron algunas caracterizaciones nuevamente.

Cabe mencionar que se realizaron réplicas de esta metodología a fin de corroborar que se pueda producir el mismo material nuevamente las cuales están siendo caracterizadas.

3.8 Concentración de nanomateriales mediante espectroscopía de absorción atómica.

Se empleó un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer modelo 3100) con la finalidad de conocer la concentración y el rendimiento porcentual de la reacción de síntesis de los nanomateriales. El primer paso consistió en la obtención de una curva patrón a partir de varios estándares de oro de la marca Perkin Elmer de alta pureza. Posteriormente, las muestras fueron lavadas por un proceso de centrifugación, hasta la obtención del sobrenadante (solución donde se encuentran los iones de oro sin reaccionar). Finalmente, se analizaron los valores de absorbancia de éstos mismos. Mediante la curva patrón se les asignó

un valor en concentración mediante regresión lineal; por lo tanto, la diferencia entre los iones de Au iniciales y los restantes en las soluciones lavadas resultó ser proporcional a la cantidad de iones reducidos a sólidos de oro. El rendimiento porcentual se calculó por medio de la (Ecuación 3.5): En donde Au^+ *sal precursora* representa la cantidad de iones de oro presentes en la solución inicial de la sal precursora $HAuCl_4$.

Ecuación 3.5

$$\text{Porcentaje de Rendimiento} = \frac{Au^+ \text{ sal precursora} - Au^+ \text{ sobrenadante}}{Au^+ \text{ sal precursora}} * 100$$

3.9 Caracterización de los nanomateriales.

Se confirmó la síntesis por medio de Espectroscopía UV-Vis, observando el comportamiento de todos los nanomateriales de oro sintetizados y recubiertos. Cada espectro fue calibrado a partir de una sustancia de referencia (agua desionizada y *Cuphea aequipetala*), con el objetivo de garantizar que las muestras espectrales del estudio no sean alteradas por el medio de dispersión. Los análisis fueron obtenidos con un equipo Ocean Optics USB-4000.

La Espectroscopía de infrarrojo arrojó información de los grupos funcionales involucrados en la síntesis de los nanomateriales, ya que, se ha reportado que la reducción y estabilización se debe principalmente a compuestos aromáticos, fenoles, carbohidratos y flavonoides. Primeramente, se secaron las soluciones que contengan el extracto puro de la planta *Cuphea aequipetala* y posteriormente las que contienen los nanomateriales. Se elaboraron pastillas compactas de las muestras con KBr de marca Sigma-Aldrich.

Mediante Microscopía Electrónica de Barrido a través del equipo Jeol JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope se observó el tamaño y dispersión de los nanomateriales. Además, se realizó el análisis químico puntual (EDS por sus siglas en inglés) y mapeo químico para identificar la presencia del elemento de interés, siendo Au, ZrO_2 y las cubiertas de rosa de bengala.

Utilizando el equipo de Difracción de rayos X D8 Advance, DAVINCI se determinó la estructura cristalina de los nanomateriales sintetizados. Las muestras se colocaron en un horno de secado a 45 °C hasta obtener polvos, para ser caracterizados por medio de la técnica

de policristales. Se colocaron en un portamuestra de vidrio esmerilado los polvos que contengan las materias primas y nanomateriales, analizándolos en un rango angular comprendido entre 10-90 ° empleando un tiempo de 0.6 s y un incremento de 0.02 °.

Se empleó Microscopía Electrónica de Trasmisión por su gran capacidad de resolución, ya que, esta técnica permite observar imágenes que reflejan claramente la morfología, tamaño y estructura de los nanomateriales. Se prepararon las muestras mediante la adición de una gota de las soluciones líquidas en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro, cubiertas con una película de carbón amorfo, posteriormente, se secó la gota y se analizó. Se estudiaron los nanomateriales por medio de imágenes de campo claro, campo oscuro, alta resolución (HRTEM, por sus siglas en inglés), por contraste de masa (HAADF, por sus siglas en inglés), en un microscopio electrónico de transmisión con corrección por aberración Cs de la marca JEM-ARM200F, Atomic Resolution Analytical Microscope.

3.10 Pruebas biológicas de AuNps sintetizadas mediante *Cuphea aequipetala* y recubrimiento de rosa de bengala.

Para este proceso se cultivaron líneas celulares HeLa en el laboratorio de biofotónica del CIO con apoyo de la Dra Valeria Piazza, para lo cual se hicieron crecer a 37 °C con 5% de CO₂ en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 10% suero bovino fetal inactivado por calor (FCS), L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de penicilina y estreptomicina 50 µg/ml. Los cultivos con 80% de confluencia se dividieron rutinariamente 1: 5 en placas de cultivo Petri de 10 cm de la siguiente manera. Las células se lavaron dos veces en PBS tibio. Se añadió 1 ml de PBS que contenía 0,25% (p/v) de tripsina a las placas y colocado a 37 °C durante 5-10 minutos. Después de que las células se separaron de las placas, se añadió 2 ml de medio de cultivo precalentado y se recolectaron en un tubo falcon. Las células se centrifugaron y se sembraron en placas nuevas con medio de cultivo nuevo.

Hasta este punto las células ya se encontraban listas para utilizarse, posteriormente se les añadió 60 µL de las muestras (AuNps 450 ppm, rosa de bengala 20 mM y AuNps con Rosa de bengala en la superficie).

Posteriormente se dejaron en incubación por 24 h y se midieron las propiedades de fluorescencia mediante microscopio confocal, cabe destacar que se tiñó con DAPI los núcleos de las células para poder identificarlas respecto a los demás materiales fluorescentes.

3.11 Análisis de Nanomateriales fluorescentes en Microscopio Confocal.

Las muestras de nanopartículas sintetizadas con la planta *Cuphea aequipetala* y el propio extracto se analizaron en el microscopio confocal ZEISS LSM-710-NLO, además se incorporaron 50 μ L de estas muestras en medio de cultivo con células HeLa teñidas con colorante Dapi fluorescente para núcleos celulares. Esto se realizó para corroborar la fluorescencia de los nanomateriales y la nula del extracto, cabe destacar que hace falta realizar un estudio cuantificativo de citotoxicidad, ya que los resultados hasta ahora solo son visuales de manera corroborativa.

3.12 Pruebas de irradiación de las AuNps con láser de 808 nm, 532 nm y 390 nm.

Para estas mediciones se utilizó 1.5 mL de muestra de AuNps centrifugadas sin residuos de extracto, en tubos Eppendorf, posteriormente se montó un dispositivo que consta de un soporte para la muestra, una placa de análisis de temperatura con un sensor conectado a una computadora, el láser montado en un soporte, una cámara termográfica en dirección de la muestra, una computadora para análisis de datos, un regulador de voltaje y potencia del láser y un controlador de temperatura del láser.

Se analizaron las muestras a diferentes tiempos (3, 5, 10 y 15 minutos) con el propósito de saber si alcanzaban alguna temperatura cercana a los 50 °C, ya que se espera que en esta temperatura las AuNps puedan eliminar células de cáncer.

3.13 Pruebas biológicas de las AuNps en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Se realizó en análisis de viabilidad celular mediante el método de exclusión de azul tripano en las levaduras, esta prueba se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos tintes, como el azul tripano, mientras que las células muertas no. Cuando una suspensión celular simplemente se mezcla con el tinte y luego se examina visualmente para determinar si las células absorben o excluyen el tinte. Una célula

viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul. La evaluación periódica de la viabilidad celular proporciona un indicador temprano de la calidad de sus células. Las viabilidades superiores o iguales al 95% son excelentes.

Se siguió una metodología ya reportada por Liesche et al [61], la cual consiste de los siguientes pasos:

- (1) Colocar 50 µl de suspensión celular en un vial criogénico.
- (2) Agregar partes iguales de colorante azul tripán al 0,4% a la suspensión celular para obtener una dilución de 1 a 2 (ejemplo: 50 µl de células por 50 µl de azul tripán) y mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- (3) Incubar la mezcla durante menos de tres minutos a temperatura ambiente. Si las células se cuentan después de aproximadamente cinco minutos, la viabilidad será inexacta debido a la muerte celular.
- (4) Con el cubreobjetos ya colocado, llene un lado de un contador de hemacitómetro (camara de Neubauer) con la suspensión celular colocando la punta de la pipeta en la muesca. Normalmente, cada lado necesita de 10 a 20 µl.
- (5) Colocar el hemacitómetro en la platina de un microscopio óptico y enfóquese en las células.
- (6) Cada lado del hemacitómetro contiene varios cuadrados. Cuente todas las células (claras y azules) en cada cuadrado grande en cada esquina del hemacitómetro (vea las áreas blancas en el diagrama a continuación). Cada cuadrado grande contiene 16 cuadrados pequeños. En cada cuadrado grande, cuente las celdas que están en las líneas fronterizas solo en dos lados. Llevar un registro del número de celdas azules por separado, así como parte del número completo de celdas. Las celdas azules son las celdas no viables.
- (7) Calcular el porcentaje de células viables dividiendo el número de células viables por el número de células totales y multiplicando por 100 o% de células viables = $[1,00 - (\text{Número de células viables} \div \text{Número de celdas totales})] \times 100$.
- (8) Repetir si la viabilidad es inferior al 90%.

(9) Repetir el proceso en una suspensión con 10 mL de medio de cultivo rico en 1% levadura, 2% peptona y 2% dextrosa.

(10) Exponer las levaduras al material (0.5, 1 y 2 mL de Aunps) por una hora en incubación, posteriormente irradiar la muestra con láser y contar las células para el análisis de viabilidad celular de los pasos 6 y 7.

3.14 Pruebas de termofotoluminiscencia.

La caracterización de la fotoluminiscencia se realizó utilizando un diodo láser semiconductor de onda continua con una potencia de excitación de 350 mW y centrado a 808 nm. La emisión de luminiscencia se analizó con un Spectrograph Spectra Pro 2300i y un tubo fotomultiplicador R955 de Hamamatsu. El sistema fue controlado por computadora con el software Spectra Sense. Las muestras se midieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL para garantizar la misma cantidad de material excitado. Se tuvo especial cuidado en mantener la alineación de la configuración para comparar las intensidades entre diferentes muestras caracterizadas. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras anteriormente analizadas, se irradiaron con el láser de infrarrojo cercano en periodos de tiempo de 3, 5, 10 y 15 min, se les tomó fotografías térmicas mediante una cámara termográfica y se esperaba llegar a 55 °C de calentamiento en los viales con muestra, dicha metodología se desarrolló de acuerdo a lo propuesto por Park y Col., Seo y Col. y Lee y Col. [52, 62, 63].

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En esta sección, se presenta toda la información obtenida mediante pruebas experimentales y caracterizaciones del extracto, materiales precursores y de los nanomateriales propuestos a sintetizar en los objetivos específicos de esta tesis, cabe destacar que se incluyen análisis biológicos complementarios en líneas celulares, levaduras y bacterias.

4.1 Síntesis de nanopartículas de Au mediante el extracto de la planta *Cuphea aequipetala*

En las últimas dos décadas, la nanobiomedicina ha experimentado un crecimiento expansivo sin precedentes en el desarrollo de nanomateriales diseñados para mejorar el diagnóstico, monitoreo y tratamiento de diversas enfermedades incluidas cáncer, Alzheimer, Parkinson, etc [64], Ahora bien, el oro es un metal que presenta resistencia a la corrosión y oxidación, lo cual favorece sus aplicaciones médicas, además a nivel nanométrico, tiene propiedades ópticas únicas debido al fenómeno de resonancia del plasmón de superficie, lo cual indica que tendrá una dispersión o absorción de la luz en respuesta a la oscilación colectiva de los electrones libres cuando la partícula se expone a la luz, en la longitud de onda de resonancia característica de dicho metal [65], que a su vez mediante agentes de superficie específicos, permiten modificar los rangos de detección hacia el infrarrojo cercano, en donde la radiación poca o nulumamente se absorbe por el cuerpo humano, lo cual reduce los daños abrasivos por terapias de radiación convencional y permite aplicar técnicas de bioimagen y agentes fototérmicos [66, 67].

Por lo tanto, la idea central de esta primera fase de investigación es sintetizar nanopartículas de Au, empleando la planta anticáncer *Cuphea aequipetala* como agente reductor de la sal precursora y estabilizante de los nanosólidos obtenidos, los cuales posteriormente fueron recubiertos de rosa de bengala como agente luminiscente, Además, se determinaron los tamaños, formas, dispersión y estructura cristalina por distintas técnicas de caracterización como son Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Transmisión (MET).

4.1.1 Análisis Bromatológicos

Algunas de las principales incógnitas en el proceso de síntesis de nanomateriales por medio de plantas son los componentes orgánicos presentes en el extracto, los cuales funcionan como agentes reductores y estabilizadores de ciertos metales, debido a esto se realizó un análisis proximal, bromatológico y estructural de la planta *Cuphea aequipetala* en polvo, para así mismo definir que componentes pueden estar involucrados en la reducción del oro.

Dichos análisis fueron evaluados utilizando base fresca (Bf) y base seca (Bs). Mediante la primera prueba se analizó la humedad en la planta (ver tabla 4.1), sin presentar diferencia alguna en Bf y Bs lo cual se atribuye a que se adicionó el polvo de la planta (después de su trituración hasta obtener partículas finas) en un crisol que a su vez se colocó en un desecador por 24 h, previo a la realización de las pruebas, para evitar que la planta adquiriera humedad adicional que pudiera proveer el medio ambiente. Se consideró que la suma de estos resultados (Bf y Bs) nos arrojen 100% de la materia orgánica analizada (peso de muestra con humedad + peso de muestra deshidratado).

Comparando éstos resultados con literatura previa de Susanto y Co. [56] ellos utilizaron 1000 g de hojas de la planta *Calophyllum inophyllum* extraídas en metanol y en el caso presente, se utilizaron 2 g de la planta en seco de *Cuphea aequipetala* para cada una de las pruebas. Ahora bien, ellos obtuvieron 11.24 % de humedad, lo que supera a lo obtenido en el presente estudio. Esto puede ser atribuido a sus diferencias en el ambiente de crecimiento, ya que *Cuphea aequipetala* crece en terrenos de humedad moderada por lo cual en su estructura solo se almacena la cantidad acuosa disponible y necesaria para las épocas de sequía y/o sus necesidades fisiológicas; y *C. inophyllum* crece en zonas bajas y costeras lo que genera disponibilidad de mayores cantidades de agua, aunque esto las hace susceptibles a contaminación microbiana, por otra parte también, éste alto contenido de humedad proporciona mayor actividad de enzimas solubles en agua y coenzimas necesarias para su metabolismo.

Ahora bien, en cuanto al extracto etéreo, encontramos que la planta utilizada por Susanto no mostró alguna cantidad significativa de aceites y, por la parte de *Cuphea aequipetala* se obtuvo 1.93 y 2.07% (Bf y Bs), lo que indica que las plantas de manera general, no requieren altas cantidades de grasas como método de obtención de energía, ya que sí se almacenaran

grandes cantidades de grasa en las hojas (generalmente es en la raíz donde se almacena), les generaría arteriosclerosis y envejecimiento.

En cuanto a la determinación de ceniza se obtuvo el valor de 11.38 y 12.19%. Comparando con el trabajo de Susanto ellos obtuvieron 4.75 % lo cual es una cantidad casi 3 veces menor, indicando la posible presencia de un alto contenido de minerales tales como cloro, magnesio, hierro, sodio y potasio, en general, los minerales de las plantas son menos biodisponibles que los de origen animal, no obstante, los minerales son importantes para el desarrollo físico y mental, y son componentes esenciales de los huesos, dientes, tejidos, músculos, sangre y células nerviosas.

En cuanto a la medición de proteína los valores registrados para *C. aequipetala* fueron de 9.92 y 10.64%, mientras que en el estudio de Susanto, ellos obtuvieron un 6.43%. Esto significa que *C. aequipetala* presenta 2 veces más cantidad en proteína lo que la constituye una fuente rica, aunque, se debe realizar un estudio adicional para identificar si pudieran estar biodisponibles para la dieta de mamíferos.

Por la parte de la fibra cruda, en la planta de *C. inophyllum* obtienen un 23.96 %, mientras que el presente trabajo obtiene 14.07 y 15.08%, siendo mayor el reportado por Susanto y Co. para los niveles de fibra no digestible, dado que su estructura se conforma de ramas fibrosas alargadas comparadas a las de *Cuphea aequipetala* que son redondas y blandas. Ahora bien, las plantas o verduras sin almidón, son las fuentes más ricas de fibra dietética y se emplean en el tratamiento de enfermedades como la obesidad, la diabetes, el cáncer y desórdenes gastrointestinales, ya que ayudan a mantener la salud humana por reducir el nivel de colesterol.

Finalmente, se tienen las concentraciones de 62.69 y 53.36% de carbohidratos los cuales por parte de *C. aequipetala* son superiores que las de *C. inophyllum*, (cita) lo cual la hace ser una fuente rica de energía disponible en el caso de usarla como fuente alimenticia. Para el caso de procesos de síntesis de materiales los azúcares presentes podrían estar involucrados en la reducción de los metales a nanomateriales.

Tabla 4. 1 Análisis bromatológico de *Cuphea aequipetala*

Determinación	Base fresca (%)	Base seca (%)
Humedad	6.67	6.67
Materia seca	93.33	93.33
Extracto etéreo (grasa)	1.93	2.07
Cenizas o minerales	11.38	12.19
Proteína cruda	9.93	10.64
Fibra cruda	14.07	15.08
Extracto libre de nitrógeno (carbohidratos)	62.69	53.36

4.1.2 Pruebas fitoquímicas del extracto de la planta *Cuphea aequipetala*.

La determinación de la composición química de las plantas medicinales permite conocer sus constituyentes biológicamente activos, por lo cual pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico, hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados, aunque éstos últimos resultan ser más costosos y es necesario contar con un antecedente de la presencia o ausencia de ciertos compuestos, por lo cual uno de los objetivos del presente estudio es identificar los compuestos presentes en el extracto de *Cuphea aequipetala* para intentar deducir cuales compuestos están asociados al proceso de síntesis de nanomateriales.

En el presente estudio se obtuvieron los resultados con agua desionizada como solvente ya que es el medio en el cual se realiza la síntesis de los nanomateriales, siendo este un solvente universal, poco costoso y nulamente tóxico comparado con otros solventes que se utilizan para extracción de sustancias activas. Siguiendo la metodología reportada por Silva y Co [55] ellos utilizaron hexano y etanol como solvente mezclados con la materia orgánica, dejándola reposar por 7 días y posteriormente filtrándola. La primera de estas pruebas arrojó positivo para esteroides en el caso de *C. aequipetala* al igual que Silva con el extracto de la fruta

Copernicia prunifera, éste tipo de compuestos están asociados a actividades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas; el análisis de los compuestos etilénicos es una de las pruebas adicionales que no fueron realizadas por Silva y Co, en el presente estudio, sí se realizaron mostrando un resultado positivo, lo cual está asociado a procesos oxidantes y formadores de vitaminas como la K1.

En el caso de la prueba para detección de saponinas la planta de *C. aequipetala* mostro resultado positivo y negativo para el fruto *C. prunifera*, la función de este tipo de compuestos es la misma que realizan los esteroides, por lo cual si alguno de ellos no se encuentra presente en el extracto el otro podría tener la misma función; Por otra parte, la prueba realizada para estudiar la presencia de flavonoides resultó positiva para *C. aequipetala* a pH de 6.33, y en el caso de Silva y Co. presentó ausencia de los mismos a un pH de 3, los flavonoides representan un ejemplo atractivo de compuestos bioactivos provenientes de plantas con usos prometedores como son anticáncer, prevención de enfermedades cardiovasculares, reducción de radicales libres de oxígeno, antialérgicos y antivirales. Ahora bien, la prueba de detección de taninos en el presente estudio arrojo un resultado positivo con la formación de espuma que perduró por al menos 1 minuto al agitarse y comparado con la planta de *C. prunifera* en el trabajo reportado por Silva ellos indican que también fue positivo y además en su cuantificación obtienen una concentración entre 1500 y 3000 ppm, los taninos son polímeros con funciones valiosas en las plantas, que contribuyen al sabor, olor y color, y son responsables de la astringencia de muchos productos. Las plantas ricas en taninos se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades porque tanto los taninos hidrolizables como los condensados tienen la capacidad de generar complejos con ciertos elementos, como lo son hierro, vanadio, manganeso, cobre y aluminio, presentando capacidades antioxidantes y de eliminación de radicales libres. Cabe destacar que, el contenido de taninos en las plantas puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas y geográficas, y puede presentar una composición química variada que a menudo es poco conocida.

La Tabla 4.2 muestra el resumen de los resultados anteriormente mencionados e indica el tipo de prueba que se realizó, además en la figura 4.1 se presentan imágenes de los tubos de ensayo en los cuales se llevaron a cabo las pruebas fitoquímicas con la planta de *Cuphea aequipetala*. Es importante destacar que el resultado positivo a las pruebas ayuda a generar

la teoría de que, a mayor cantidad de compuestos presentes en la planta, mayor puede ser la velocidad de reducción y estabilización de Au, para formar nanomateriales, sustentada por el corto periodo de tiempo (2 min) en el que el extracto de *C. aequipetala* genera las nanopartículas esféricas con tamaños menores a 20 nm.

Tabla 4. 2 Resultados cualitativos de las pruebas de identificación de diversos metabolitos.

Prueba Cualitativa	Compuesto	Resultado
a) Liebermann-Buchard	Esteroles	Positivo
b) Permanganato de Potasio	Compuestos etilénicos,	Positivo
c) Espuma	Saponinas	Positivo
d) Shinoda	Flavonoides con grupos benzopirona	Positivo
e) Cloruro Férrico	Taninos	Positivo

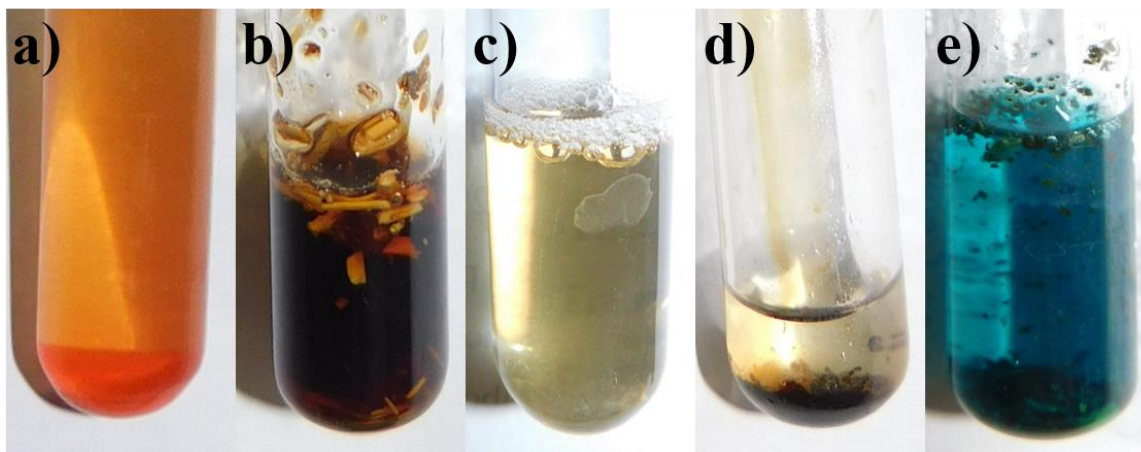


Figura 4. 1 Imágenes de resultados positivos ante las pruebas fitoquímicas en el extracto de la planta *Cuphea aequipetala*, a) prueba Liebermann-Buchard (precipitado rojo), b) prueba con Permanganato de potasio (Decoloración del reactivo añadido), c) prueba de Espuma (formación de espuma permanente), d) prueba Shinoda (formación de precipitado) y e) prueba con Cloruro Férrico (generación de precipitado).

4.2 Síntesis de nanopartículas de Au mediante el extracto de la planta *Cuphea aequipetala*

4.2.1 Espectroscopía de Ultravioleta-Visible

En esta parte experimental se realizó la síntesis de nanopartículas de oro, para la cual se preparó el extracto de *C. aequipetala* a una concentración de 0.02 g/ml y la solución de ácido tetracloroáurico utilizada a una concentración de 5 mM en una relación volumétrica de 1:1 respectivamente. A partir de 3 ml de muestra de ambos precursores, el primer indicativo de una síntesis efectiva es el cambio de color del café claro a morado característico de la formación de estructuras nanométricas, debido a la excitación relacionada a los electrones libres del oro (Figura 4.2).



Figura 4. 2 Cambio de color en el proceso de síntesis de las AuNps utilizando una relación 1:1 y 6 mL de solución.

Cabe destacar que la síntesis de nanopartículas de oro se realizó en un tiempo aproximado de 1 min, lo cual resulta en un proceso de reducción muy rápido, en comparación con los obtenidos previamente en el grupo de trabajo, es importante señalar que se revisó la literatura sin encontrar indicios de síntesis verde no híbrida que efectúe alguna reacción con esta velocidad de producción de nanomateriales, siendo así una ventaja totalmente novedosa y efectiva.

Aprovechando este resultado, se realizó la cinética de reacción desde 0 segundos (sin agitación de los componentes precursores) hasta 30 segundos, en donde se presenta un pico de plasmón superficial entre los 500 y 600 nm, siendo este característico del oro sólido nanométrico (Figura 4.3 a). Se observa también que a medida que aumenta el tiempo el pico máximo se incrementa en intensidad lo que sugiere un aumento de la concentración de las

nanopartículas sintetizadas, con un ensanchamiento de las bandas muy similar lo que indica morfologías similares en cuanto al tamaño.

Ya confirmada la síntesis de AuNPs por medio del cambio de color, y la aparición del pico de plasmón en el espectro de UV-Vis, seguida de la purificación de las nanopartículas, se partió de 1 ml de nanopartículas libres de extracto de *C. aequipetala* (dispersadas en agua desionizada), de acuerdo a lo reportado por Kitching y Co.[51]. Se adicionó rosa de bengala a una concentración de 20 mM, añadiendo 1 ml de colorante por minuto durante 15 min, generando así un volumen total de muestra de 16 ml. La figura 4.3b presenta, las bandas con doubles picos característicos de la rosa de bengala haciendo alusión a que se encuentra cubriendo la superficie de las nanopartículas conforme se aumenta la cantidad de colorante, hasta el grado de la desaparición del pico característico del metal oro. De la cual se determinó que aproximadamente a los 5 ml se obtiene una banda intermedia donde aún se aprecia el pico de oro y una banda respectiva al colorante en dicho volumen añadido cercana a los 520 nm, sin llegar a ser totalmente invasiva como se aprecia en el pico donde se adicionaron 15 ml de colorante, determinando así el volumen aparentemente óptimo para cubrir la superficie de los nanomateriales y utilizarse en pruebas biológicas.

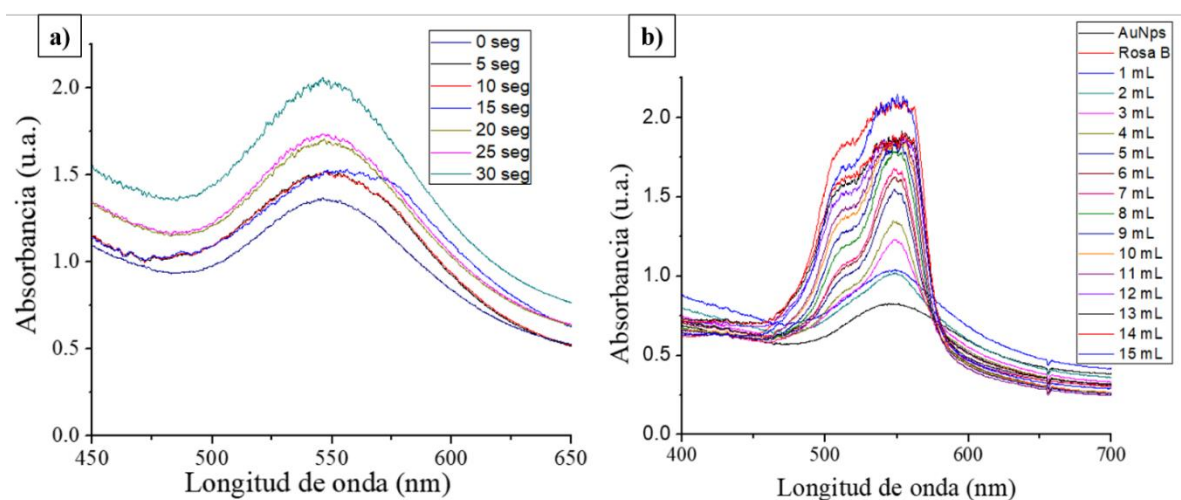


Figura 4. 3 Espectros de UV-Vis de a) nanopartículas de oro sintetizadas y b) AuNPs con diferente volumen de Rosa de bengala en su superficie.

4.2.2 Espectroscopía de Infrarrojo

Esta técnica es una alternativa eficaz para conocer los compuestos orgánicos presentes en las muestras, en nuestro caso utilizamos esta prueba para conocer los grupos funcionales que contiene el extracto de la planta, los cuales están involucrados en la síntesis de las nanopartículas con base a la aparición o eliminación bandas en el espectro de infrarrojo, para así mismo después lograr establecer mecanismos de formación de las nanopartículas de oro. Para realizar este método, es necesario secar el polvo de la planta pulverizada, extracto de la planta, el residuo de la planta posterior a la síntesis y la muestra con nanopartículas de oro purificadas, para eliminar la presencia de agua y otros componentes que puedan generar ruido en el espectro, los cuales interfieran el análisis de los componentes funcionales, además la presencia de humedad en el equipo de infrarrojo genera un mal funcionamiento del mismo, cabe destacar, que ésta prueba se realizó a una humedad específica de 37.5% y una temperatura de 25.4 °C.

La figura 4.4 nos muestra el espectro de infrarrojo del extracto de *Cuphea aequipetala* (banda de color azul), en el cual logramos apreciar absorciones características de ciertos grupos funcionales con los enlaces y números de onda correspondientes, de lado izquierdo comenzamos con la presencia de una banda con número de onda de 3490 cm^{-1} la cual se atribuye a las vibraciones que sufre el enlace O-H de los alcoholes debido a un estiramiento del mismo. La siguiente banda ubicada en 2922 cm^{-1} corresponde también a un estiramiento del enlace de los alcanos (C-H), siendo este del metileno. En tercer lugar, tenemos la banda de 1730 cm^{-1} generada por tensión de grupos aromáticos con enlace C=C, esta banda al estar ligeramente cercana a los 1600 cm^{-1} representan un núcleo bencénico. El siguiente pico en 1400 cm^{-1} corresponde a la flexión de los grupos con enlace C-N, en la banda de 1160 cm^{-1} encontramos la aparición de enlaces de C-C respectivo a carburos. La banda con número de onda 1040 cm^{-1} del enlace C-O corresponde a los ácidos carboxílicos y finalmente, tenemos la presencia de una banda de 650 cm^{-1} que se atribuye a los compuestos halogenuros que en este caso pertenecen a la unión C-Cl.

La misma figura presenta el espectro de las nanopartículas de oro purificadas, en el cual logramos apreciar diversos enlaces correspondientes a grupos funcionales que disminuyeron su presencia en las bandas de transmitancia por la acción de estos mismos en la síntesis y

estabilización de las nanopartículas. Al igual que el espectro del extracto de la planta, se distingue la presencia de la banda por vibraciones de estiramiento del enlace correspondiente a O-H el cual, se desplaza a un mayor número de onda siendo este 3431 cm^{-1} . En la región del grupo metileno antes mencionado se observa la desaparición del mismo teniendo una tensión débil en 2323 cm^{-1} , en seguida se aprecia el pico correspondiente a un grupo con compuestos aromáticos con un número de onda de 1650 cm^{-1} , el cual se observa disminuido y desplazado ligeramente hacia menores longitudes de onda con respecto al extracto puro, teniendo en cuenta que este se encuentra cercano a los 1600 cm^{-1} confirmando la existencia de algún anillo bencénico. El enlace N-O con la banda de 1377 cm^{-1} corresponde aun a los grupos nitro observándose una disminución de esta banda a comparación del espectro anterior, en la banda de 1156 cm^{-1} encontramos la aparición de enlaces de C-C, corrida a la derecha correspondiente a carburos, el siguiente enlace corresponde a los grupos carboxilo con un número de onda de 1049 cm^{-1} , el cual se recorrió hacia longitudes mayores y por último tenemos la presencia de los grupos halogenados los cuales presentan un enlace C-Cl con número de onda de 657 cm^{-1} . En general se logra observar en todos los compuestos una baja intensidad, que se asocia a la desaparición de los mismos debido a que se encuentran involucrados en la síntesis de las nanopartículas de oro, afirmando de esta manera la presencia de los diversos flavonoides y derivados cumarínicos identificados en investigaciones por Sánchez y Co. [68]. Por otra parte, se distingue también en dicha figura que el espectro de la planta molida presenta un comportamiento similar en cuanto a los componentes orgánicos, siendo la diferencia más significativa en la banda de O-H, la cual está totalmente asociada con que el polvo de la planta se disolvió en agua para llevar a cabo la síntesis del nanomaterial.

4.2.3 Difracción de Rayos X

Para la realización de esta técnica es necesario contar con muestras secas, para lo cual se colocaron el extracto de *Cuphea aequipetala* y las nanopartículas de oro (purificadas) en vidrios de reloj, para posteriormente introducirse en un horno a 50°C por alrededor de 12 h, la recolección del polvo de las nanopartículas debe realizarse rápidamente mediante raspadura de la superficie del vidrio de reloj con espátula metálica porque son susceptibles a tomar humedad del ambiente. La figura 4.5 muestra en el apartado a) el patrón de difracción

de rayos X del polvo de la planta en la cual se aprecia que no tiene estructuras significativas que permanezcan presentes en el difractograma de las nanopartículas, por otra parte en el apartado b), se distingue el patrón de difracción característico de oro nanométrico con 5 picos de difracción a 37° , 44.5° , 64.8° y 77.4° los cuales se atribuyen a los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1) respectivamente, de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés) de los cristales de oro (JCPDS #03-065-28-70). Por lo que se afirma la presencia de oro sólido. A partir del semiancho del pico principal y la altura media se calculó mediante la ecuación de Debye-Scherrer el tamaño promedio de cristal siendo éste de 18 nm; por otra parte, se aprecia que no se encuentran picos no señalados significativos pertenecientes al material orgánico que se encuentran en la superficie de las nanopartículas o de impurezas que podrían acompañar a la planta. Esto atribuido gracias a que se realizaron 4 lavados exhaustivos, siendo estos de 12000 rpm efectuados durante 10 min, retirando el sobrenadante y adicionando nuevamente agua desionizada y revisando cada paso del proceso mediante espectroscopía UV-Vis. Por otra parte, el patrón de DRX presentado por Deepika y Co. [69] en sus resultados obtenidos mediante extracto del fruto dragón (agente reductor y estabilizador) y ácido tetracloroáurico (agente precursor), mostró picos de difracción característicos de oro, con la estructura cristalina FCC.

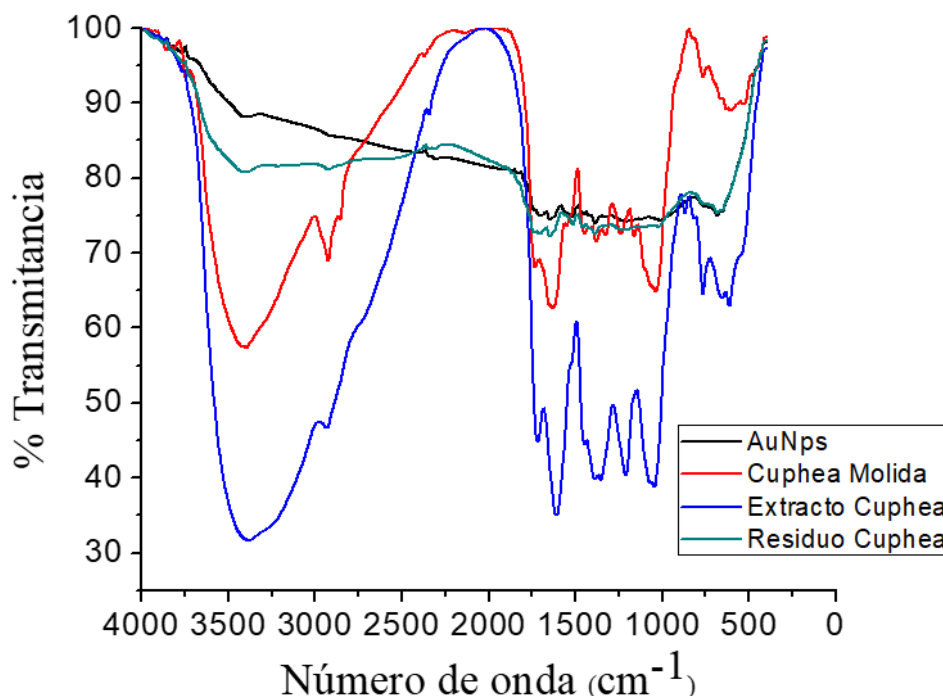


Figura 4. 4 Espectro de IR de las AuNps, *C. aequipetala* molida, extracto de la planta y residuo de síntesis.

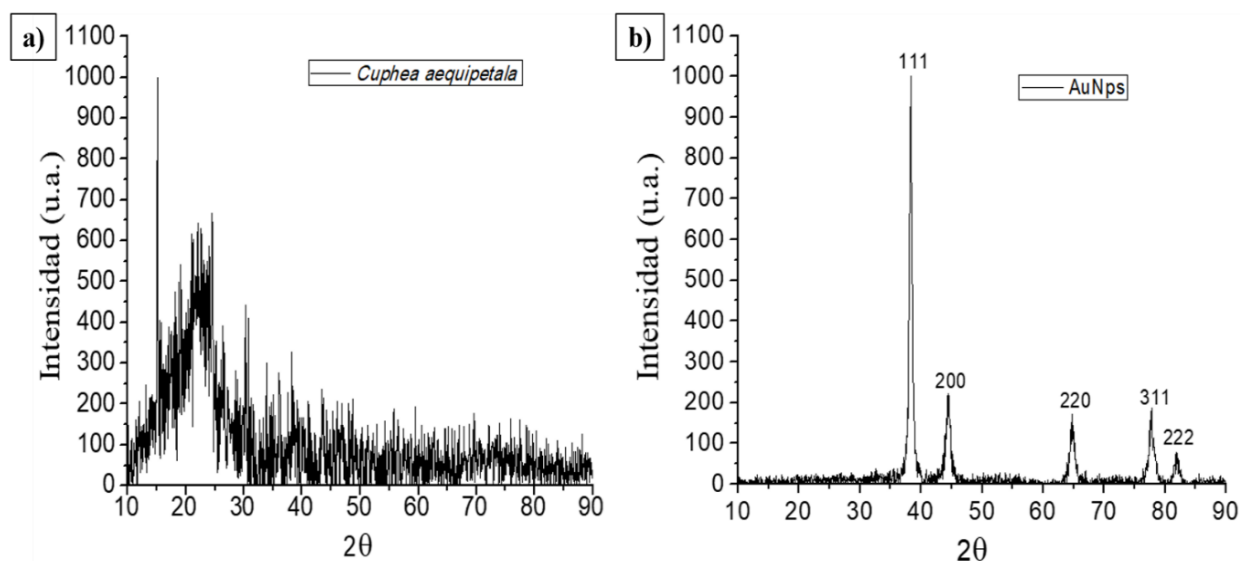


Figura 4. 5 Difractograma de RX, a) extracto de *C. aequipetala* y b) AuNps.

4.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido

Dados los resultados afirmativos de la síntesis de nanopartículas de oro (solución de oro a 5 mM y 0.02 g/ml de extracto en una relación volumétrica 1:1 respectivamente) por medio de las técnicas anteriormente descritas, se procedió a caracterizar mediante MEB arrojando los siguientes resultados.

La figura 4.6 presenta las micrografías de barrido; en los apartados a-c) de menor a mayor amplificación, observando que las nanopartículas se encuentran libres, es decir, nulamente agregadas en el extracto demostrando que la planta contiene las sustancias orgánicas adecuadas para estabilizar las AuNPs, se aprecia también que las NPs tienen un tamaño en general menor a los 20 nm, se distingue una polidispersividad de tamaños, no obstante, presentando homogeneidad en forma principalmente esférica, debido a la gran cantidad de tensoactivos que permiten estabilizarlas, los cuales se unen a su alrededor y no permiten que su núcleo crezca de manera acelerada desde el ion reducido, controlando así las morfologías y tamaños de las mismas, también se determina que dadas a las condiciones usadas de síntesis se obtuvo una gran cantidad de nanopartículas. Por otra parte, en el apartado d) se presenta el análisis químico elemental demostrando que las estructuras sintetizadas pertenecen a oro ya que se tiene una mayor intensidad de este elemento comparado con el O, Cl y C (residuales de la síntesis).

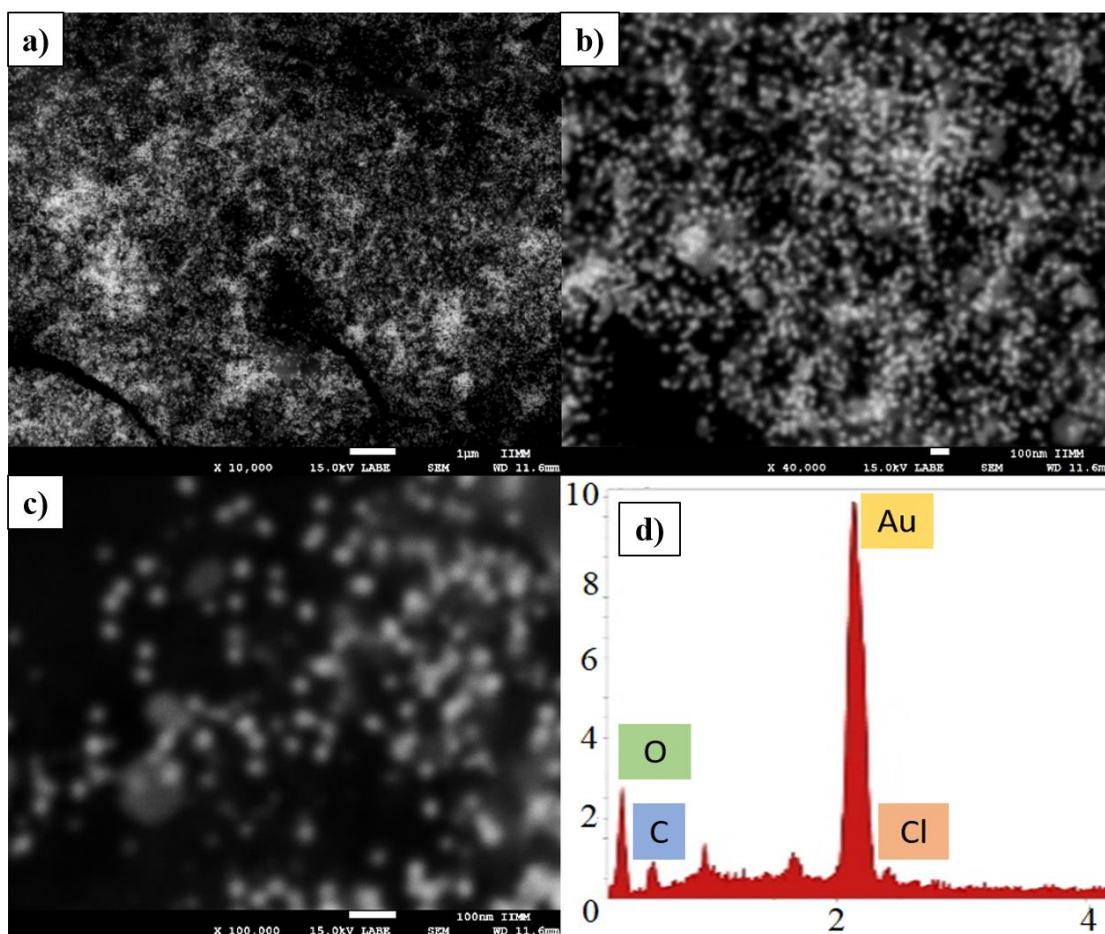


Figura 4. 6 Micrografías electrónicas de barrido de las AuNPs, a) mayor amplificación (1 μm), b-c) menor amplificación (100 nm) y d) análisis químico elemental (EDS).

Analizando las morfologías de las nanopartículas sintetizadas en el presente trabajo con aquellas obtenidas por Rajan y Co. [70], ellos producen formas triangulares truncas y semiesféricas, las cuales aplican en levaduras y bacterias como lo son *S.aureus*, *E.coli* y *P.aeruginosa*; por otra parte colocan nanopartículas en el medio de crecimiento de las líneas de cancer Hella a diferentes concentraciones, empleando un tamaño de 15.2 nm, sugiriendo que a menor tamaño será más efectivo el daño a las células, por lo cual, la hipótesis de aplicar las nanopartículas obtenidas por *Cuphea aequipetala* en células de cancer resulta ser una posibilidad factible. Por otra parte, una de las metas importantes de éste trabajo es colocar los nanomateriales y colocarles alguna sustancia en la superficie la cual permita su detección en el cuerpo humano y en específico en el sitio de acción, por esta razón se adicionó Rosa de bengala, aumentando el volumen con el paso de los minutos, lo que se ve reflejado en la figura 4.7, donde apreciamos que en el apartado a) solamente se incorporó a las

nanopartículas 1 ml de colorante, permitiendo que se vean poco agregadas unas con otras en la Rosa de bengala, en el apartado b) solamente se adicionaron 5 ml, que en dicha micrografía se logra apreciar la diferencia de contraste con algunas partes en color gris correspondientes al colorante, en el inciso c) las nanopartículas con 8 ml de volumen perteneciente al colorante, se encuentran agregadas en cúmulos y la fase orgánica es más notoria que en los volúmenes anteriores denotando que 8 ml es demasiado colorante, finalmente en el apartado y correspondiendo a la secuencia ya mencionada con el aumento de volumen encontramos que 15 ml de rosa de bengala agregan la solución, a tal grado que ya no se distinguen las nanopartículas y solo podemos observar un contraste perteneciente al colorante y que todos esos nanomateriales quedaron inmersos en la fase orgánica, por lo que se descarta visualmente el uso de ese volumen, corroborando lo que se apreció en el espectro de UV-Vis.

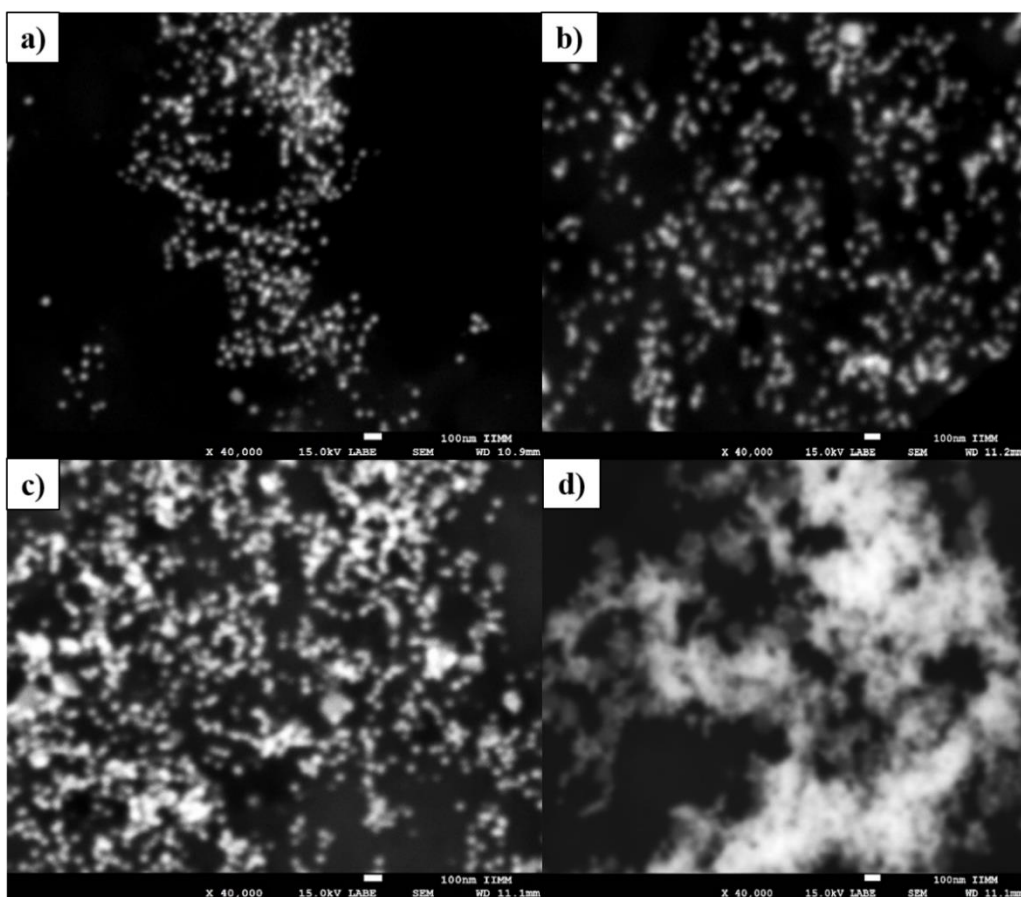


Figura 4. 7 Micrografías de AuNPs y Rosa de bengala a) 1 ml, b) 5 ml, c) 8 ml y d) 15 ml.

4.2.5 Microscopía Electrónica de Transmisión

Ahora bien, esta técnica permite tener una mejor apreciación de los nanomateriales sintetizados, por lo que en la figura 4.8 en los apartados a y b) se presentan las micrografías mostrando que las nanopartículas tienen un crecimiento de múltiple maclado y con tamaños aproximadamente menores a 25 nm, semiesféricas en su mayoría, lo cual se controló evitando la incidencia de luz solar y manteniendo la temperatura de almacenamiento posterior a la síntesis de 4°C. Una de las diversas ventajas del proceso de síntesis mediante *Cuphea aequipetala* es que genera muchos núcleos con los cuales las nanopartículas pueden crecer de manera acelerada, controlando las morfologías debido a los agentes surfactantes del extracto, los cuales permiten que se tenga la cantidad necesaria de sustancias orgánicas superficiales para poder utilizarse la relación volumétrica de 1:1 respectiva a extracto sal precursora de oro, cuyas concentraciones son relativamente bajas, lo cual se ha realizado pocas veces en el presente grupo de trabajo.

En la misma figura 4.8 en el apartado c) se presenta un patrón de difracción de electrones tomado directamente del equipo, el cual pertenece a oro nanométrico de una sola partícula, observándose puntos característicos de un monocristal, por otra parte, en el apartado d) se enfocó una nanopartícula para realizar la técnica de alta resolución de la misma (cuya forma tiende a ser esférica) la cual se muestra en el apartado e), distinguiendo perfectamente las distancias interplanares del elemento oro siendo esta de 2.36 Å (denotado entre líneas), que se obtuvo mediante la transformada rápida de Fourier de las familias de planos [111] del apartado f), correspondientes a la estructura cristalina cúbica centrada en las caras.

Comparativamente se encontró en la literatura el uso del método por síntesis verde de nanopartículas de oro, por Hamelian y Co. [71], donde analizan mediante MET los materiales sintetizados, a partir del extracto de *Pistacia Atlántica* (10 ml para proceso de síntesis, a una concentración de 0.03 g/ml) con solución de ácido tetracloroáurico (100 ml de volumen utilizado, a una concentración de 1 mM) a temperatura ambiente con relación volumétrica 1:30 respectivamente, lo cual indicó una distribución homogénea de las mismas en un rango de diámetro entre los 40 a 50 nm con forma poco simétrica con tendencia semiesférica.

Cabe destacar que indican nanopartículas de oro más grandes debido a la coalescencia de algunas más pequeñas. Sin embargo, el resultado obtenido en el presente trabajo indica ventajas en cuanto a volumen utilizado, concentración utilizada de extracto y morfologías poco diversas y de tamaños menores a 25 nm. Este tamaño obtenido es útil para las aplicaciones que se pretenden realizar en este trabajo.

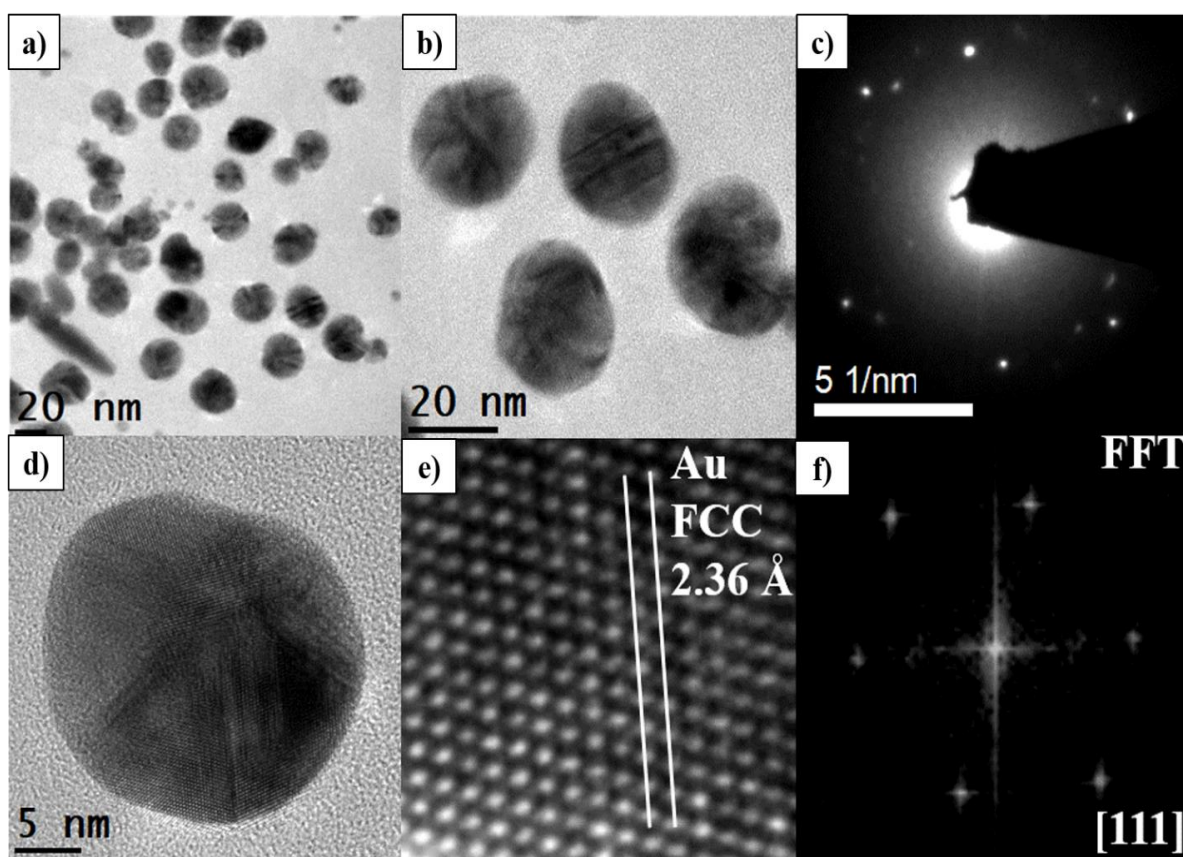


Figura 4. 8 Micrografías electrónicas de transmisión de las AuNps a-b y d) campo claro, c) patrón de difracción de electrones, e) alta resolución y f) transformada rápida de Fourier.

4.2.6 Análisis del Potencial Z de nanopartículas de Au recubiertas de rosa de bengala.

El análisis de comportamiento eléctrico de las nanopartículas nos ayuda a comprender que tan estables pueden ser los nanomateriales sintetizados en suspensiones coloidales, para lo cual se analizó el potencial Z, la movilidad y la conductividad de las muestras de nanopartículas de Au individuales sin centrifugar (AuNpsSC), AuNps centrifugadas

(AuNpsC) y AuNps con recubrimiento de 5 ml de rosa de bengala a 20 mM (AuNpsRB)*, generando resultados destacables los cuales se condensan en la tabla 4.3.

Tabla 4. 3 Resultados del análisis del potencial Z de las nanopartículas de oro.

Muestras	Potencial Z (mV)	Movilidad ($\mu\text{mcm/Vs}$)	Conductividad (mS/cm)
AuNpsSC	-16.266	-1.081	1.163
AuNpsC	-23.766	-1.582	0.140
AuNpsRB	-38.233	-2.574	0.054

*Se utilizaron 750 μL de cada muestra.

De acuerdo con la literatura (Pate y Co. [58]), un nanomaterial es moderadamente estable conforme se acerca a un valor de potencial Z absoluto $|30|$ (incluyendo los valores negativos y positivos), inestable en valores de 0 a $|5|$ representando agregación rápida y la buena estabilidad tiene valores entre $|40|$ y $|60|$ [58]. Una vez mencionado esto, se aprecia que las nanopartículas sin centrifugar, es decir la que contenía residuos de síntesis presenta un valor que se puede considerar como estabilidad incipiente, las nanopartículas centrifugadas y purificadas muestran valores cercanos a la estabilidad moderada, sin embargo, las nanopartículas con cubierta de rosa de bengala arrojan un resultado de buena estabilidad para la muestra que contenía 8 ml de rosa de bengala, mostrando un potencial Z de -36.23 mV. Por otra parte, se determina que las nanopartículas de oro tienden a agregarse si se añade más de ese volumen de colorante, desarrollando inestabilidad, de acuerdo a lo observado mediante MEB. Cabe destacar que se realizaron estas pruebas por triplicado se analizaron a una temperatura de 25.1 °C. Por otra parte, también se incluyen los valores de movilidad electroforética y conductividad, con los cuales el equipo calcula el valor de potencial Z mediante diversas teorías incluida la de Helmholtz-Smoluchowski [72].

Añadiendo estos valores en la figura 4.9 respectiva a estabilidad encontramos que al pH de 7.4 (valor que se eligió para entrar en el rango donde se podría dar la estabilidad o inestabilidad sin inferir en algún valor propiciado por el pH, pudo haberse escogido también el valor de 3.8 de pH), las nanopartículas de oro con 5 ml rosa de bengala entran perfectamente en el rango de estabilidad, que concuerda con la literatura que indica que si una partícula se mide a pH básico los resultados deben estar en el rango negativo. Por otra

parte, se demuestra que las partículas se encuentran estéricamente protegidas, que impide la agregación y por lo que, las cargas de atracción se ven limitadas por esa capa de moléculas de rosa de bengala en la superficie de las nanopartículas. Igualmente refleja, que se disminuyeron significativamente los iones remanentes de síntesis, así la doble capa externa de las nanopartículas no se comprime y las nanopartículas no se agregan unas con otras. Por último, se comparan los resultados obtenidos con Lee y Co. [73] quienes sintetizaron AuNPs mediante el extracto del fruto *Garcinia mangostana*, con un tamaño promedio de 32.9 nm y obteniendo un valor de potencial Z de -20.82 mV siendo inferior al del presente trabajo haciéndolas menos estables.

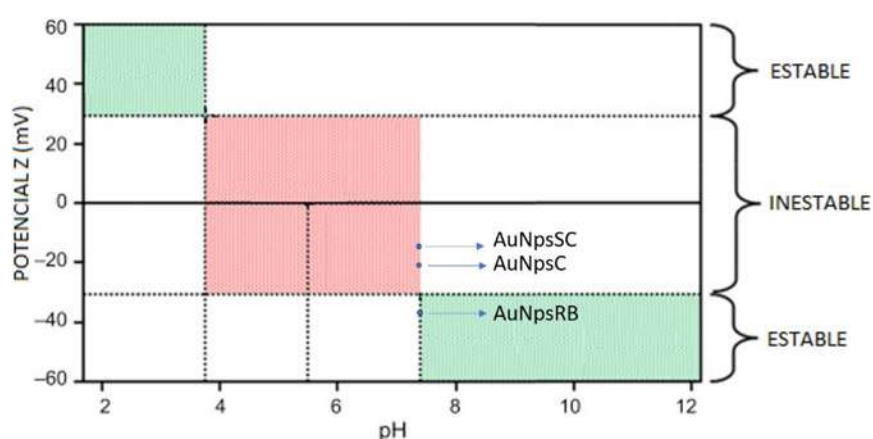


Figura 4. 9 Gráfica de estabilidad de materiales en coloide dependientes del pH [9].

4.2.7 Pruebas antibacteriales con AuNps

El ensayo cualitativo que se realizó fue el de difusión de disco siguiendo la metodología de Kirby-Bauer, el cual consistió en la impregnación de discos de papel filtro previamente esterilizados con las muestras de estudio (el disco se impregna con 30 μ L, aproximadamente). La Figura 4.10 (a-b) presenta el resultado de colocar papeles impregnados con solución de H₂AuCl₄ (5 mM), extracto de *Cuphea aequipetala* (0.02 g/ml), AuNpsSC (sin centrifugar, 980 ppm) y AuNpsC (centrifugadas, 980 ppm) en las cepas de *E. coli* y *S. aureus*. La sal precursora de Au fue elegida como control, debido a que es una solución ácida con iones Au³⁺ y se esperaba que tuvieran efecto sobre las cepas. Cabe destacar que se utilizó esa concentración de nanomaterial porque es la cantidad de nanopartículas totales que se sintetizan con el extracto de *Cuphea aequipetala*.

En dicha figura se observa la formación de un halo de inhibición para la muestra con solución precursora de oro, apartado a) respectivo a la cepa *E. coli*, el cual se midió determinando un diámetro de 13 mm. Observando las demás muestras en esa caja de Petri, se distingue la nula aparición de algún halo de inhibición. Este resultado podría asociarse a la demasiada cantidad de iones de la solución precursora que no permiten el crecimiento de la sepa en el medio de cultivo, por otra parte, podría reflejar que la cantidad de nanomaterial es muy poco para tener efecto sobre la cepa o bien, que las nanopartículas no tienen efecto antibacterial lo cual estaría de acuerdo con la literatura [74]. Sin embargo, se tomó la decisión de analizar concentraciones más bajas ya que existe la posibilidad de que el nanomaterial interactúe con la célula bacteriana uniéndose a la superficie celular y causando daño estructural, reduciendo la actividad de las enzimas, alterando las funciones vitales de la célula y finalmente conduciendo a la muerte celular, como lo indican así ciertos autores en la literatura utilizando nanopartículas de Au con tamaño de 14.5 nm [75]. Pocos estudios demostraron que nanopartículas de oro ultrapequeñas (2 nm) exhiban una actividad bactericida mejorada en comparación con las nanopartículas de mayor tamaño a la misma concentración, generando actividad de desequilibrio metabólico que indujo la producción intracelular de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) y que confiere la muerte microbiana [76]. En ese mismo disco analizando la concentración de extracto se aprecia que no generó inhibición a las bacterias, esto quizá debido a la cantidad de azúcares, que pueden propiciar el crecimiento de las bacterias de *E. coli*.

Por otro lado, en la Figura 4.10 b), se identificó que las nanopartículas siguen sin tener efecto alguno sobre las bacterias, principalmente en *S. aureus*, sin embargo, algo interesante es que el halo de inhibición de la sal precursora es de 7.5 mm, diámetro inferior al que se obtuvo por medio de *E. coli* y a su vez del halo de inhibición parcial del extracto, lo que significa que en el caso de *S. aureus*, se presenta mayor sensibilidad a los agentes del extracto pero menor a la cantidad de iones, en comparación con la cepa *E. coli*. Se ha demostrado en la literatura que *S. aureus*, se ve afectada por acción de azúcares como sacarosa y glucosa, mientras que *Escherichia Coli* acepta un nivel más alto de estos compuestos. Se sabe que *Escherichia coli*, es una bacteria gram negativa que contiene una membrana citoplasmática, membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico, constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas

ambientales relativamente elevadas, sin embargo, *Staphylococcus aureus*, es una bacteria gram positiva, con una pared celular interna sin espacio periplásmico, lo cual significa mayor susceptibilidad a la exposición de diferentes sustancias.

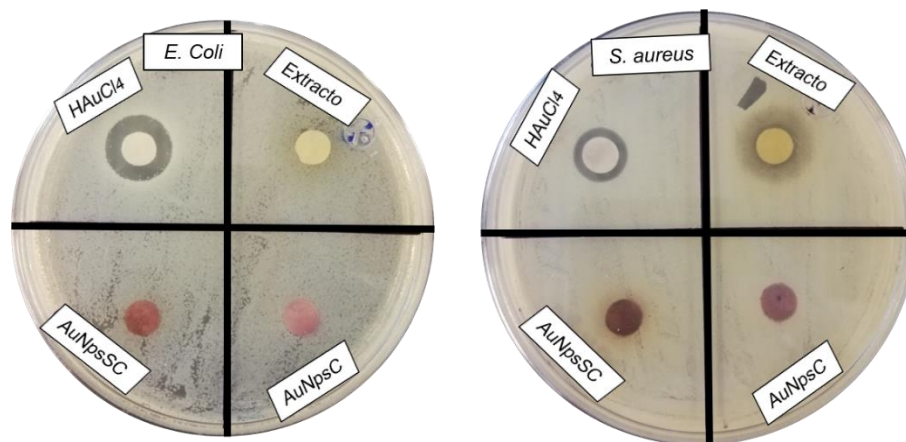


Figura 4. 10 Resultados de la prueba antibacterial en a) *E. coli* y b) *S. aureus*.

Por otro lado, la Figura 4.11 (a-c) ilustra el ensayo correspondiente al extracto, solución de oro y nanopartículas de oro centrifugadas en la cepa *E. coli* (se decidió no analizar la mezcla original de extracto y nanopartículas ya que no mostraron efecto significativo en la prueba anterior). En esta evaluación antibacterial se aprecia que, a concentraciones bajas, ni el extracto ni las AuNpsC tuvieron efecto antimicrobiano, sin embargo, para la solución precursora de Au, se aprecia que a medida que disminuye la concentración en ppm también disminuye el halo de inhibición, siendo de 11.5 mm para 400 ppm, 7 mm para 150 ppm, 4 mm para 50 ppm y nulo para 1 ppm, lo cual significa que solo se ve afectada a una concentración alta de iones que sobresaturan la permeabilidad de la bacteria y le causan muerte celular.

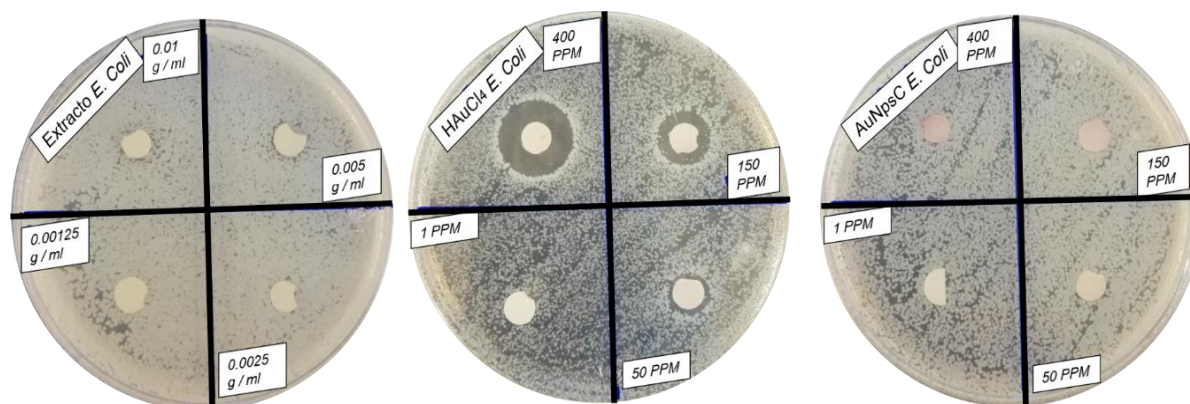


Figura 4. 11 Evaluación mediante método de difusión de disco en bacterias *E. coli* para a) extracto de *Cuphea aequipetala*, b) HAuCl_4 y c) AuNpsC.

Finalmente se presenta en la Figura 4.12 (a-c), el resultado para las muestras de extracto, solución precursora y AuNpsC en los discos con bacteria de *S. aureus*, para las concentraciones de 400, 150, 50 y 1 ppm. Se aprecia que, para las nanopartículas de oro no hubo efecto bactericida en ninguna concentración. Para la solución precursora de oro, hubo efecto bactericida para la concentración de 400 ppm mostrando un halo de inhibición de 5.5 mm y para el extracto se distinguieron halos de inhibición parcial para 400 ppm de 10 mm, para 150 ppm de 6 mm, para 50 ppm de 4 mm y para 1 ppm no se refleja ningún efecto antibacterial.

Cabe destacar que todas las pruebas se realizaron por triplicado para tener confiabilidad de los resultados. En general a medida que se disminuyó la concentración de las muestras analizadas en ambas cepas bacterianas se aprecia que no hubo cambios sobresalientes, sin embargo, un dato interesante sería analizar a futuro que es lo que sucede con las inhibiciones parciales del extracto, quizá la cantidad de sustancias que la podrían inhibir totalmente no es suficiente para evitar su crecimiento y por eso solo hay pocos crecimientos de la cepa generando las inhibiciones parciales. No obstante, es común ver reportado que no hay un efecto antibacterial cuando se utilizan nanopartículas de oro (cita).

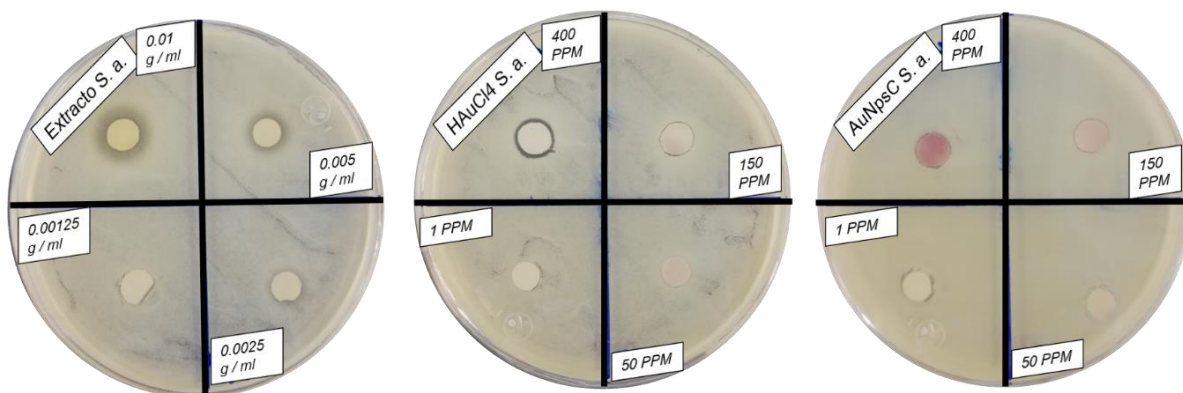


Figura 4. 12 Resultados de la evaluación de a) extracto, b) HAuCl₄ y c) AuNpsC en *S. aureus*.

4.2.8 Análisis de Nanomateriales fluorescentes en Microscopio Confocal

En este estudio es importante destacar que el punto de interés fue conocer si la fluorescencia emitida por los nanomateriales de oro sería detectable en el microscopio confocal multifotónico para lo cual, se adicionaron separadamente en portamuestras: una gota de extracto de *Cuphea aequipetala* (control negativo), células de cáncer de cérvix (HeLa) teñidas con colorante fluorescente Dapi (exclusiva para núcleos), AuNps y finalmente una

mezcla de AuNps con medio de cultivo y células HeLa teñidas. Las muestras se analizaron a 25X con un láser camaleón mediante excitación de 600 a 660 nm por un tiempo de incidencia de 3 min sobre las muestras.

En la figura 4.13 se muestran las imágenes correspondientes a campo claro de la observación directa (a) y el campo oscuro donde se obtienen las señales de fluorescencia (b), sin embargo, como es notable no se tuvieron señales del extracto de *Cuphea aequipetala* lo que significa que no es un extracto fluorescente, dicho resultado ya se esperaba de esta forma por lo cual es un control negativo en una longitud de onda de 609 nm.

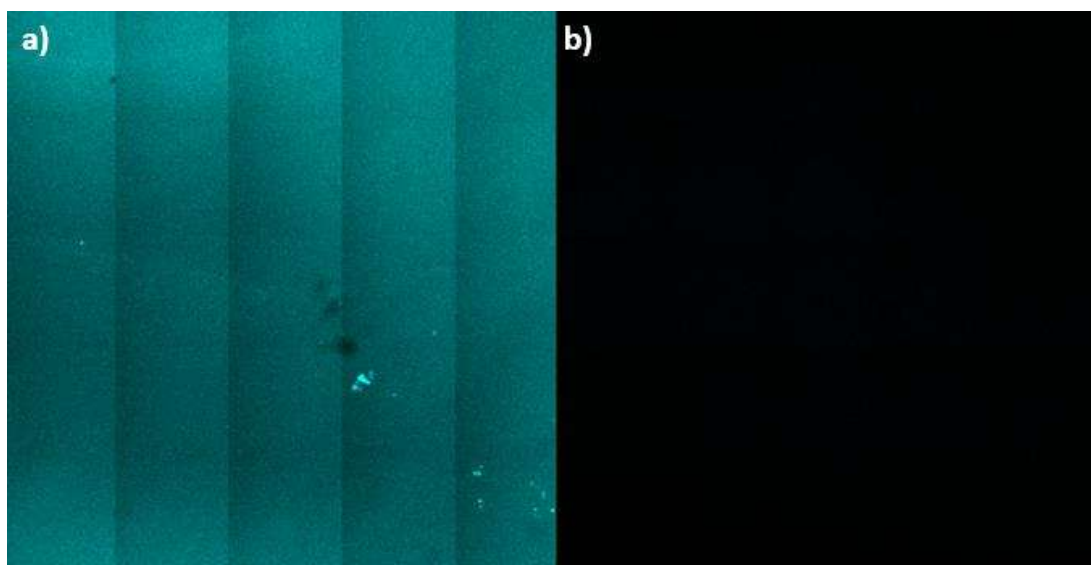


Figura 4. 13 Campo claro de observación directa a) y campo oscuro donde se obtendrían señales de fluorescencia b) del extracto de *Cuphea aequipetala*.

En la figura 4.14 se aprecia que las células de cáncer de cervix fueron teñidas en los núcleos efectivamente, ya que de toda su estructura celular lo único que fluórese es ese organelo (apartado a), emitiendo en una longitud de onda de 612 nm. El apartado b) corresponde al campo claro de observación directa, donde apenas se aprecia que ahí están las líneas celulares confluentes y con estructura alargada. Finalmente, en el apartado c) se analizaron las células a 606 nm para determinar si habría fluorescencia cruzada entre nanopartículas y el colorante ya que están muy cercanos en emisión, sin embargo, no se aprecia ninguna señal lo cual es efectivo para la distinción de las nanopartículas de oro.

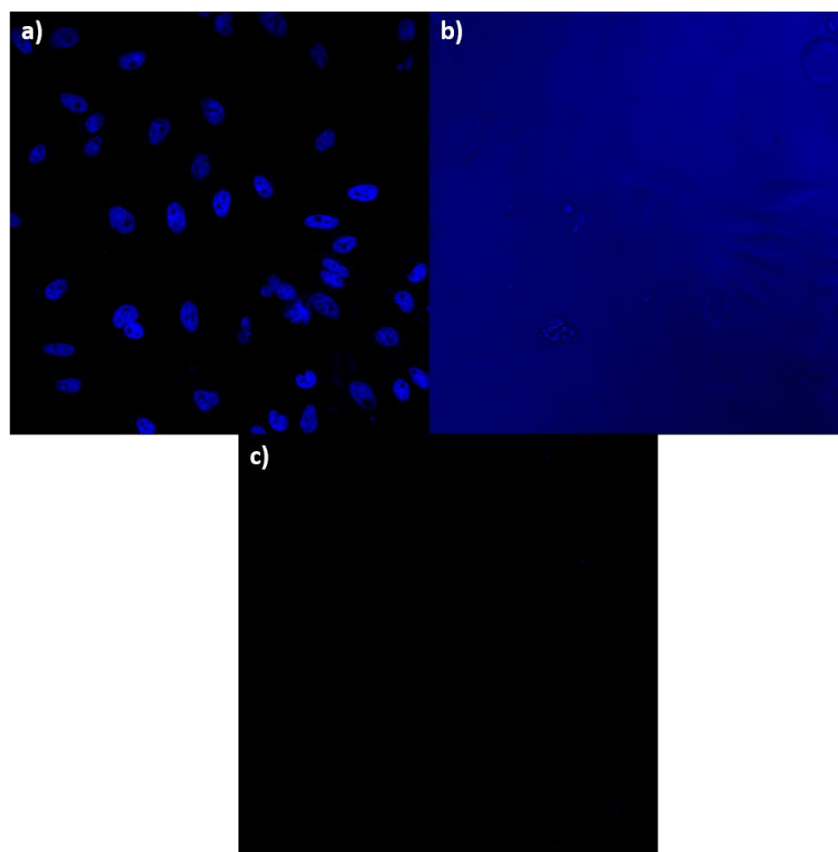


Figura 4. 14 Células de cáncer de cérvix teñidas en los núcleos apartado a), campo claro de observación celular apartado b) y campo oscuro sin señales fluorescentes apartado c).

En la figura 4.15 se puede apreciar directamente en observación de campo claro la orilla de la gota de muestra de AuNps a) y en b), las señales percibidas en el campo oscuro efectivamente corresponden a las emisiones del oro nanométrico, en una longitud de onda de excitación en 606 nm. Como ya se mencionó esta captura de imágenes fue realizada a 25X, sin embargo, se realizó un acercamiento a 40X para apreciar de mejor manera estas emisiones. En la figura 4.16 se aprecia en un acercamiento a 40X en el campo claro del apartado a) la orilla de la gota de muestra de nanopartículas de oro, en el apartado b) se distingue en el campo oscuro la efectiva emisión de la fluorescencia de las AuNps, notablemente esto es solo un proceso de observación ya que el equipo no permite detectar cuanta intensidad de fluorescencia presentan dichos nanomateriales, para lo cual se recomienda para trabajos futuros analizar las muestras en un espectrofotómetro de fluorescencia para determinar las intensidades de la emisión. En el apartado c) se distingue que los nanomateriales, al estar 3 min en irradiación con el láser ultravioleta a 606 nm,

presentan emisión de calor, representado en la figura por esos círculos huecos que significan que se tiene a su vez respuesta térmica a la irradiación. Cabe destacar, que se midió también la cantidad de calor radiante que producen los nanomateriales al ser excitados con láser ultravioleta, la literatura indica que si alcanzan 50°C será efectivo para combatir las células de cáncer.

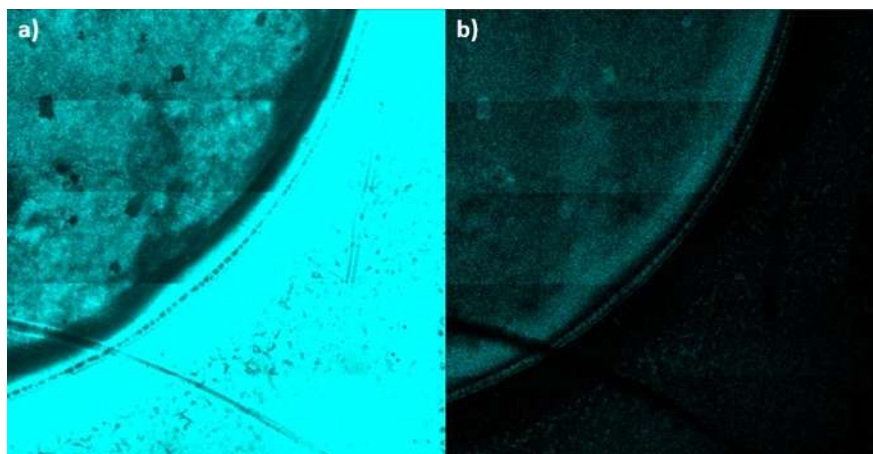


Figura 4. 15 Campo claro de la orilla de la gota de muestra de AuNps (apartado a) y emisiones del oro nanométrico en campo oscuro en el apartado b).

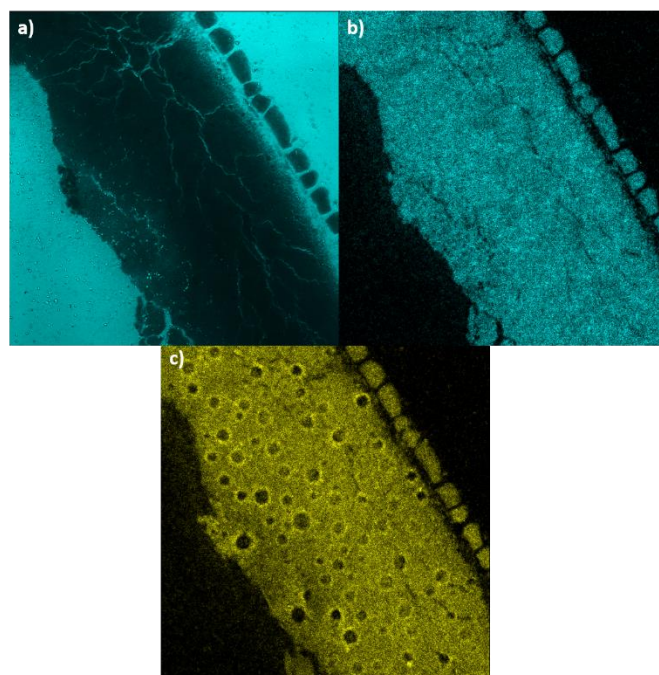


Figura 4. 16 Campo claro de la orilla de la gota de muestra de nanopartículas de oro en el apartado a), en el apartado b) se distingue en el campo oscuro la efectiva emisión de la fluorescencia de las AuNps y en el apartado c) se aprecian anillos de la radiación térmica de las AuNps.

Finalmente, en la figura 4.17 se muestra la mezcla de AuNps en el medio con las células de cáncer de cérvix (HeLa), en el apartado a) se muestran los núcleos excitados a 612 nm, en el apartado b) representa el campo directo de observación de las células como ya se mencionó con morfología alargada, en el apartado c) se hizo una filtración de la emisión de los núcleos para permitir solo el paso de la emisión de las nanopartículas de oro a 609 nm y finalmente la imagen del apartado d) muestra la suma de las emisiones de las AuNps y los núcleos celulares, demostrando que en efecto existe la presencia de las nanopartículas en las zonas donde hay células, es necesario realizar un estudio de citotoxicidad para determinar el daño que les producen las nanopartículas. El estudio térmico se realizó para determinar si en un periodo de exposición de 5 min en el láser ultravioleta, las nanopartículas son eficaces para destruir las células de cáncer.

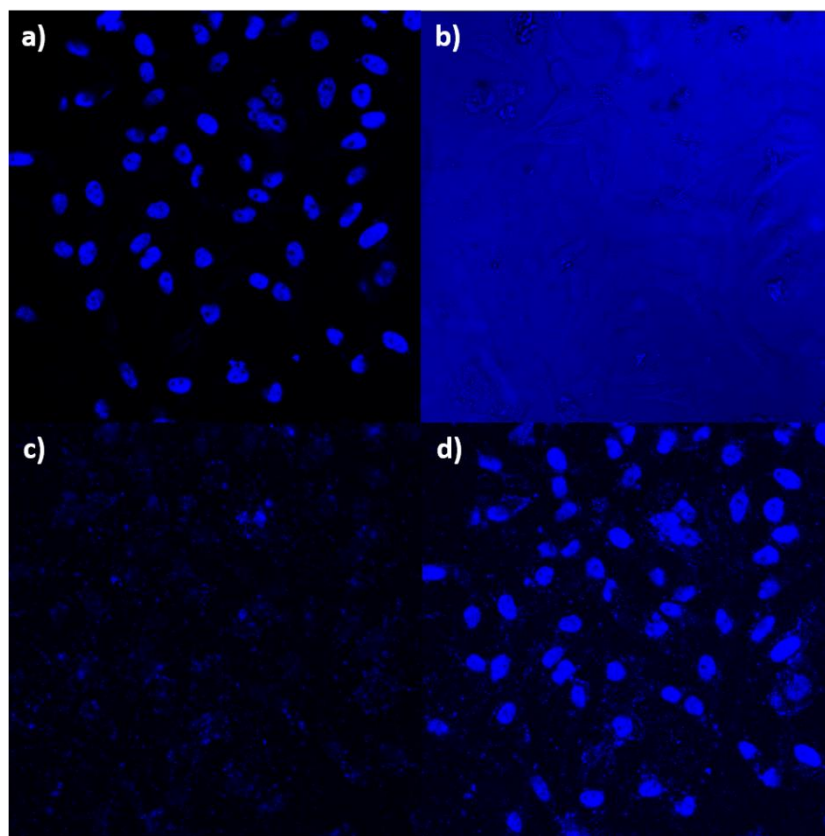


Figura 4. 17 Mezcla de AuNps en el medio con las células de cáncer de cérvix (HeLa) apartado a), campo claro de observación celular apartado b), emisión de fluorescencia de las AuNps en campo oscuro apartado c) y suma de emisiones de fluorescencia de núcleos celulares y AuNps apartado d).

La Figura 4.18 presenta en el apartado a) las células HeLa teñidas con colorante DAPI las cuales presentaron buena confluencia, se distingue también que los núcleos no se encuentran dañados, en b) se aprecia el campo claro de las células, el cual representa su observación directa en el microscopio, en el apartado c) se presentan las señales de las células HeLa con Rosa de bengala (RB), en las cuales se logra distinguir una coloración amarilla correspondiente a la fluorescencia del colorante. Finalmente, en el apartado d), se presenta la suma de todas las imágenes, apreciando que la fluorescencia de la RB se encuentra por fuera y por dentro de los núcleos de las células. Cabe destacar, que la rosa de bengala es un colorante ya probado que tiene emisión fluorescente por lo cual, era lógico esperar señales de la misma.

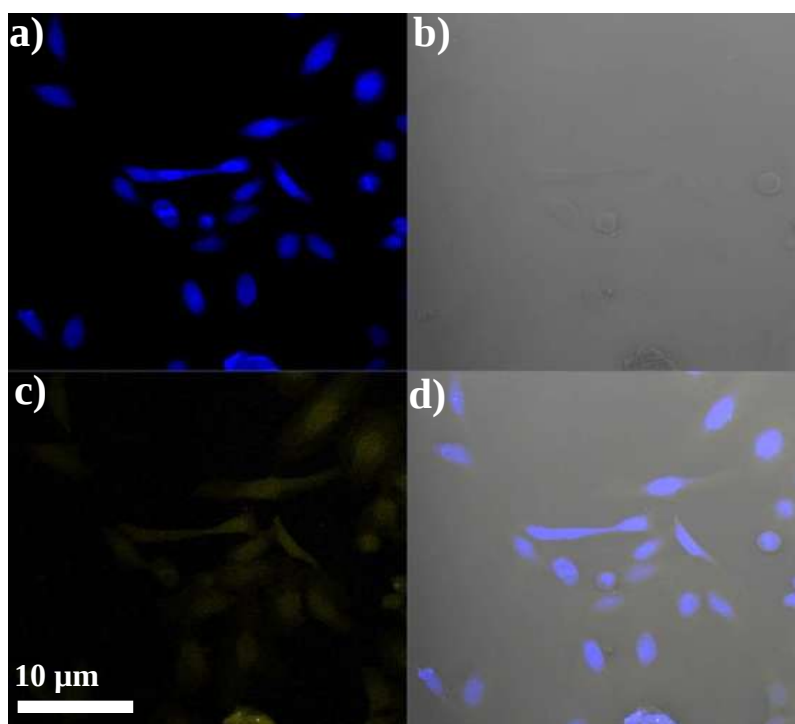


Figura 4. 18 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con rosa de bengala y d) suma de fluorescencia de imágenes.

En la Figura 4.19, se logra apreciar en el apartado a), nuevamente las células teñidas de los núcleos con el colorante DAPI, sin cambios morfológicos en su estructura interna, en el apartado b), se encuentra el campo claro de las células por observación directa, en el apartado c) se presentan las señales de las nanopartículas de oro distinguibles alrededor de las células, y finalmente el apartado d) corresponde a la agregación de todos los apartados anteriores donde se aprecia que las nanopartículas de mayor tamaño no se encuentran dentro de los núcleos.

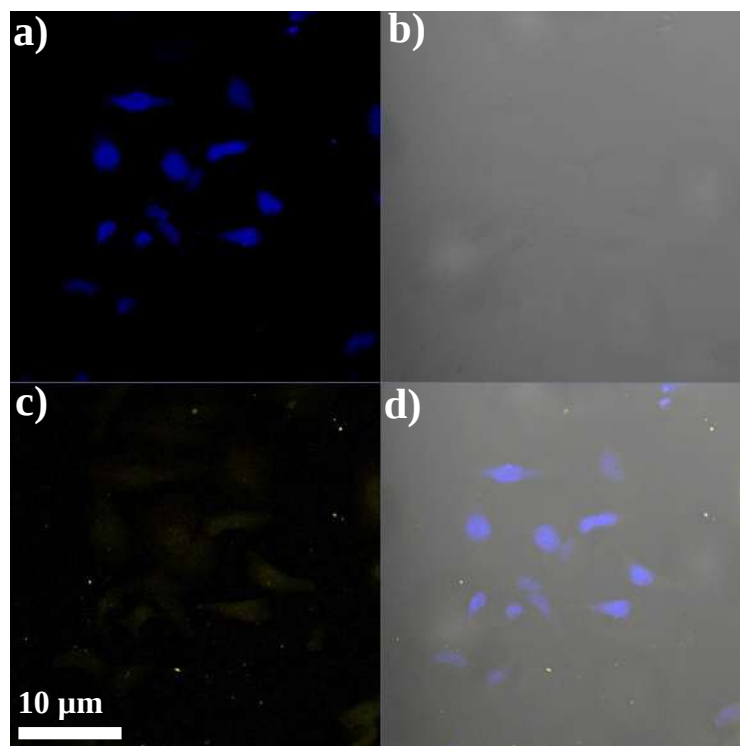


Figura 4. 19 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con AuNps y d) suma de fluorescencia de imágenes.

La figura 4.20 a) presenta los núcleos teñidos con colorante DAPI. Como se puede apreciar en los 3 experimentos, ninguna de las células presentó daño en los núcleos o exposición del ADN el cual representaría muerte celular, por lo que se confirma que los materiales no fueron citotóxicos, en el apartado b) se presenta el campo claro de las células con la muestra combinada entre nanopartículas de oro y rosa de bengala, en c) se presentan las señales provenientes de las células interactuando con la muestra, podemos observar que lo que se esperaba era un aumento de la fluorescencia entre las nanopartículas de oro y la rosa de bengala, sin embargo, el resultado no representó un incremento sino que simplemente cada uno de los materiales presentó las señales características de cada uno, se logra distinguir que el rosa de bengala tuvo fluorescencia por fuera de los núcleos en las células y las nanopartículas por fuera de las células, en el apartado d) se presenta la suma de todas las imágenes captadas en el microscopio confocal de esta muestra. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y todas las muestras fueron analizadas de diferentes zonas por lo que estos resultados representan también las réplicas que se estudiaron.

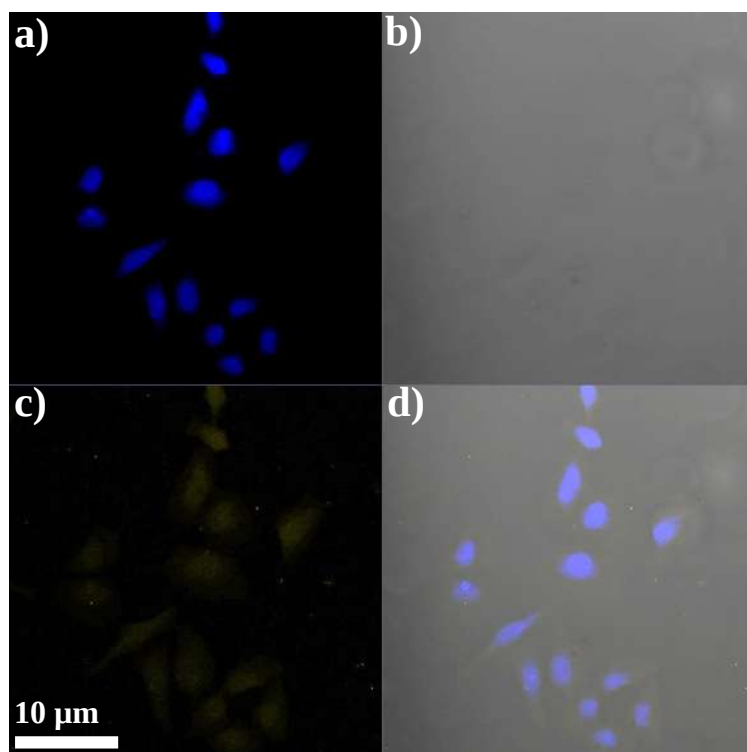


Figura 4. 20 Micrografías de células HeLa con a) núcleos teñidos con DAPI, b) campo claro de las células, c) células con mezcla de AuNps y rosa de bengala y d) suma de fluorescencia de imágenes.

4.2.9 Replicación de síntesis y caracterización de AuNps mediante *Cuphea aequipetala* para aplicaciones termográficas.

Este proceso ya se había realizado con anterioridad por lo cual no se tiene complicación en la replicación de la síntesis del material, el primer indicativo de una síntesis efectiva es el cambio de color del café claro a morado característico de la formación de estructuras nanométricas, debido a la excitación relacionada con los electrones oscilantes del oro. Posteriormente, se hizo un lavado de las AuNps a 5000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se utiliza el sólido precipitado, después, se lavaron nuevamente a 1000 rpm por 3 minutos con agua desionizada para eliminar el poco extracto remanente. La muestra se analizó mediante espectroscopía UV-Vis demostrando que la síntesis correspondía a nanopartículas de tamaño pequeño con una buena distribución de tamaños y formas de acuerdo al espectro de la Figura 4.21, el cual presenta un pico máximo de plasmón superficial en 548 nm.

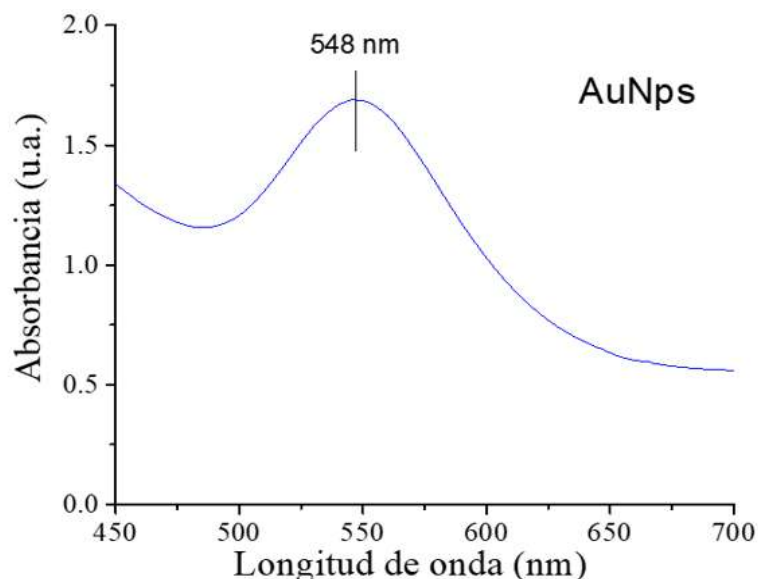


Figura 4. 21 Espectro de UV-Vis de las AuNps sintetizadas mediante extracto de *C. aequipetala*.

La misma muestra se analizó posteriormente mediante MEB para observar los tamaños y formas sintetizadas para lo cual la Figura 4.22a-c, muestra que se obtuvieron partículas esféricas con tamaño inferior a 20 nm, con una distribución homogénea en la muestra, el análisis químico de la muestra nos indica señal de Au en la mayor proporción (Figura 4.22d). Con esta replica de material se procedió a realizar el análisis de los materiales mediante las radiaciones.

4.2.10 Caracterización de las AuNps después de las radiaciones.

Como ya se mencionó con anterioridad, este tipo de pruebas ayudan a conocer las propiedades térmicas de los nanomateriales sometidos a radiación, lo que genera la eliminación de las células de cáncer. Por lo cual, la Figura 4.23 muestra el diseño del arreglo que se generó para poder irradiar las muestras de AuNps. Inicialmente se colocó solamente un tubo Eppendorf vacío para evaluar si el tubo podría interferir en las mediciones de la radiación de las muestras, sin embargo, se determinó que el plástico de los tubos, donde se colocaron las muestras no tiene efecto significativo por lo cual se procedió a realizar las mediciones. En la Figura 4.24, se distingue un comportamiento lineal homogéneo donde no hay un incremento drástico en la temperatura pasando de 25 °C a 26°C, por lo cual, se descartan efectos de error en las mediciones por sobrecalentamiento del plástico.

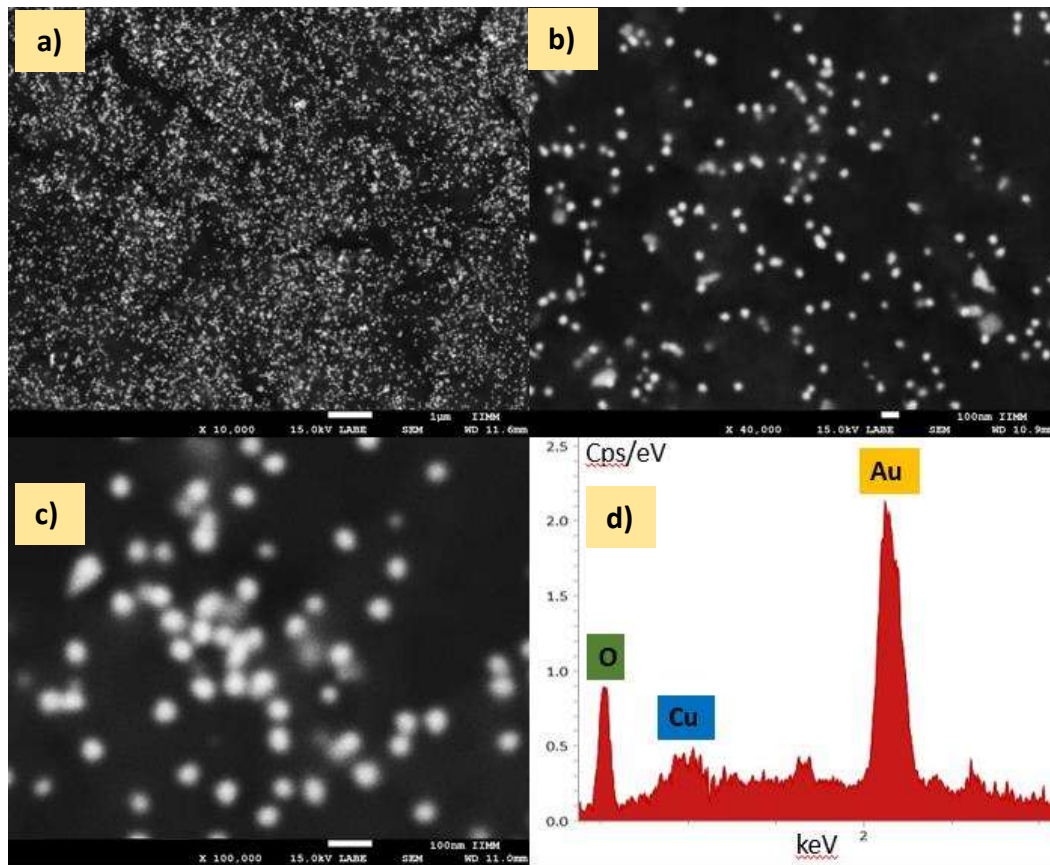


Figura 4. 22 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las AuNps sintetizadas con extracto de *Cuphea aequipetala*, a) 10 000X, b) 40 000X, c) 100 000 y d) análisis químico (EDS) de la muestra.

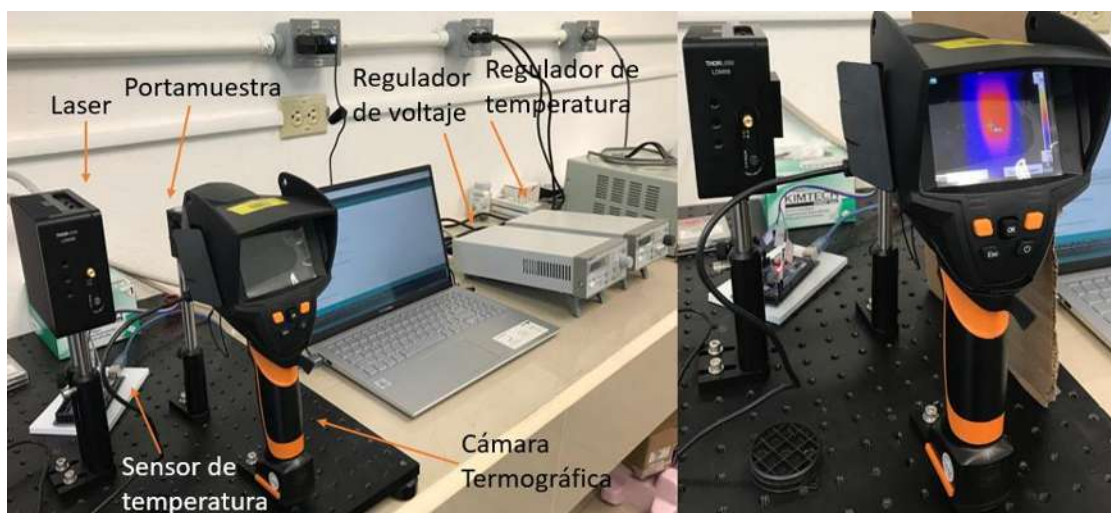


Figura 4. 23 Diseño experimental del arreglo para las irradiaciones de las muestras.

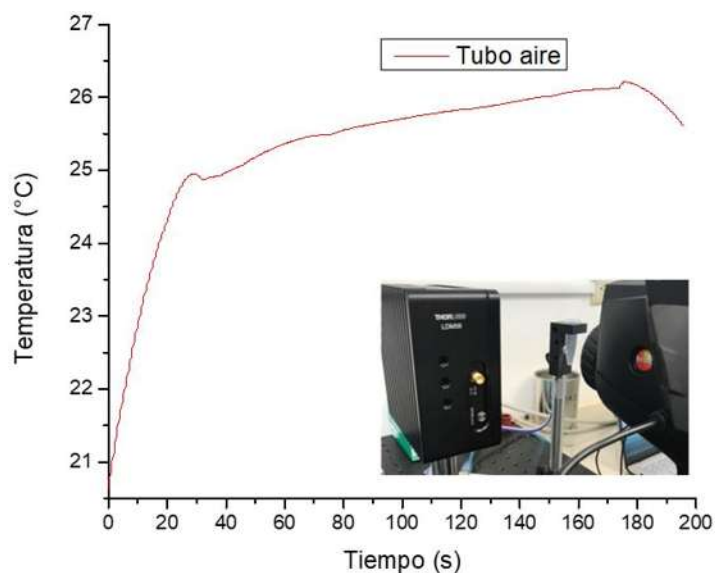


Figura 4. 24 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf vacío.

Posteriormente, se procedió a analizar un tubo con agua desionizada (figura 4.25) y así mismo como el caso anterior determinar si habría algún efecto significativo, pero se apreció que desde la temperatura de 22 °C solo incrementó medio grado hasta llegar aproximadamente a 22.6 °C lo cual permite denotar que no se tendrían errores de medición a causa del medio.

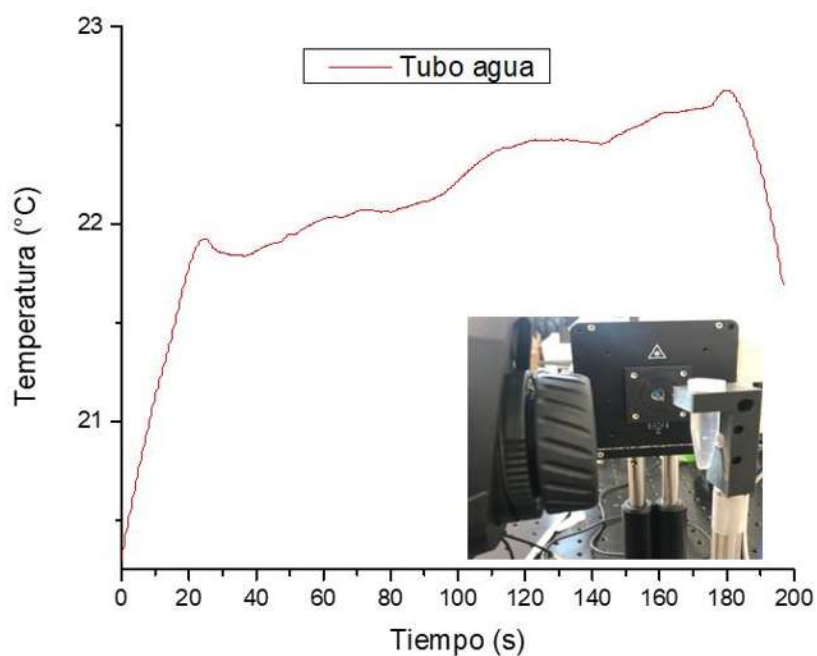


Figura 4. 25 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf con agua desionizada.

La medición de la radiación en el extracto (figura 4.26) como tercer control, sirvió para determinar que un incremento en la temperatura fue nulo ya que se mantuvo constante en 24.2 °C, cabe mencionar que todas las muestras tuvieron un tiempo de permanencia mínimo de 3 minutos. Este resultado y los 2 anteriores permiten descartar errores de medición relacionados a alguno de los medios o el propio plástico de los tubos y una vez teniendo en cuenta esto se procedió a realizar las mediciones en las AuNps.

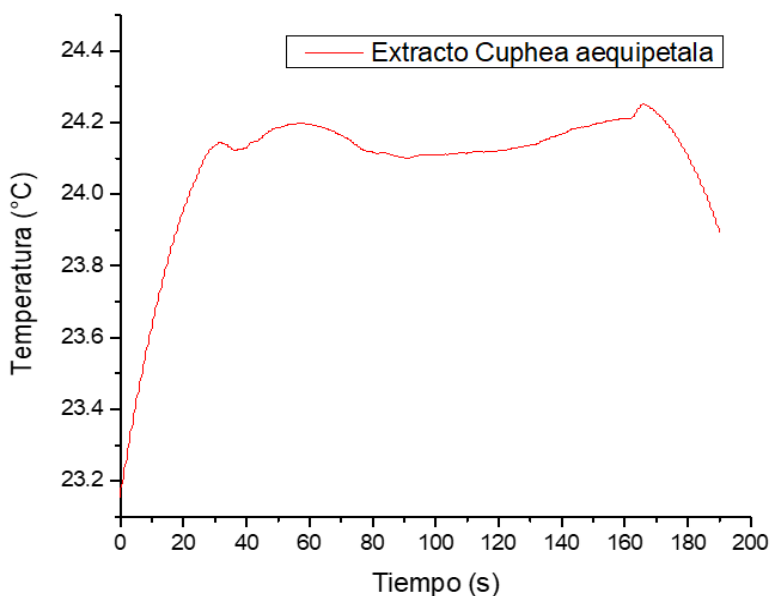


Figura 4. 26 Grafica de análisis de temperatura de tubo Eppendorf con extracto de *Cuphea aequipetala*.

La Figura 4.27 presenta los resultados del análisis de temperatura de la muestra con AuNps siendo analizada con el láser de 808 nm, en un tiempo de permanencia de 3 min, donde se distingue que considerablemente hubo un incremento de temperatura de 23 °C hasta alcanzar 32 °C, lo cual indica un diferencial de temperatura de 9 °C, junto a esta misma gráfica se distinguen los perfiles de temperatura registrados mediante la cámara termográfica empezando en la parte inferior y ascendiendo en temperatura hasta su punto máximo en este tiempo de permanencia, se distingue que las partes más frías son las de color azul y conforme toman color rosa a morado representan el calentamiento de la muestra. Este resultado podría deberse a que con el calentamiento de la muestra mediante la irradiación se produzca un fenómeno de coalescencia de partículas y genere mayores tamaños de las mismas.

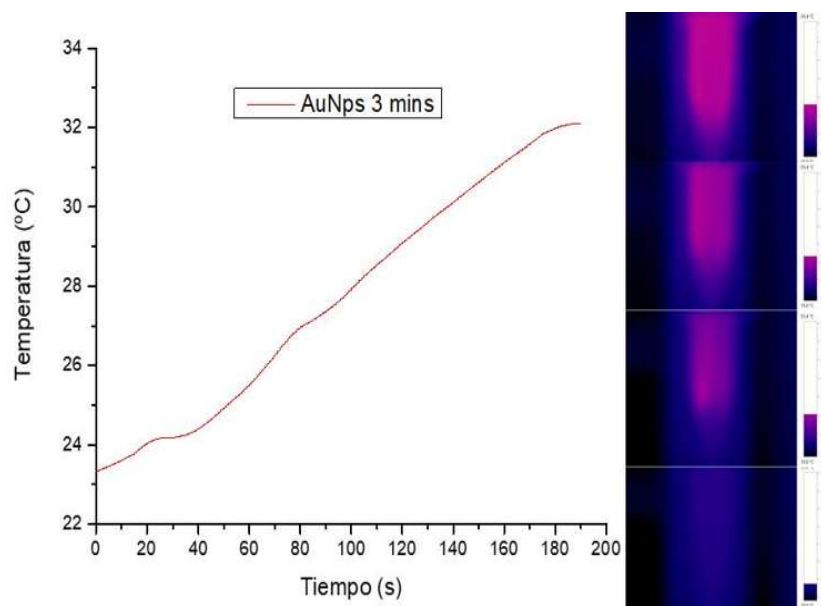


Figura 4. 27 Análisis de temperatura de las AuNps con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas.

Por otra parte, la Figura 4.28a muestra que, a mayor tiempo de exposición del láser, la temperatura sigue incrementando hasta llegar a 37 °C en un tiempo de 5 min, se puede apreciar en esta ocasión, que los perfiles de temperatura arrojan un mayor calentamiento, en este caso el diferencial de temperatura es de 15 °C iniciando en 22 °C. En b) la imagen denota que efectivamente se tuvo un incremento en la cantidad de partículas que coalescieron pero las formas siguen siendo cuasi esféricas.

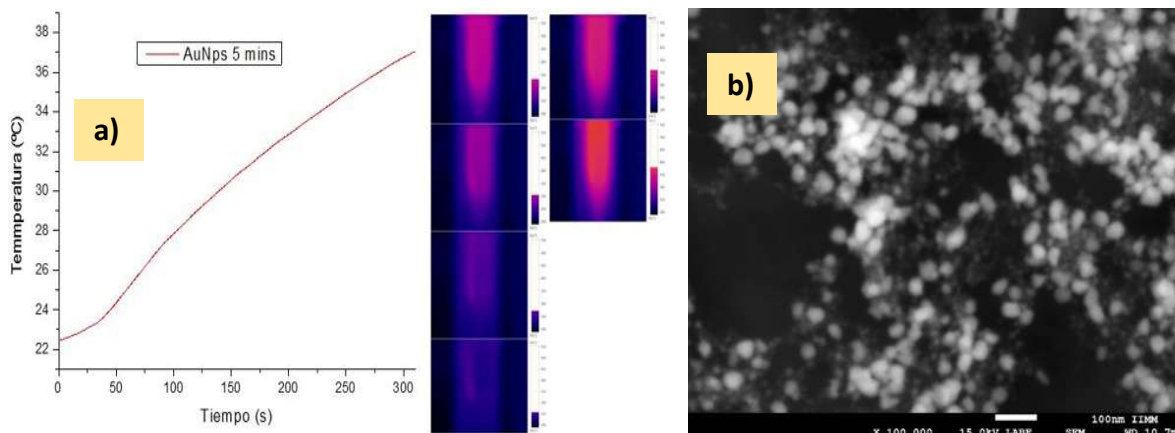


Figura 4. 28 Análisis de temperatura de las AuNps con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 5 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.

Cabe destacar que en cada medición se utilizó un tubo diferente con muestra, para evitar confusión de tamaños debido a que alguna de las muestras ya hubiese sido irradiada, para este caso la Figura 4.29a arroja un incremento significativo en la temperatura iniciando en 22 °C y alcanzando un máximo de 43 °C, representando esto un diferencial de temperatura de 19 °C. Hasta este punto, es importante destacar que la literatura marca que cerca de 45 °C, podría ser una temperatura suficiente para destruir las células que se encuentren en contacto con las AuNps, los perfiles de temperatura determinan que ya se aprecia el color amarillo intenso de un calentamiento mayor en la muestra, en el apartado b) las AuNps parece que ya no crecen a tamaños mayores si no que permanecen estables, sin embargo, se distingue cada vez mayor cantidad de partículas de tamaños cercanos a 50 nm y menos cantidad de partículas de tamaño cercano a 20 nm.

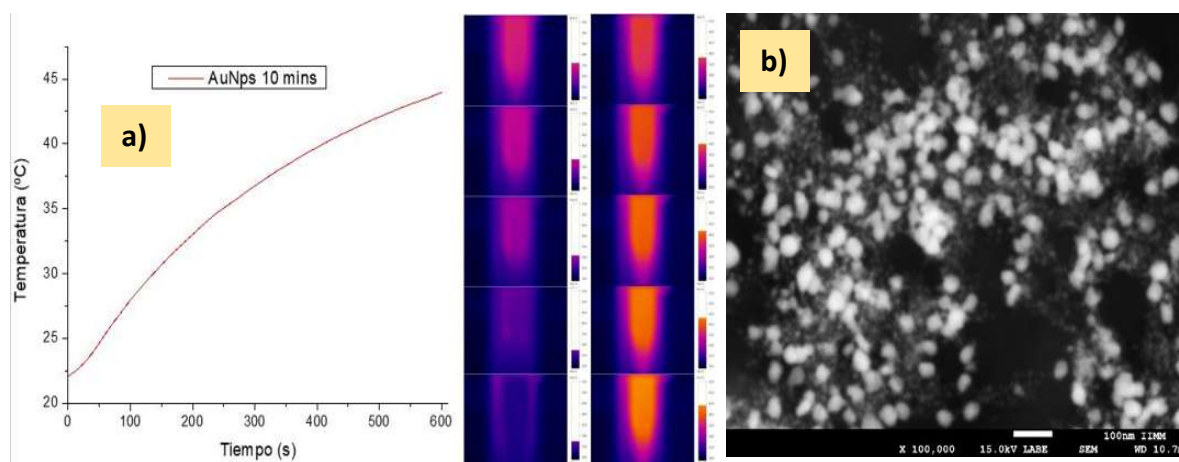


Figura 4. 29 Análisis de la temperatura de las AuNps usando un láser de 808 nm con un tiempo de permanencia de 10 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.

La Figura 4.30 presenta el resultado correspondiente a 15 min de exposición con el láser a 808 nm, en la cual se aprecia en el apartado a) que el calentamiento alcanza cerca de los 47 °C por lo cual se determina el punto máximo de irradiación de la muestra alcanzando lo reportado en la literatura. Nuevamente los perfiles de temperatura ejemplifican el comportamiento del calentamiento, cabe destacar que la diferencia entre el sensor de temperatura, que arroja los datos de la gráfica y las imágenes termográficas de la cámara es de aproximadamente ± 1 °C, lo cual no representa un error demasiado significativo, por lo cual este resultado se puede tomar como acertado. En el apartado b) se demuestra nuevamente que no hay un crecimiento acelerado de las partículas, pareciera que las pequeñas forman a

las más grandes, pero de manera controlada, quizá debido al incremento de temperatura no acelerado, teniendo un diferencial de temperatura de 25 °C iniciando en 22 °C.

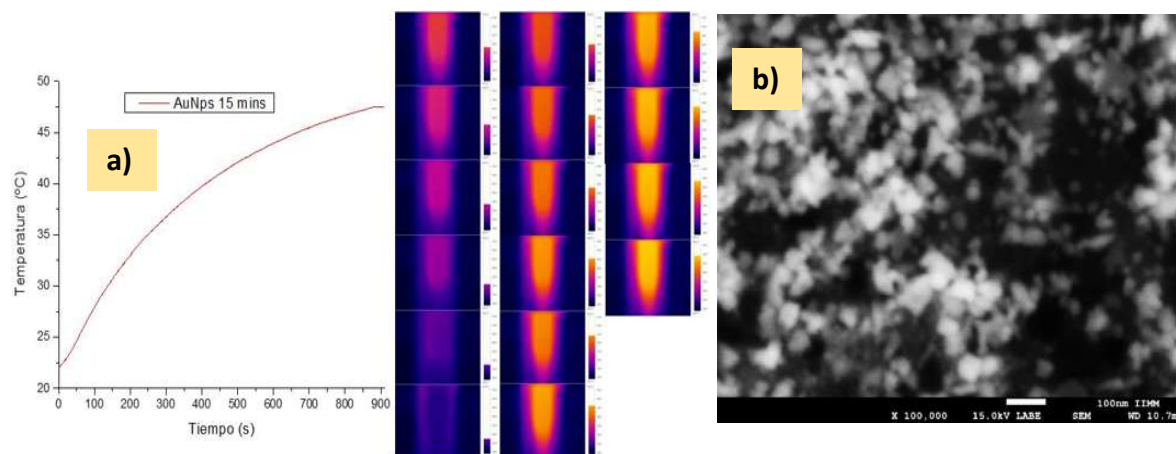


Figura 4. 30 Las AuNps analizadas con el láser de 808 nm en un tiempo de permanencia de 15 min, a) grafica de temperatura con imágenes termográficas y b) imagen de MEB de las AuNps.

Posterior a la medición con el láser de 808 nm, se procedió a medir las muestras con el láser de 532 nm, ya que la literatura indica que si se utiliza otro tipo de radiación se podría tener diferentes tipos de tamaños de las nanopartículas, aunque no se tenga un incremento significativo en la temperatura.

Se denota en la figura 4.31 en el apartado a) que no hubo efectivamente un incremento en la temperatura ya que de estar en 22.8 °C se aproximó a 22.9 °C, ahí mismo en ese apartado se incluye una imagen de la irradiación de la muestra con el láser verde en el centro, para tener una distribución homogénea del calor en caso de que así se diera, sin embargo, al no tener incremento de temperatura en 3 min se decidió no esperar más tiempo irradiando la muestra.

La figura 4.31b presenta una imagen de MEB donde se distinguen las nanopartículas esféricas de tamaño cercano a 20 nm, que indica nula diferencia con la irradiación en esa longitud de onda, lo que nos sugiere no más experimentos de medición de las muestras.

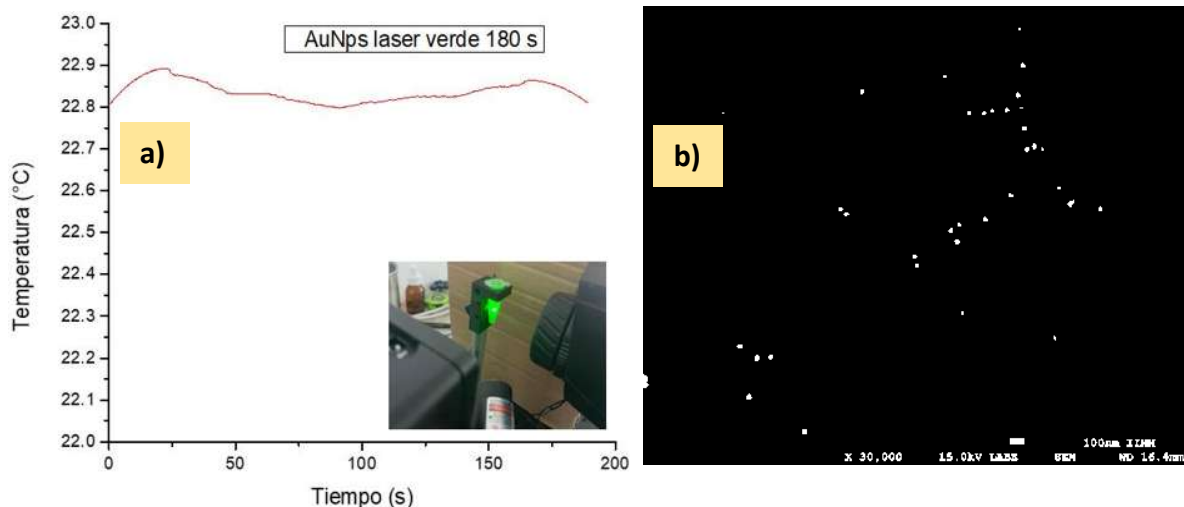


Figura 4. 31 Las AuNps analizadas a 532 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura y b) imagen de MEB de las AuNps.

La Figura 4.32 presenta el resultado de la medición de las AuNps con radiación en 390 nm, en el apartado a) se distingue que no hubo un incremento máximo en la temperatura a una exposición de la muestra de 3 min, teniendo un diferencial aproximado de 2.5 °C lo cual no representa un cambio significativo para poder incluirlas en las mediciones con levaduras o células HeLa. Por otra parte, en el apartado b) se distingue que efectivamente hubo un cambio de tamaño con la radiación a 390 nm, presentando un rango entre 100 y 300 nm con formas triangulares, tetraédricas y esféricas.

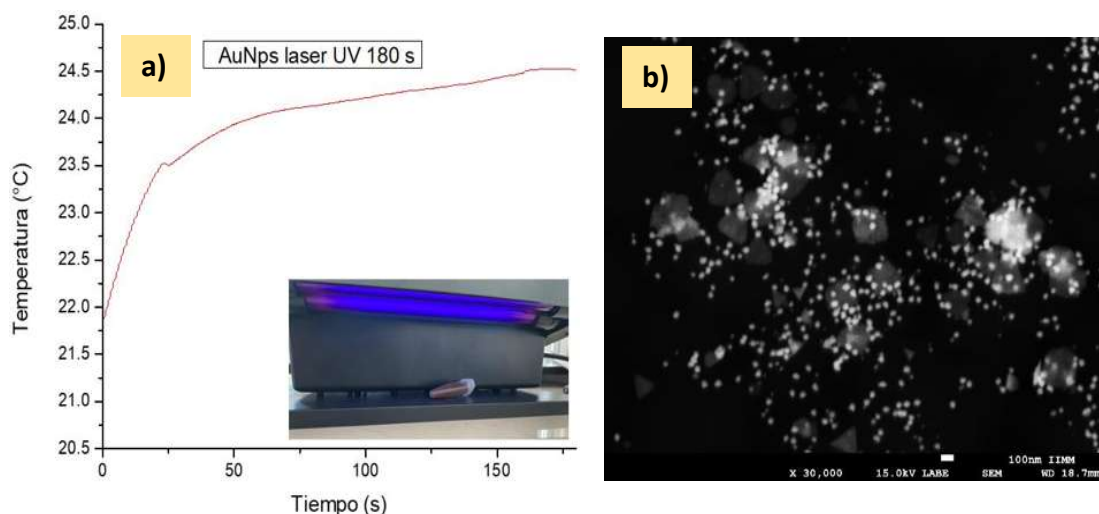


Figura 4. 32 Análisis de AuNps a 390 nm en un tiempo de permanencia de 3 min, a) grafica de temperatura y b) imagen de MEB de las AuNps.

Con este resultado y concordantemente con la literatura, se determina que se podrían hacer más pruebas para tener modificaciones de las formas de las nanopartículas mediante radiación de las mismas y así generar partículas de tamaños mayores. Sin embargo, para las aplicaciones que se buscan lo ideal son nanopartículas pequeñas que generen calor de manera intracelular y así atacar a las células desde el núcleo para una mayor efectividad de su eliminación.

4.2.11 Pruebas biológicas con levaduras mediante radiación a 808 nm.

Los análisis se efectuaron con las AuNps mezcladas en el medio de las levaduras durante una hora de exposición al material y seguidamente con la irradiación de la muestra durante 10 min a la concentración de 980 ppm de nanomaterial agregando 2 mL de muestra en 10 mL de medio con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La Figura 4.33, representa el modelo de la cámara de Neubauer en la cual se realizó el conteo de células muertas para el análisis de la viabilidad celular, posteriormente, se efectuó la microscopía, para la observación de la exclusión del azul de tripano como indicativo de muerte celular. En esta cámara, se realiza el conteo celular por cuadrantes para los cálculos del porcentaje de células vivas y células totales. Inicialmente, se generó un control de las levaduras sin muestra de AuNps y sin radiación, con la cual la viabilidad celular representó un 100% de efectividad, ya que no hubo células que tuvieran exclusión de azul de tripano, lo que significa, que se hicieron crecer y reproducir de manera efectiva. En la Figura 4.34 se agrega la imagen de las levaduras en la cámara de conteo y a su lado derecho el tubo con medio de crecimiento y levaduras.

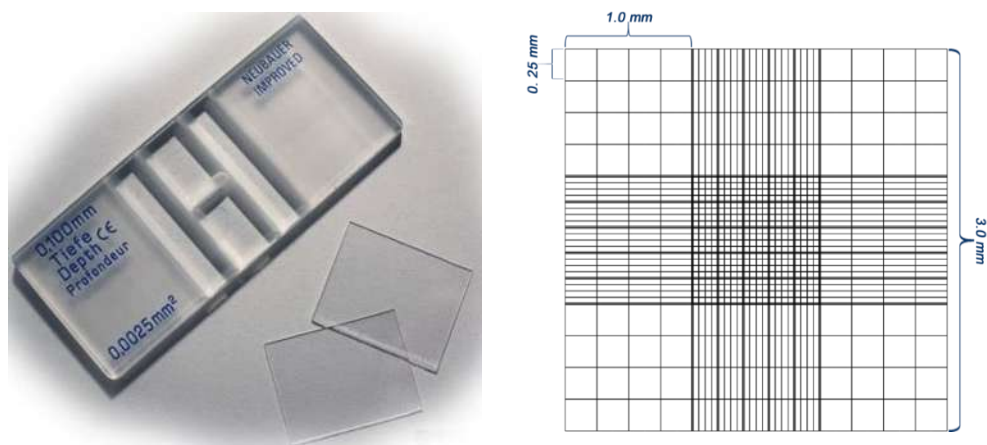


Figura 4. 33 Modelo de la cámara de Neubauer para conteo celular [77].

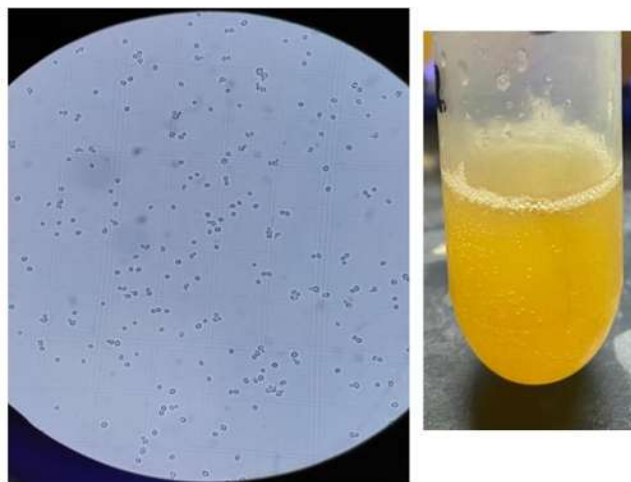


Figura 4. 34 Levaduras en la cámara de conteo y a su lado derecho el tubo con medio de crecimiento y levaduras.

Por otra parte, en la Figura 4.35 se distingue que en la imagen del contador de células se apreciaron cúmulos de levaduras que tuvieron exclusión de azul de tripano lo que indica su muerte celular, en este caso se tiene un 98% de viabilidad celular, a su lado derecho se presenta la imagen del tubo con la muestra incluyendo 2 mL de AuNps y 10 mL de medio con levaduras. Cabe destacar, que esta muestra no se irradió, solamente se analizó después de una hora de exposición de las levaduras, para analizar si por sí solas generarían algún daño. Sin embargo, recordemos que las nanopartículas de oro por sí solas son biocompatibles y no generan toxicidad en algunos modelos celulares como sería en este caso.

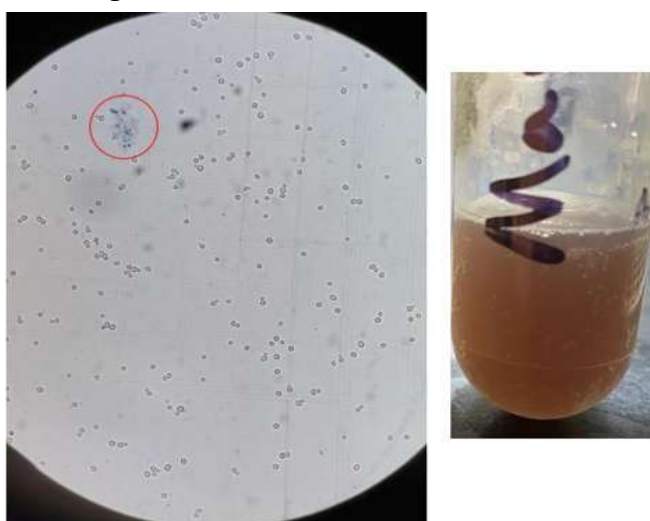


Figura 4. 35 Levaduras en la cámara de conteo y a su lado derecho el tubo con medio de crecimiento de levaduras mezcladas con AuNps.

Después de determinar que no hubo daño significativo en las levaduras con el material por sí solo, se procedió a su irradiación en los tiempos de 3 y 15 min. En la Figura 4.36, se distingue la respuesta del incremento de temperatura siendo relativamente baja desde 21 °C hasta aproximadamente 24.5 °C, lo cual podría relacionarse con ya sea la dispersión de las nanopartículas en todo el medio (10 mL) que no permite tener una buena concentración de las mismas y probablemente el calor se esté disipando o quizá al láser que no alcanza a penetrar en el medio.

Sin embargo, se apreció que algunos cúmulos de levaduras murieron a pesar del bajo incremento de la temperatura en el tubo, posiblemente por causa del medio de cultivo, hubo calentamiento de las AuNps libres en su alrededor de residuos de material orgánico que disipa el calor, generando baja muerte celular. En este caso, el porcentaje de viabilidad celular fue del 91%. A pesar de no ser tan radical la muerte celular, se aprecia que podría hacerse más modificaciones de concentración de las AuNps o incrementar la potencia del láser para tener una mayor penetración en el medio.

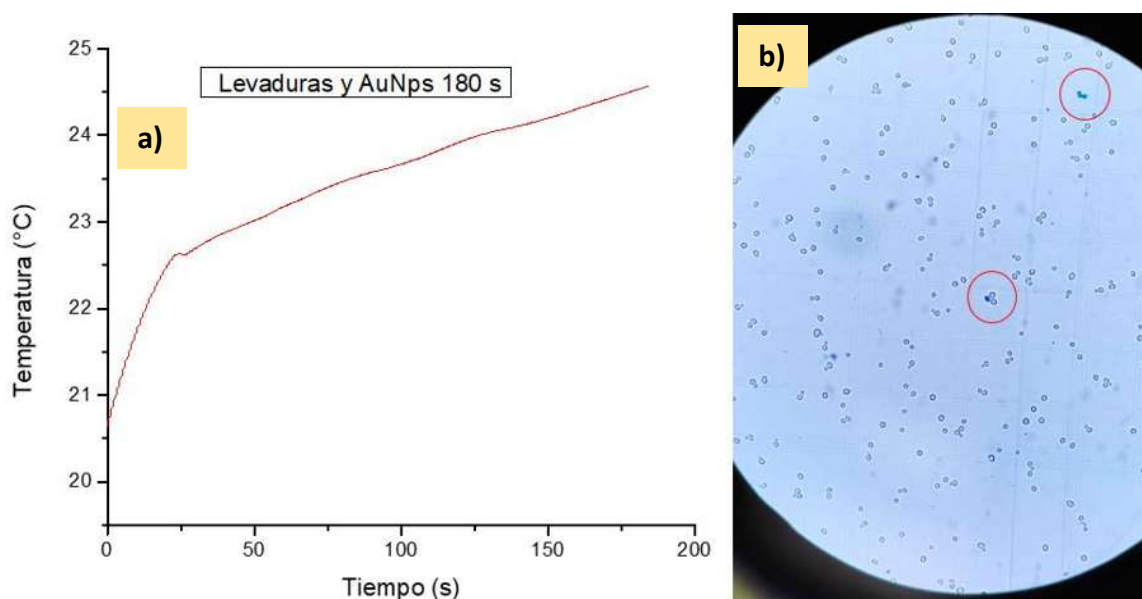


Figura 4. 36 Imagen de a) Grafica de comportamiento del incremento de temperatura a 3 min con láser de 808 nm y b) Levaduras en la cámara de conteo.

Finalmente, la Figura 4.37 representa la irradiación de las levaduras a 15 minutos con el láser de 808 nm, como se puede apreciar en a) hay un incremento de temperatura de 22 °C hasta

34 °C generando un diferencial de temperatura de 12 °C, lo cual significa que probablemente no es suficiente temperatura para generar una muerte celular mayor. Teniendo así un 90% de viabilidad celular denotado por la exclusión de azul tripano en algunas levaduras.

Se propone para futuras mediciones realizar diferentes análisis con concentraciones distintas y así probar cuanta cantidad de AuNps será necesaria para tener por lo menos un 50% de viabilidad celular. Cabe destacar, que se utilizaron este tipo de levaduras para tener una guía del comportamiento del sistema y así poder desarrollar una metodología más acertada cuando se utilicen células de cáncer. Por otra parte, se sabe que este tipo de levaduras es tolerante hasta una temperatura de 37 °C, así que probablemente este calentamiento que se generó por medio de las AuNps, no sea suficiente mente alto como para generarles muerte celular.

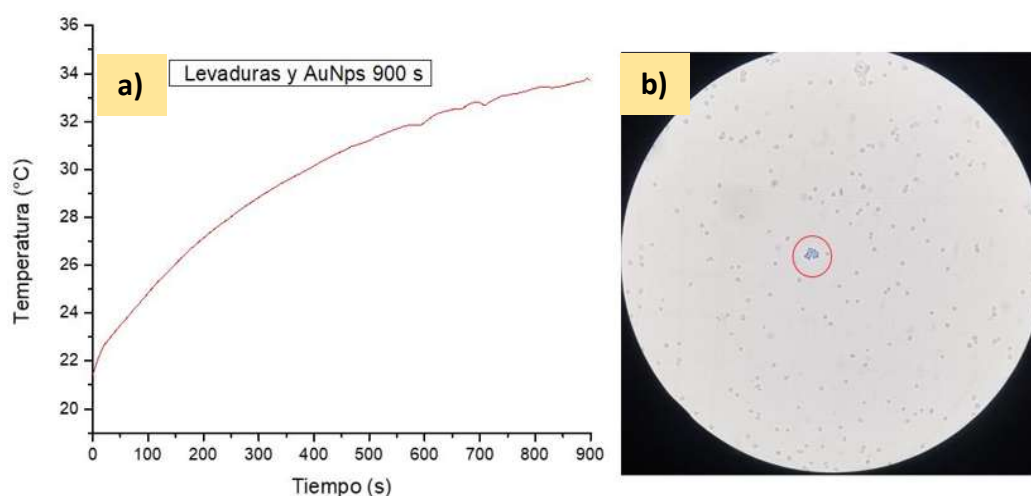


Figura 4. 37 Grafica de comportamiento del incremento de temperatura a 15 min con láser de 808 nm a) y Levaduras en la cámara de conteo b).

4.3 Síntesis de nanopartículas de Au@ZrO₂.

Dentro de los tipos de nanopartículas hay una interesante clasificación que incluye aquellas que tienen una cubierta en la superficie, las denominadas core-shell (Del inglés, núcleo-cubierta), atrayendo especial atención debida a sus potenciales aplicaciones tecnológicas y biológicas [78]. Los diferentes métodos y tipos de cubierta de las nanopartículas han generado nuevas interacciones entre distintos materiales, incluyendo orgánico-orgánico,

orgánico-inorgánico, inorgánico-inorgánico, los cuales a su vez consideran aquellas respectivas a metal-metal- metal-cerámico y cerámico-cerámico [79].

El interés científico surge de los diversos atributos de estas nanopartículas como un modelo de construcción hacia materiales funcionales, incluyendo 1) dispersión de tamaño, 2) procesabilidad de núcleo-cubierta, 3) solubilidad, 4) estabilidad y tenacidad, 5) capacidad de autocontrol y ensamblaje y finalmente 6) reactividad, que involucra fenómenos ópticos, electrónicos, magnéticos, catalíticos y químicos / biológicos [80]. Estos nanomateriales podrían significativamente aumentar el rendimiento cuántico de luminiscencia debido a la pasivación mejorada de la superficie, potenciar también la generación de calor a partir de una radiación incidente y, por otra parte, funcionar como agentes ligantes mejorados para tangentes específicos donde sus núcleos individuales no podrían tener dicha interacción [81].

Anteriormente ya se ha hablado de nanopartículas de Au y sus principales aplicaciones, sin embargo, en este reporte se presenta la experimentación respectiva a la generación de una cubierta de zirconia.

Los precursores de Zirconio son relativamente baratos, no tóxicos y ecológicos, dicho elemento en su forma conjugada con Oxígeno (zirconia, ZrO_2) tiene resistencia a agentes oxidantes, ácido/base y presenta baja solubilidad en agua, lo cual lo hace ser un excelente material para una amplia gama de aplicaciones [82]. Las nanopartículas individuales de zirconia se usan como cerámica de alto rendimiento, catalizadores o cosméticos. Las nuevas aplicaciones para los polvos de zirconia son celdas de combustible de alta temperatura, sondas lambda, biocerámicas como las prótesis dentales y luminiscencia de los nanocristales fotónicos con alta constante dieléctrica [83]. La zirconia es un semiconductor de tipo n con una gran cantidad de defectos por vacancias de oxígeno en su superficie. El efecto luminiscente en ZrO_2 se asocia a una transición entre un nuevo estado de electrones atrapados en vacantes de oxígeno y un nivel de energía base.

La forma tradicional de producir estas nanopartículas consiste en una reacción de sinterización reactiva en estado sólido entre la mezcla estequiométrica de óxidos constituyentes. Sin embargo, para el caso de core-shell existen métodos alternativos como sol-gel hidrolítico, sol-gel no-hidrolítico, combustión, precipitación y precipitación seguida de un envejecimiento hidrotérmico a temperaturas inferiores o superiores a 100 °C [84].

En el presente trabajo se muestran algunas caracterizaciones de nanopartículas de Au que habían quedado pendientes en anteriores reportes, los análisis biológicos de los nanomateriales de oro solo para comprobar su efecto no-bactericida y los resultados preliminares a la síntesis de nanopartículas de Au@ZrO₂ mediante métodos de precipitación-centrifugación.

En la figura 4.38(a-b) se distinguen las AuNps sintetizadas con el extracto de la planta *Cuphea aequipetala*, las cuales fueron la semilla de crecimiento, donde nucleó la capa de ZrO₂. Se aprecia que tienen un tamaño entre 20 y 50 nm, con formas cuasiesféricas y triangulares, lo cual se atribuye a que la centrífuga que se utilizó para purificar las nanopartículas, presento fallas y se calentó generando que los tubos se calentaran y propició un crecimiento acelerado de las nanopartículas.

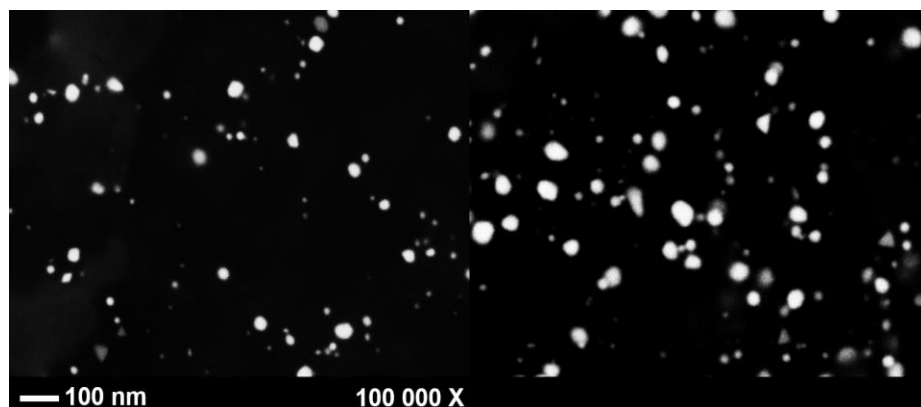


Figura 4. 38 Micrografías de las AuNpsC sintetizadas mediante extracto de *C. aequipetala*.

Una vez confirmada la presencia de nanopartículas, se adicionó el precursor de Zr, para seguir la metodología planteada mediante precipitación, con lo cual se evaluaron los resultados inicialmente por espectroscopía UV-Vis.

4.3.1 Espectroscopía de UV-Vis

La figura 4.39 presenta el espectro de UV-Vis respectivo a la síntesis de las AuNps@ZrO₂. En la cual se distinguen 2 bandas características a nanomateriales de oro y zirconia con máximo de plasmón superficial en 420 nm para el nanomaterial de ZrO₂ [60] y en 535 nm para estructuras de Au [73]. Lo cual indica que posiblemente hubo una nucleación parcial de zirconia en la superficie de oro o que quizá se sintetizaron materiales de ZrO₂, por separado a las AuNps.

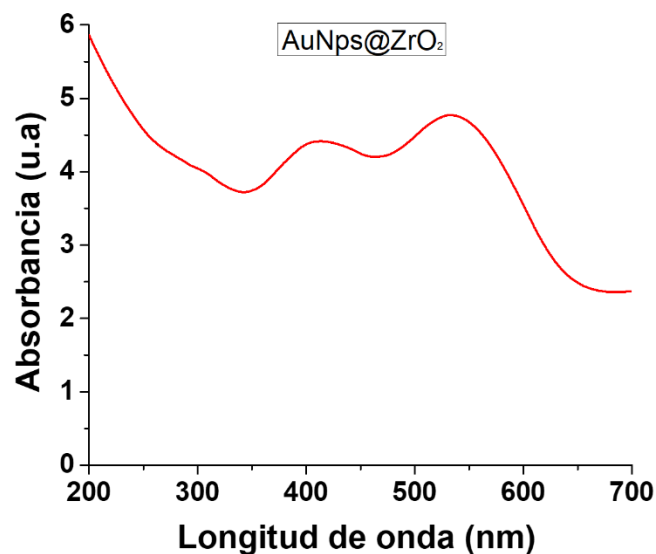


Figura 4. 39 Espectro de UV-Vis de las AuNps con solución precursora de Zr.

Para descartar la posibilidad de que el extracto produjera materiales de ZrO_2 , se mezcló extracto de la planta *C. aequipetala* con el precursor de Zr. Sin embargo, en la Figura 4.40 no se aprecia ninguna señal característica a zirconia, lo cual tiene lógica, ya que no hay ningún material en la suspensión coloidal en el cual pueda nuclear la zirconia.

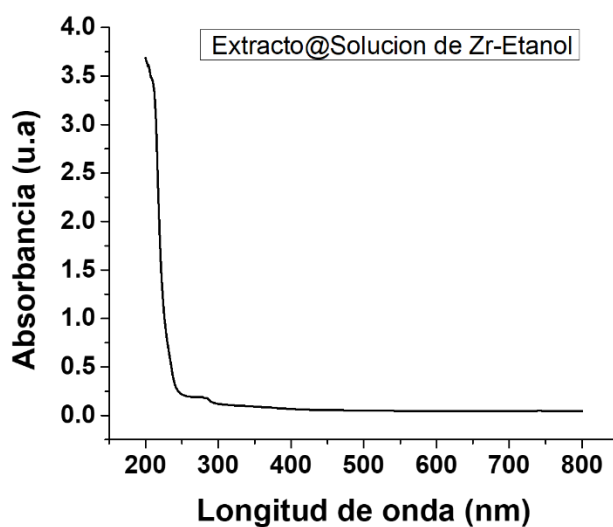


Figura 4. 40 Espectro de UV-Vis de la mezcla de extracto de *Cuphea aequipetala* con solución precursora de Zr.

Cabe destacar que en ambas muestras se siguió la metodología por precipitación propuesta por Zhou y co [60], para descartar que se hubiera realizado un paso diferente e influyera en la síntesis de nanopartículas de ZrO_2 . Pero, la teoría claramente indica que es necesario un template donde se origine la precipitación de ZrO_2 , promovida por la adición de iones competitivos como Tetraetilo ortosilicato (TEOS) y los solventes como etanol absoluto : agua desionizada, cabe señalar que lo único que no se adicionó fue TEOS, ya que tratamos de intuir que, en la solución con extracto ya podría haber mucha cantidad de iones y compuestos que compitieran por los solventes y quizá se podría llevar a cabo una precipitación.

4.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido

Sin embargo, de acuerdo a los resultados visualizados mediante MEB, presentados en la Figura 4.41 se aprecia que aparentemente se tiene solamente un nanosólido compuesto por Au, con formas esféricas de 20 nm y nanocristales de mayor tamaño cercano a 300 nm con formas de platos trancos, se tiene la incertidumbre de que el efecto posiblemente haya sido promovido por el sobrecalentamiento de la centrífuga, ya que, a condiciones normales anteriormente realizadas en experimentación anterior, esto no ocurre con las AuNps individuales. Otra situación destacable es que se utilizaron 0.6 μL de solución precursora de Zr, y como se aprecia en la misma figura existe un agregado de color gris menos intenso rodeando a las nanoestructuras de oro, lo cual por tener menor brillantez debería corresponder al cerámico, se le realizó un análisis químico elemental (EDS) que mostró señales respectivas a los elementos de Zr, O, Au y Cu (señal perteneciente al portamuestras), ilustrado en la figura 4.42. En esa misma figura, se incluye la cuantificación elemental que tuvo la muestra con respecto a los elementos de Zr y O, es destacable que el porcentaje de masa refleja una relación de 1:2, respectivamente, concordando de cierta manera con la fórmula química de la zirconia. Por lo cual, pueda ser posible que se hubieran sintetizado nanopartículas de Au@ZrO_2 , pero no se puedan visualizar mediante MEB, por lo cual es factible realizar estudios de DRX y MET.

Cabe mencionar que en la literatura hay muy pocos estudios que hayan sintetizado cubiertas de zirconia en la superficie de nanopartículas de oro y ninguno mediante métodos verdes. Por lo cual, todos los resultados que se presenten serán nuevos con respecto a la literatura.

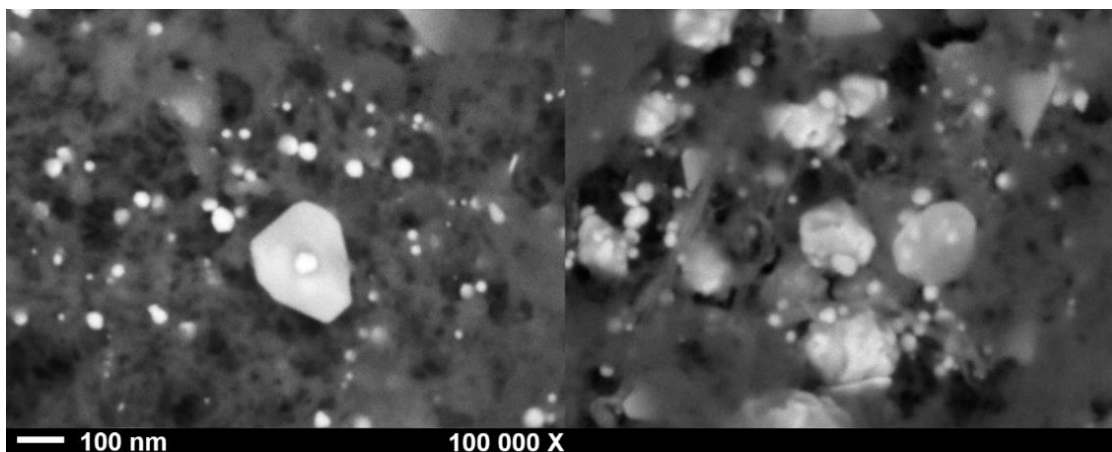


Figura 4. 41 Micrografías de la muestra de nanopartículas de oro con propóxido de zirconio (IV) y etanol absoluto: agua desionizada.

Element	At. No.	Netto	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]
Oxygen	8	1213	2.39976865	62.203182	90.369294
Zirconium	40	694	1.45818291	37.796817	9.6307055
		Sum	3.85795157	100	100

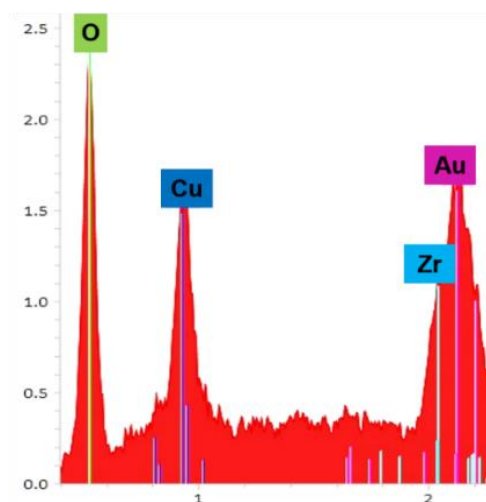


Figura 4. 42 Análisis químico elemental de la muestra de AuNpsC con solución precursora de Zr.

Finalmente, se analizó mediante mapeo químico la muestra con la posible síntesis de las nanopartículas de Au@ZrO₂, ilustrado en la figura 4.43, donde se observa que los elementos de Au, Zr y O presentan relación con la imagen de electrones secundarios, demostrando que quizá entre todo el conjunto de nanomateriales, algunos si tiene la cubierta de zirconia.

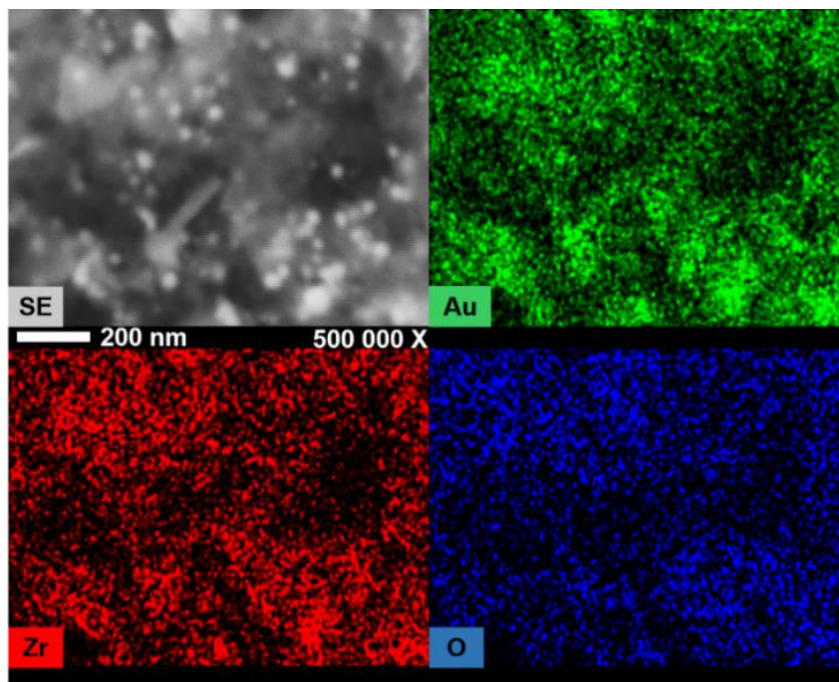


Figura 4. 43 Micrografías del mapeo químico de la muestra de AuNps con solución precursora de oro analizando Au, Zr y O.

4.3.3 Espectroscopía de Infrarrojo

En este estudio, se realizó el análisis de las muestras en polvo con tratamiento térmico a 800°C, por lo que el resultado presenta el espectro con las bandas correspondientes a las AuNps con la superficie de zirconia.

Esta técnica es una alternativa eficaz para conocer los compuestos orgánicos presentes en las muestras, en este caso se utilizó esta prueba para conocer los grupos funcionales que están involucrados en la síntesis de las AuNps con el recubrimiento de zirconia, en base a la aparición o eliminación de bandas en el espectro de infrarrojo. Esta prueba se realizó a una humedad específica de 33.5% y una temperatura de 25.2 °C.

En la figura 4.44 se logra apreciar absorciones características de ciertos grupos funcionales con los enlaces y números de onda correspondientes, de lado izquierdo comenzamos con la presencia de una banda con número de onda de 3498 cm^{-1} , la cual se atribuye a las vibraciones que sufre el enlace O-H de los alcoholes debido a un estiramiento del mismo. En la siguiente banda ubicada en 1730 cm^{-1} se generó por tensión de grupos aromáticos con enlace C=C, esta banda al estar ligeramente cercana a los 1610 cm^{-1} representan un núcleo bencénico. El siguiente pico en 1475 cm^{-1} corresponde a la flexión de

los grupos con enlace C=N, en la banda de 1220 cm^{-1} se encontró la aparición de enlaces de C-C respectivo a carburos. La banda con número de onda 1105 cm^{-1} del enlace C-O corresponde a los ácidos carboxílicos, posteriormente se tiene la presencia de una banda de 1050 cm^{-1} que se atribuye a los compuestos con la unión C-H. En la banda correspondiente a 650 cm^{-1} aproximadamente se encuentran los compuestos halogenados perteneciente a C-Cl, seguidamente entre 600 y 500 cm^{-1} se observan bandas de enlace C-N y finalmente se observa una banda característica de los enlaces de Zr-O en este caso significativas de zirconia.

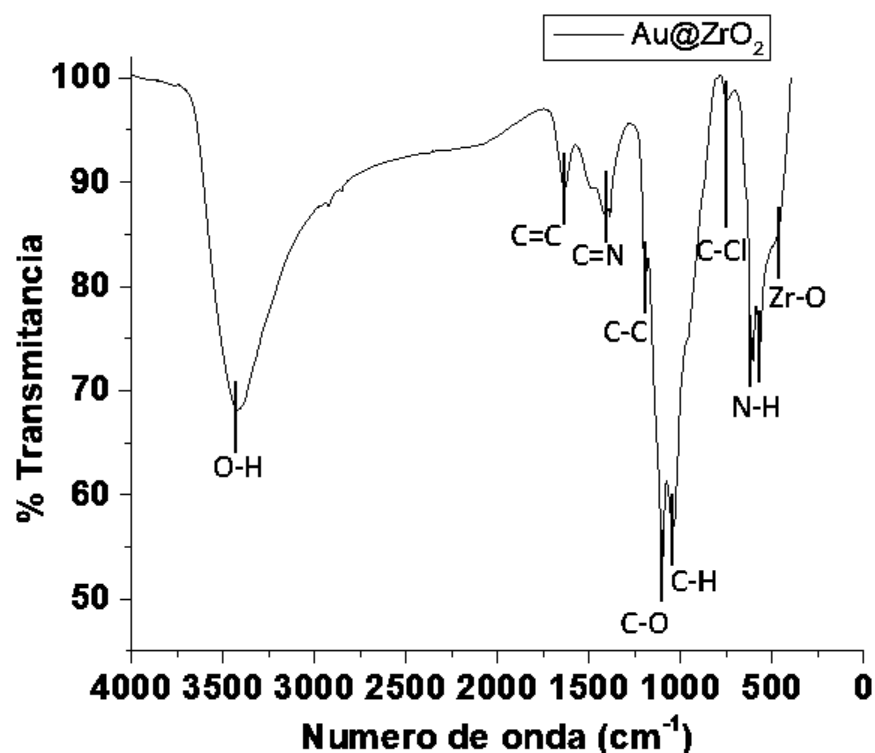


Figura 4. 44 Espectro de infrarrojo de AuNps@ZrO₂.

4.3.4 Microscopía Electrónica de Barrido Convencional

Figura 4.45 se aprecia que aparentemente se tienen nanosólidos compuesto por Au, con formas esféricas de 30 nm, existe un agregado de color gris menos intenso rodeando a las nanoestructuras de oro, lo cual por tener menor brillantez debería corresponder al cerámico (ZrO₂), cabe destacar que en este equipo no se alcanza a tener la suficiente resolución para

definir las nanopartículas, sin embargo, hasta donde se tuvo alcance en 100000X (Figura 4.45c) se distinguen morfologías esféricas, con una distribución homogénea a lo largo del campo de observación (Figura 4.45a-b).

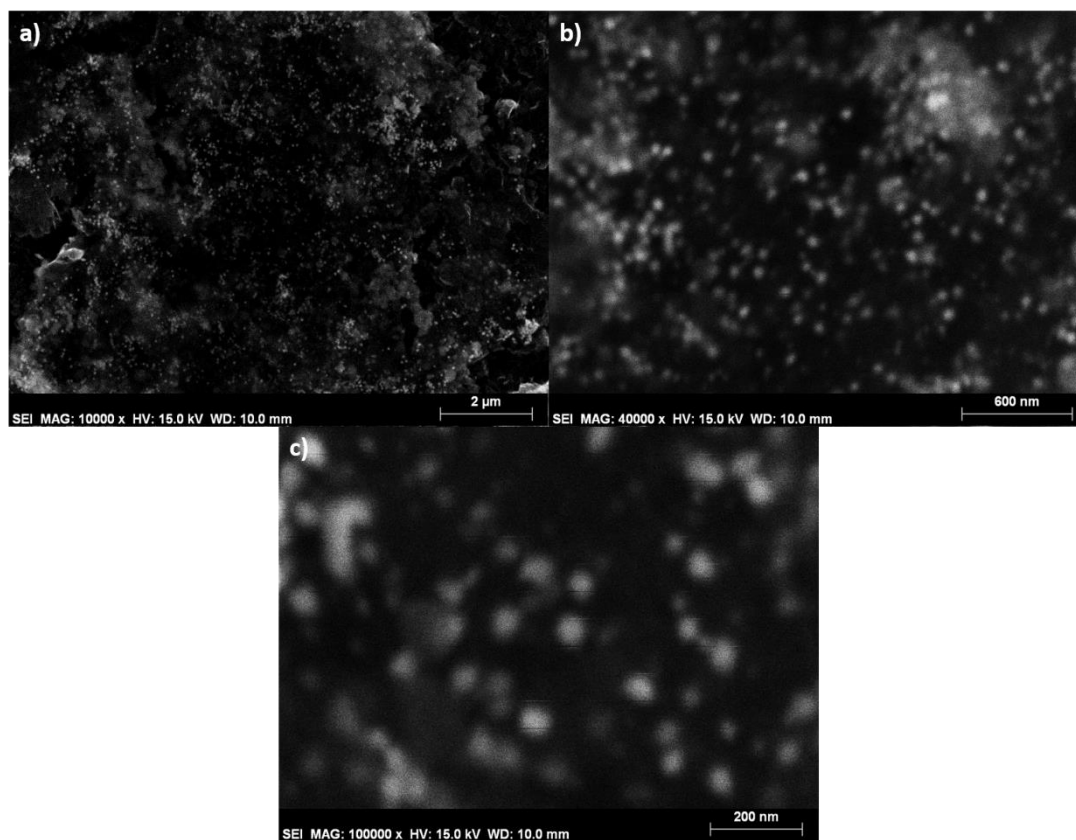


Figura 4. 45 Micrografías electrónicas de barrido convencional de AuNps@ZrO₂ a diferentes magnificaciones a)10000X, b) 40000X y c)100000X.

4.3.5 Difracción de rayos X

En la figura 4.46 se distingue el patrón de difracción característico de oro nanométrico con 5 picos de difracción a 37, 44.5, 64.8° y 77°, los cuales se atribuyen a los planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) y (3 1 1), respectivamente, de la estructura cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés) de los cristales de oro (JCPDS #03-065-28-70). Por lo que se afirma la presencia de oro sólido con intensidades bajas (350 u.a.). A partir del semiancho del pico principal y la altura media se calculó mediante la ecuación de Debye-Scherrer el tamaño promedio de cristal siendo éste de 22 nm. Para este resultado, se realizó el método de

precipitación a temperatura ambiente adicionando a las nanopartículas de oro, la solución de propóxido zirconio y mezclas de etanol-agua para los lavados. Por otra parte, cabe destacar que la literatura menciona que a temperatura ambiente podría existir un pico ancho cercano a los 30° correspondiente a zirconia obtenida por el método de precipitación, sin embargo, ese resultado no se obtuvo, por lo cual se procedió a realizar una modificación del método, donde al final de la precipitación se llevó a cabo un tratamiento térmico a 800°C , para obtener la estructura cristalina monoclinica de la zirconia.

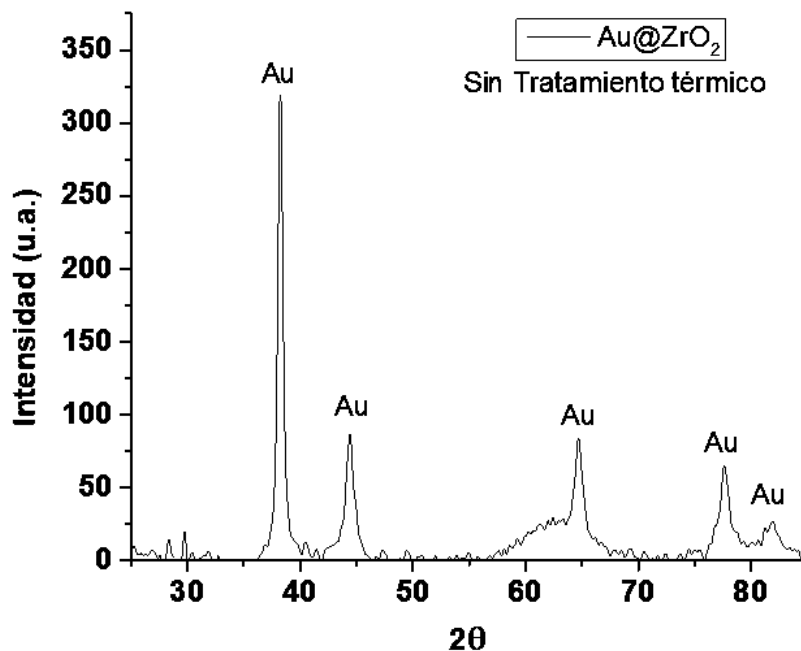


Figura 4. 46 Difractograma de las AuNps@ZrO₂ sin tratamiento térmico.

Ahora bien, para la mejora de la obtención de la zirconia en estructura monoclinica se realizó en tratamiento térmico a 15°C por minuto hasta alcanzar 800°C , donde permaneció 3 h de acuerdo a lo descrito en la literatura, con lo cual se obtuvieron resultados satisfactorios ya que los picos mostrados en el difractograma de rayos X de la figura 4.47 demuestra que existen picos característicos de zirconia monoclinica, aunque algunos pocos de estructura tetragonal. Por supuesto, también se incluyen los picos respectivos a Au nanométrico.

Los picos de oro son los mismos que anteriormente se mencionaron, sin embargo, los picos de la zirconia tetragonal se encuentran en 30.2° y 50.6° de acuerdo a la tarjeta #96-153-9832. Los picos correspondientes a zirconia monoclinica se indexaron con la tarjeta # 96-210-8454 en los ángulos 28.4° , 31.6° , 40.6° , 51.3° , 59.8° , 66.9° y 74.8° .

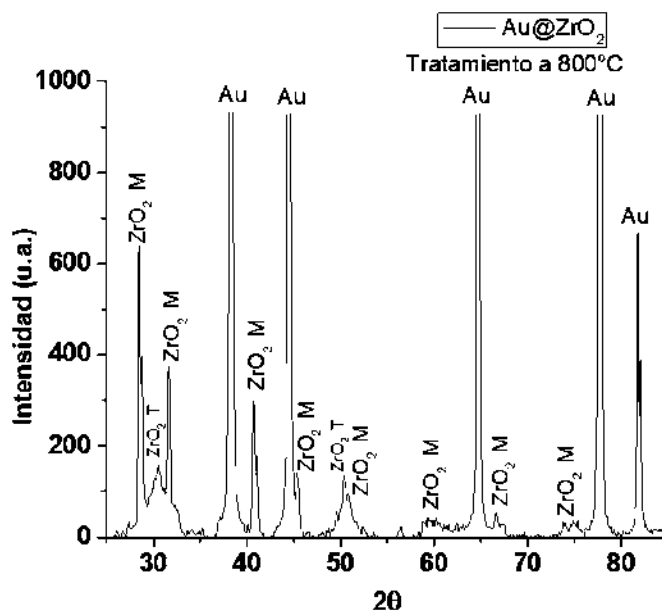


Figura 4. 47 Difractograma de las AuNps@ZrO₂ con tratamiento térmico a 800°C.

4.4 Síntesis del complejo Au-Clonix.

La síntesis de nanopartículas de oro ha sido ampliamente explorada debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones, sin embargo, en la actualidad se busca que dichos materiales sean multifuncionales principalmente con actividad biológica, a partir de ligantes y/o surfactantes con propósitos bien establecidos como luminiscencia, liberación de fármacos, enlace a células tangentes mediante proteínas, etc. Por lo cual, en este capítulo se adicionó clonixinato de sodio al medio de reacción para producir inicialmente un complejo con los iones de oro, que finalmente resultó en la generación de nanopartículas de oro funcionalizadas en la superficie mediante clonixinato de sodio, el cual su principal función será reducir los efectos secundarios inflamatorios de las células cancerígenas.

Para esta investigación se utilizó clonixinato de lisina como precursor, el cual es un medicamento que actúa impidiendo la formación de prostaglandinas en el organismo, ya que inhibe a la enzima ciclooxigenasa. Las prostaglandinas se producen en respuesta a una lesión o a ciertas enfermedades y provocan inflamación y dolor. Por lo que se espera que este fármaco ayude a disminuir los efectos inflamatorios asociados al cáncer.

Existe un trabajo previo realizado por Bedolla-Cázares [54], el cual fue de apoyo en sus metodologías para obtener los productos deseados en la presente investigación, ellos en ese caso sintetizan nanopartículas de plata a partir de quitosano y nitrato de plata cristalino sólido

(AgNO₃, 99%), ahora bien, mediante las raíces de *H. longipes*, (comúnmente conocida como Chilcuague o "Raíz de Oro"), realizaron una maceración con hexano (250 ml) durante 3 días y posteriormente las filtraron para finalmente producir un aceite amarillento (afinin), el cual mezclaron con AgNO₃ y acetonitrilo en reflujo por 24 h, para seguidamente realizar lavados y separar el sólido amorfo café, el cual caracterizaron demostrando el enlace de la plata con el afinin, y cuyo proceso posterior fue mezclar dicho sólido con quitosano expuestos a luz solar por 2 h, hasta obtener la síntesis de nanopartículas de plata, como paso final ellos realizaron un electrohilado hasta obtener nanofibras.

Si bien este trabajo previo fue utilizado como modelo para la producción de las AuNps a partir de complejos órgano-metálicos, cabe destacar que se realizó una metodología nueva ya que no existe algún trabajo en la literatura que sea similar al que se presentará a continuación.

4.4.1 Obtención de clonixin y clonixinato de sodio.

Como ya se mencionó en la parte experimental se obtuvo inicialmente el clonixin aislado de las pastillas de clonixinato de lisina, el cual presentó una coloración blanca con punto de fusión en 235 °C (Figura 4.48). Finalmente, el producto deseado para la síntesis de nanopartículas es el clonixinato de sodio, el cual presentó una coloración amarilla y punto de descomposición de 250 °C (Figura 4.49). Se anexan algunas figuras ilustrativas de los polvos.

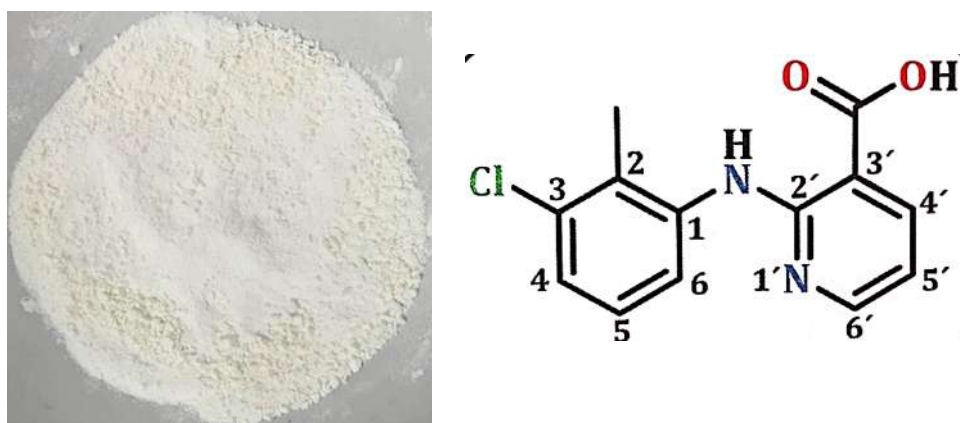


Figura 4. 48 Polvo de clonixin aislado de clonixinato de lisina y su estructura química.

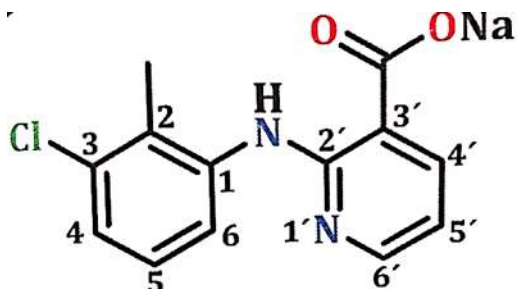


Figura 4. 49 Polvo de clonixinato de sodio y su estructura química.

4.4.2 Preparación del complejo Au-Clonix.

Para la síntesis del complejo, como ya se mencionó anteriormente se utilizó clonixinato de sodio el cual se mezcló con la solución precursora de Au, transcurridas las 48 h de reacción y seguido de la separación de fases, se obtuvo el polvo color marrón (Figura 4.50), al cual se le midió el punto de descomposición en 203 °C. Cabe destacar, que se midió el pH de la reacción de formación del complejo, al inicio se tenía un pH de 7 y al final de la reacción presentó un pH de 8, adicional a esta medición se apreció la liberación de gas, el cual ligeramente formaba gotas en la boquilla del matraz, midiendo en esa zona el pH indicó 4, lo que confirmó, la teoría de la liberación de HCl para permitir el enlace del oro, en la molécula de clonixinato de sodio.

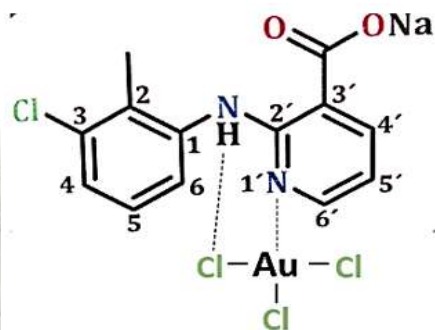


Figura 4. 50 Polvo del complejo sintetizado Au-Clonix y su propuesta de estructura química.

Posteriormente, se analizaron 8 solventes para determinar su solubilidad, generando los resultados de la tabla 4.4.

Tabla 4. 4 Solubilidad del complejo Au-Clonix mediante diversos solventes.

Solvente	Solubilidad
Agua desionizada	Soluble
Acetato de etilo	Soluble
Metanol	No soluble
Acetona	Soluble
Acetonitrilo	Soluble
Hexano	No soluble
DMSO	No soluble

Este proceso se llevó a cabo colocando 0.1g de muestra con 3 ml de solvente agitándose por 3 min, hasta observar si había o no solubilidad del compuesto. Como se aprecia en la tabla anterior, el agua desionizada es uno de los solventes del complejo, lo cual evita adicionar algún solvente extra a la reacción para la producción de nanopartículas de oro, ya que el extracto y la sal precursora de oro están disueltos en agua desionizada, lo cual hace más favorable la reacción.

4.4.3 Difracción de Rayos X

Mediante esta técnica se trató de identificar la formación de algunos cristales en la reacción, sin embargo, se tuvo muy poca intensidad proveniente de las muestras (Figura 4.51a-b), las cuales no se lograron indexar en la base de datos del mismo equipo del IIMM. Los especímenes, se corrieron por una hora para garantizar el aumento de señales, sin embargo, no hubo mejores resultados. No obstante, lo que se determinó, fue que la intensidad de los picos disminuyó en el difractograma con Au-Clonix respecto a la de clonixinato de sodio, lo cual podría significar alguna interacción con el oro, debida a la formación del complejo.

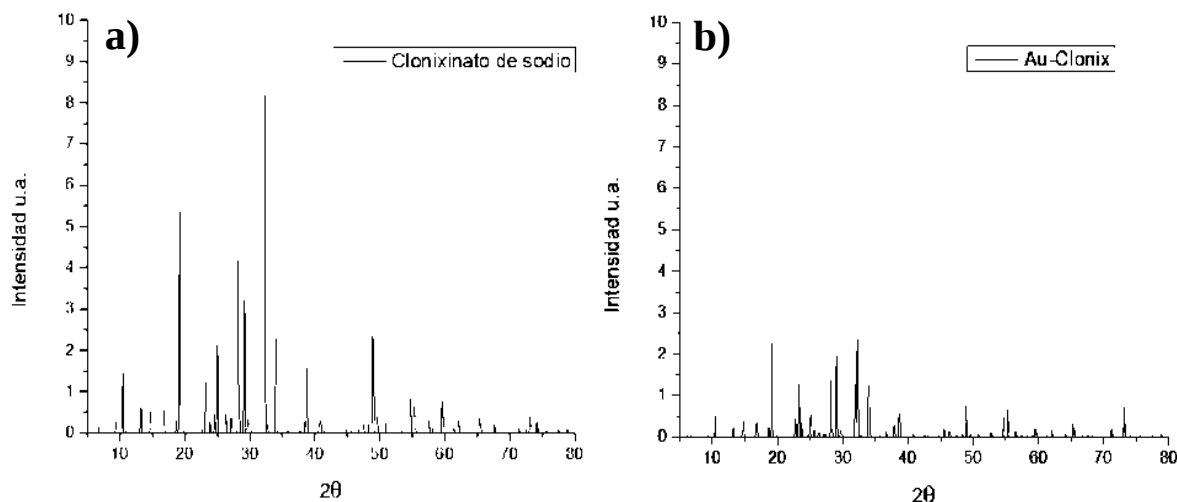


Figura 4. 51 Difractograma de rayos X de Clonixinato de Na a) y complejo Au-Clonix b).

4.4.4 Espectroscopía de Infrarrojo

Una caracterización importante es el análisis del cambio de las bandas de IR respectivas a los enlaces del clonixinato de sodio al complejo Au-Clonix, en las cuales se apreciaron variaciones significativas.

En el espectro de la Figura 4.52a, se presenta las bandas características del clonixinato de sodio, presentando tensiones asimétricas y simétricas del grupo carboxilato en 1590 y 1396 cm^{-1} , además de las vibraciones respectivas al doble enlace de carbono con nitrógeno del anillo de piridina en 1517 y 1316 cm^{-1} , respectivamente, por otra parte, también se aprecian las señales de los enlaces de C-NH-C en 1253 cm^{-1} , N-H en 1014 cm^{-1} y C-N en 1186 cm^{-1} [85, 86]. En el inciso b) de ésta figura, se muestra el espectro de la muestra Au-Clonix, el cual presenta bandas características para el clonixinato de sodio, pero se observa un ligero cambio en el desplazamiento de las bandas al doble enlace de carbono con nitrógeno del anillo de piridina en 1518 y 1318 cm^{-1} , respectivamente, apreciándose ligeras diferencias en las señales de los enlaces de C-NH-C en 1260 cm^{-1} y N-H en 1015 cm^{-1} ; dichas bandas no se modificaron de manera significativa lo que indica que, el enlace con el oro no se realizó por medio de esos átomos. Sin embargo, se observa una banda muy intensa en 1100 cm^{-1} , la cual corresponde al fragmento del anillo de piridina, este cambio se debe a la presencia del centro metálico, lo cual indica que se encuentra coordinado a través del átomo de nitrógeno del anillo de piridina, desapareciendo las bandas del clonixinato de sodio que se encontraban en 1176 , 1151 y 1137 cm^{-1} . Además, debido a las bandas observadas en la región de 3000 a

3500 cm^{-1} se propone una interacción de puente de hidrógeno por parte de la amina y los cloros de la sal metálica, los cuales están interactuando en el complejo Au-Clonix.

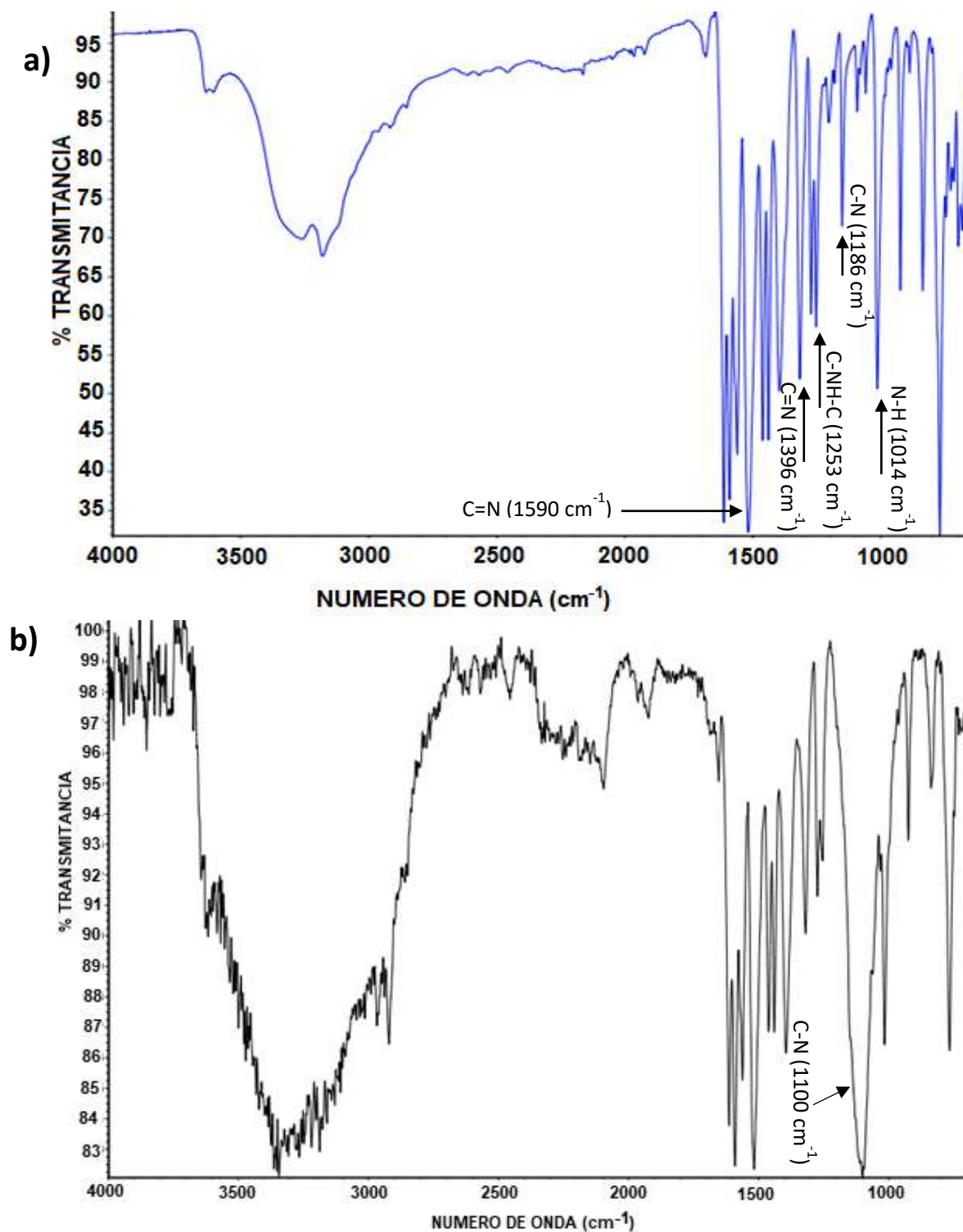


Figura 4. 52 Espectros de IR de clonixinato de sodio a) y complejo Au-Clonix b).

4.4.5 EDS mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Utilizando el equipo de MEB se logró obtener las señales elementales de la muestra Au-Clonix, como se aprecia en la Figura 4.53 se distingue que los principales elementos mayoritarios son O, N, Na y Au. Confirmando que en efecto que el oro esta interactuando con el clonixinato de sodio y que se encuentra enlazado en la muestra. Cabe destacar que se analizaron diferentes zonas de la muestra y todas arrojaron el mismo resultado elemental. Aunque se sabe que es un resultado semicuantitativo, bien sirve para poder corroborar la teoría de formación del complejo el cual se discutió anteriormente en la sección de IR.

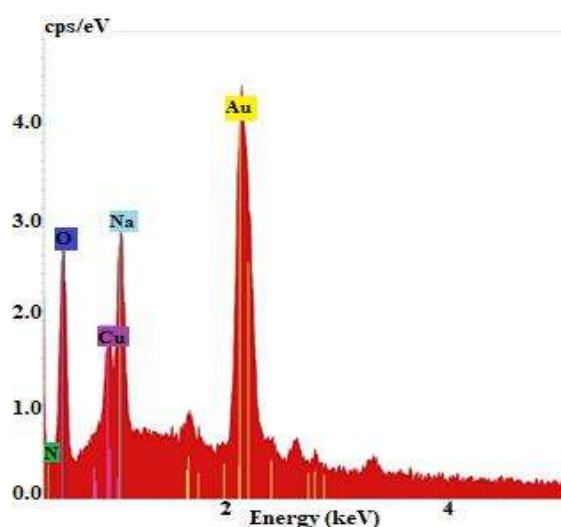


Figura 4. 53 EDS del complejo Au-Clonix.

4.4.6 Síntesis de AuNps a partir del complejo Au-Clonix.

Como se mencionó anteriormente en la metodología, para la formación de nanopartículas de oro mediante el complejo Au-Clonix se le adicionó extracto de *Cuphea aequipetala*, inicialmente la coloración del complejo disuelto en agua desionizada era ligeramente rosa y cuando se le agregó el extracto de la planta hubo un cambio a ligeramente guinda, dicha muestra se analizó después de 30 min de reacción mediante espectroscopía UV-Vis.

4.4.7 Espectroscopía de UV-Vis

Posterior al ligero cambio de color en la solución, se procedió a analizar la muestra mediante esta técnica, con la cual se distingue que el pico de plasmón superficial está en 511 nm, lo cual indica tamaño pequeño de nanopartículas [87] y el ancho de la banda esta cercano a 110

nm significando que existe quizá alguna homogeneidad en la distribución de formas y tamaños de los materiales sintetizados (Figura 4.54).

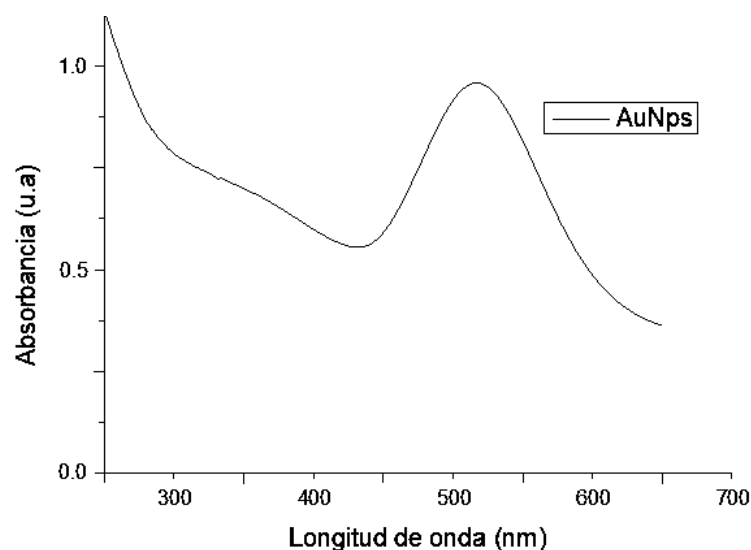


Figura 4. 54 Espectro de nanopartículas de oro sintetizadas mediante el complejo Au-Clonix.

4.4.8 Microscopía Electrónica de Barrido

Se analizó la muestra en MEB después de confirmar la formación de nanopartículas de oro mediante espectroscopía UV-Vis. En la Figura 4.55a se puede distinguir que existe una amplia dispersión de las nanopartículas en la muestra y cúmulos de nanomateriales. Lo que se aprecia mejor en la ampliificación mostrada en la figura 4.55b, donde se observan nanopartículas individuales muy cercanas unas de otras en forma esférica con tamaños cercanos a 10 nm que no coalescieron, en la Figura 4.55c se observa a una mayor ampliificación, tamaños de las AuNps efectivamente de 10 nm. Este resultado es alentador ya que significa que al realizar complejos de oro con el método que se está empleando, se pueden producir nanomateriales de menores tamaños, quizá debido a que los iones de oro no están tan libres para que rápidamente se formen núcleos de oro y haya un crecimiento acelerado de las nanopartículas, mientras que, al contrario, al haber un atrapamiento (enlace) del oro, los núcleos son más pequeños y el crecimiento lento genera nanomateriales de tamaños menores. Por otra parte algunos de los agentes surfactantes pudieran ser los mismos extremos del clonixinato de sodio impidiendo estéricamente la coalescencia del nanomaterial con otras

partículas cercanas, lo que se demuestra en la Figura 4.55b, ya que las nanopartículas no están coalesciendo si no que están separadas unas de otras a pesar de estar tan cerca, con tamaño homogéneo y pequeño, evitando así un crecimiento de Oswald-Ripening donde algunas nanopartículas grandes pudieran coalescer con otras más pequeñas. Finalmente, en el apartado de la Figura 4.55d, se aprecia en el EDS que el elemento mayoritario del nanocrystal sintetizado es Au, confirmando la síntesis de nanopartículas de oro.

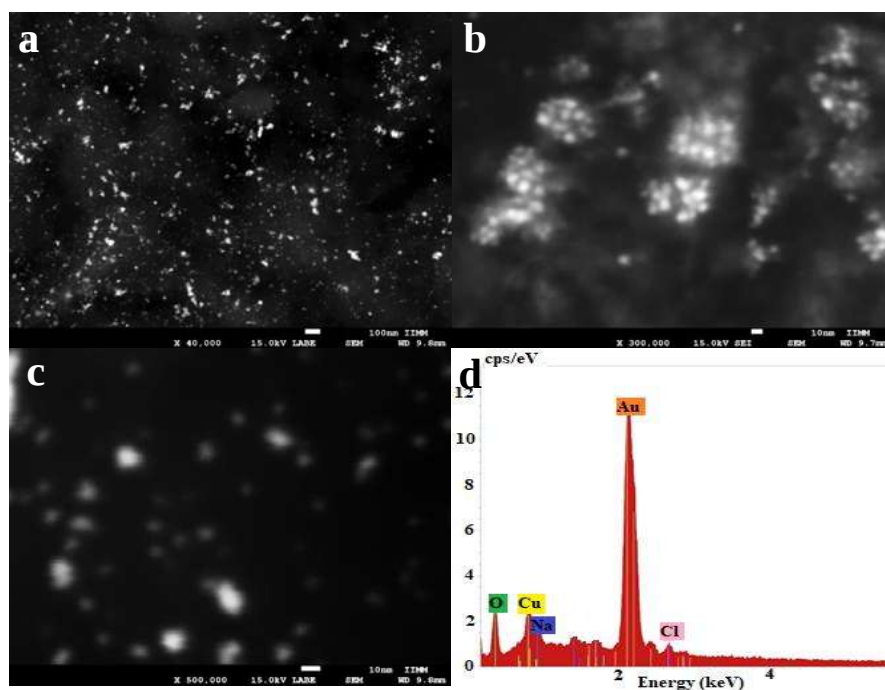


Figura 4. 55 Micrografías de nanopartículas sintetizadas mediante complejo Au-Clonix, a)40 000X, b) 300 000X, c) 500 000X y d) EDS de la muestra.

4.4.9 Microscopía Electrónica de Transmisión

Finalmente, en la figura 4.56a-c se presentan las micrografías mostrando que las nanopartículas tienen un crecimiento de múltiple maclado y con tamaños menores a 25 nm, semiesféricas en su mayoría. La ventaja de este tipo de síntesis es que permite tener un crecimiento nanopartículas controlado manteniendo poca diversidad de morfologías debido a que los agentes surfactantes están generando enlaces de coordinación con el oro, los cuales permiten una cantidad limitada de núcleos, evitando coalescencia, mediante concentraciones relativamente bajas. En la misma figura 4.56 en el apartado d) se presenta una nanopartícula con multiple maclado a la cual se le aplicó resolución de la misma (su forma tiende a ser

esférica), distinguiendo perfectamente las distancias interplanares del elemento Au siendo esta de 2.36 Å (denotado entre líneas), que se obtuvo mediante la transformada rápida de Fourier de las familias de planos [111] correspondientes a la estructura cristalina cúbica centrada en las caras.

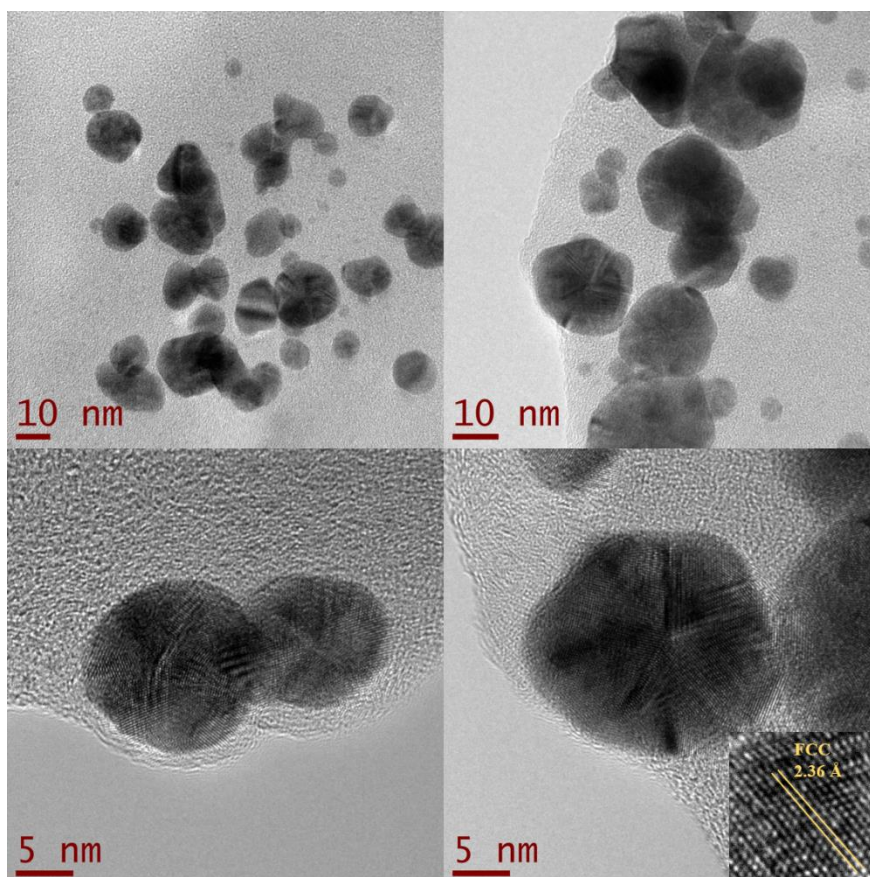


Figura 4. 56 Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de Au mediante química de coordinación.

Este método de síntesis por mezcla de precursores y generando enlaces de coordinación permite mantener a las nanopartículas de tamaño pequeño por bastante tiempo (12 meses), la muestra se preservó en polvo y se pudo analizar que a diferencia de la síntesis verde estas partículas no coalescen en periodos cortos de tiempo. Sin duda alguna, este método mediante fármacos será de gran utilidad para aplicaciones biológicas. A lo largo de este trabajo experimental desarrollado en este capítulo y los anteriores, se logró efectivamente desarrollar nuevos materiales con propiedades bastante interesantes, cumpliendo con todos los objetivos planteados para el programa de Doctorado. Sintetizando, caracterizando y evaluando 3 tipos de nanomateriales con cubiertas teragnósticas para futuras aplicaciones biológicas.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

En la presente investigación se lograron sintetizar nanopartículas de oro con un tamaño aproximadamente menor a 25 nm, con forma semiesférica y crecimiento de múltiple maclado a partir de una concentración de solución precursora de oro a 5 mM y 0.02 g/ml de extracto en una relación volumétrica 1:1, respectivamente, utilizando como agente precursor y estabilizador la planta de *Cuphea aequipetala*, siendo caracterizadas mediante las técnicas de UV-Vis, FT-IR, DRX, MET y TEM, llevando a cabo la síntesis a temperatura ambiente, sin agitación y reduciendo los iones de oro en aproximadamente 1 min, lo que resulta totalmente novedoso y efectivo para elaborar nanomateriales de oro, aprovechando los azúcares reductores y los compuestos aromáticos del extracto como agentes reductores y estabilizadores.

Es importante mencionar que las pruebas que se realizaron mediante análisis fitoquímico cualitativo de la planta, son satisfactorias ya que se encontró positivo a todos los compuestos estudiados, sin embargo, hace falta realizar más estudios de los compuestos del extracto de la planta para poder identificar cuáles son aquellos que ayudan a reducir y estabilizar de manera tan rápida los nanomateriales de oro.

Por otra parte, a las nanopartículas de oro se les incorporó rosa de bengala en la superficie, siendo 5 ml la cantidad eficiente para no saturar y agregar las nanopartículas. Cabe destacar que con base en la experiencia de síntesis de nanopartículas no se realizaron variaciones de la concentración de los materiales precursores.

El valor de potencial Z que se obtuvo de las nanopartículas de oro con rosa de bengala es alentador ya que si las AuNps son estables con colorante podría significar resultados favorables para aplicaciones en diversas líneas celulares, potenciando la luminiscencia del complejo AuNpsRB. Es destacable que en la literatura ningún estudio ha cubierto nanopartículas de oro con rosa de bengala para aplicaciones teragnósticas, por lo cual los resultados son bastante novedosos.

Las pruebas en el microscopio confocal demuestran que efectivamente las señales emitidas por las nanopartículas de oro serán detectables totalmente para los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer de cérvix a las longitudes de onda en el rango ultravioleta. Se concluye que en efecto podrían utilizarse las AuNps para generar muerte celular en las células de cáncer HeLa, sin embargo, aún faltan algunas condiciones por probarse.

Como era de esperarse, los resultados obtenidos con los nanomateriales de oro en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* arrojan el nulo efecto antibacterial, de esta manera, no se generarían falsos positivos asociados al extracto remanente, para que en futuros trabajos se apliquen estos materiales en líneas celulares cancerígenas, dejando claro que las AuNps deben estar correctamente centrifugadas, para que no haya iones remanentes de sal precursora que puedan causar efectos de muerte celular inducida.

Se demuestra, que las nanopartículas de oro no son citotóxicas por sí solas y que tienen buena compatibilidad con diferentes modelos celulares, sin embargo, se logró apreciar que si hay un incremento de temperatura con la irradiación en 15 minutos con la muestra y levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, se propone para futuras investigaciones disminuir el medio de cultivo o aumentar la concentración de AuNps para ver si se logra alcanzar una mayor temperatura a los 37 °C, ya que hasta esta misma, las levaduras son termotolerantes.

Las síntesis de nanopartículas de Au-ZrO₂, permite esclarecer que por lo menos se probó la teoría de que los compuestos del extracto pudieran funcionar como agentes competitivos para la precipitación de la zirconia, como ya se mencionó con anterioridad esta síntesis asistida por extracto es nueva y en la literatura no hay antecedentes directos a este proceso. Mediante espectroscopía de UV-Vis, se distinguieron 2 bandas características del plasmón superficial de los nanomateriales de oro y zirconia en 420 nm para el ZrO₂ y 535 nm para las estructuras de Au. Mediante MEB, se aprecia que se tienen nanosólidos de Au, con formas esféricas de 20 nm y nanocristales de mayor tamaño cercano a 300 nm con formas de platos truncos.

El análisis de IR corroboró el enlace de ZrO₂ con las nanopartículas de oro obtenidas mediante extracto de *C. aequipetala* lo cual demuestra eficacia en la mejora del proceso de síntesis con el tratamiento a 800°C. Mediante microscopía electrónica de barrido convencional se apreciaron las AuNps aunque no se distingue en específico que la zirconia

esté en la superficie, esta técnica permite detectar que la síntesis fue efectiva para nanopartículas esféricas de Au. Adicionalmente se confirma, que el uso de TEOS como agente competitivo agiliza la precipitación de la zirconia.

La extracción del Clonixin a partir de pastillas de clonixinato de lisina se realizó de manera efectiva, lo cual posteriormente sirvió para lograr adicionarle el Na formando la molécula de clonixinato de sodio, esta estructura fue la que enlazamos al precursor de Au, generando el complejo Au-Clonix, dicho complejo es de gran interés ya que en la literatura no se ha reportado el desarrollo de este tipo de molécula, las caracterizaciones de IR determinaron que efectivamente se había realizado el enlace confirmándose en las modificaciones de las señales cercanas a los $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y 1100 cm^{-1} . Cabe mencionar que el complejo Au-Clonix se combinó con extracto de *Cuphea aequipetala* como agente reductor y estabilizador de nanopartículas de oro las cuales tuvieron un tamaño cercano a los 10 nm, este proceso se llevó a cabo, dado que los iones de oro, no se encontraban de manera libre en el medio, sino que reaccionaban lentamente unos con otros debido a interferencia entre las interacciones estéricas de las moléculas de clonixinato de sodio, impidiendo de manera favorable la formación rápida de núcleos de Au, lo que permitió obtener a su vez nanopartículas con tamaño reducido.

A partir de la medición por espectroscopía UV-Vis, posterior al cambio de color en la solución, se logró determinar que el tamaño de las nanopartículas sintetizadas eran de tamaño pequeño ya que el pico de plasmón superficial presentó un desplazamiento hacia el ultravioleta en 511 nm, confirmando la presencia de Au, N, Cl, C y Na mediante EDS lo cual es de gran importancia ya que esos elementos constituyen las moléculas que interactuaron para la formación del complejo y de las nanopartículas.

Mediante las pruebas de microscopía confocal se logró determinar que la Rosa de bengala no tuvo aporte en la fluorescencia de las nanopartículas de oro y además se confirmó que no hubo daño citotóxico en las líneas celulares mediante los materiales que se les adicionaron en el medio, lo cual concuerda con la literatura respecto a que el Au es biocompatible y que no produce daño celular.

Se puede definir de acuerdo a los resultados mostrados, que la síntesis de AuNps mediante extracto de *Cuphea aequipetala* sigue siendo totalmente replicable y que las partículas tienen un tamaño inferior a 20 nm.

Por otra parte, la radiación de las muestras con el láser de 808 nm efectivamente genera calentamiento de las nanopartículas de oro alcanzando temperaturas cercanas a 47 °C con un tiempo de exposición de 15 min, debido a que el Au posee un alto coeficiente de extinción molar y una absorción óptica sintonizable en la región del infrarrojo cercano, lo que hace que se exciten los electrones del plasmón superficial de las nanopartículas, lo que nos indica que podrán servir como método de eliminación de células con cáncer.

Por el contrario, usando los láseres a 532 nm y 390 nm no se generó calentamiento de las nanopartículas, pero favorablemente se puede utilizar el láser ultravioleta para modificar los tamaños y formas de las nanopartículas, hasta ahora solamente se pudieron apreciar formas triangulares, tetraédricas y cuasi esféricas, sin embargo, podrían hacerse modificaciones para tratar de lograr un solo tamaño y quizá una sola forma, ya que en la literatura se ha encontrado que se pueden llegar a tener esos efectos pero con largos periodos de exposición al láser cercanos a 3 horas y más, sin embargo, no se logró probar mediante la lámpara con la que se cuenta, ya que no es para largos tiempos de encendido, por lo cual podría probarse con un láser que si pueda permanecer largos tiempos en funcionamiento.

4.5 Metas científicas cumplidas

- ✓ Obtener nanopartículas de oro homogéneas con tamaño menor a 50 nm por medio de plantas y complejos.
- ✓ Conocer cuantitativamente los componentes fitoquímicos y bromatológicos del extracto de las plantas y complejos.
- ✓ Obtener respuesta térmica de los nanomateriales de oro cercana a 50°C
- ✓ Alcanzar niveles altos de luminiscencia de los nanomateriales de oro recubiertos para ser detectables mediante Microscopía confocal y termografías.
- ✓ Determinar el efecto citotóxico que en levaduras, bacterias y células de cáncer HeLa.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. Boraschi, B. J. Swartzwelter, P. Italiani. Interaction of engineered nanomaterials with the immune system: Health-related safety and possible benefits. *Current Opinion in Toxicology*. 10, 74-83, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.02.002>.
- [2] P. Das, P. Fatehbasharad, M. Colombo, L. Fiandra, D. Prosperi. Multifunctional Magnetic Gold Nanomaterials for Cancer. *Trends in Biotechnology*. 37(9), 995-1010, 2019. 10.1016/j.tibtech.2019.02.005.
- [3] P. Kumar, K.-H. Kim, V. Bansal, T. Lazarides, N. Kumar. Progress in the sensing techniques for heavy metal ions using nanomaterials. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 54, 30-43, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.06.010>.
- [4] M. Saravanan, H. Barabadi, B. Ramachandran, G. Venkatraman, K. Ponmurugan. En; Chapter Eleven - Emerging plant-based anti-cancer green nanomaterials in present scenario. S. K. Verma, A. K. Das. ed. Elsevier. 291-318. 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.09.001>.
- [5] M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi. En; Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology. M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, M. Atarod. ed. Elsevier. 1-27. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>.
- [6] F. C. Adams, C. Barbante. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 86, 3-13, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.04.008>.
- [7] A. M. Grumezescu. *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. ed. Elsevier Science. 2018. .
- [8] V. V. Pokropivny, V. V. Skorokhod. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*. 27(5), 990-993, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.09.023>.
- [9] Y. Wang, Y. Xia. *Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals*. ed. 2004. 10.1021/nl048689j.
- [10] N. Abid, A. M. Khan, S. Shujait, K. Chaudhary, M. Ikram, M. Imran, J. Haider, M. Khan, Q. Khan, M. Maqbool. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 300, 102597, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597>.
- [11] W. Yu, H. Xie. A Review on Nanofluids: Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. *Journal of Nanomaterials*. 2012, 17, 2012. 10.1155/2012/435873.

- [12] J. L. V. Ríos, F. J. E. García. Catálogo de malezas de México. ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998. .
- [13] T. D. Alvarado, M. D. Mariezcurrena Berasain, A. Z. M. Salem, D. L. Pinzón Martínez. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Two Medicinal Plants *Cuphea aequipetala* var. *hispida* (Cav.) Koehne and *Eryngium comosum* Delaroché F Against Bacteria Related to Equine Infections. *Journal of Equine Veterinary Science*. 94, 103269, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103269>.
- [14] C. M. Alonso, F. L. Ochoa. Plantas medicinales de México II: composición, usos y actividad biológica. ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 1999. .
- [15] B. Yao, X. Hu, J. Liu, K. Chen, J. Liu. Preparation and properties of high refractive index ZrO₂ nano-hybrid materials. *Materials Letters*. 261, 126878, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.126878>.
- [16] N. Liao, B. Qiu, M. Nath, Y. Li, S. Sang. Effects of nano ZrO₂ content on the comprehensive properties of BN-SiC composites. *Journal of Alloys and Compounds*. 813, 152180, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.152180>.
- [17] L. M. Cayetti, A. R. De Los Santos, M. L. Martí, G. Di Girolamo, V. Niselman. Lysine clonixinate versus aspirin in the treatment of gonarthrosis. *Current Therapeutic Research*. 56(9), 894-905, 1995. [https://doi.org/10.1016/0011-393X\(95\)85093-7](https://doi.org/10.1016/0011-393X(95)85093-7).
- [18] C. Lepetit, V. Maraval, Y. Canac, R. Chauvin. On the nature of the dative bond: Coordination to metals and beyond. The carbon case. *Coordination Chemistry Reviews*. 308, 59-75, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.07.018>.
- [19] D. M. S. J. Gabino A. Carriedo Ule, D. M. S. José. Curso de iniciación a la química organometálica. ed. Servicio de Publicaciones, Universidad de Oviedo. 1995. .
- [20] D. Mateo, P. Morales, A. Ávalos, A. I. Haza. Nanopartículas de oro: Aplicaciones y citotoxicidad in vitro. ed. 2014. .
- [21] G. J. Higby. Gold in medicine. *Gold Bulletin*. 15(4), 130-140, 1982. 10.1007/bf03214618.
- [22] L. Bertel Garay, S. C. Méndez Sánchez, F. Martínez Ortega. Use in vitro of Gold Nanoparticles Functionalized with Folic Acid as a Photothermal Agent on Treatment of HeLa Cells. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 62, 2018. .
- [23] P. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, science and applications*. 1, 45-65, 2008. .

- [24] F.-Y. Kong, J.-W. Zhang, R.-F. Li, Z.-X. Wang, W.-J. Wang, W. Wang. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland). 22(9), 1445, 2017. 10.3390/molecules22091445.
- [25] C. Sharma, R. Dhiman, N. Rokana, H. Panwar. Nanotechnology: An Untapped Resource for Food Packaging. *Frontiers in microbiology*. 8, 1735-1735, 2017. 10.3389/fmicb.2017.01735.
- [26] C. Sharma, R. Dhiman, N. Rokana, H. Panwar. Nanotechnology: An Untapped Resource for Food Packaging. ed. 2017. 10.3389/fmicb.2017.01735.
- [27] S. Jung, J. Nam, S. Hwang, J. Park, J. Hur, K. Im, N. Park, S. Kim. Theragnostic pH-Sensitive Gold Nanoparticles for the Selective Surface Enhanced Raman Scattering and Photothermal Cancer Therapy. ed. 2013. 10.1021/ac401390m.
- [28] L. Mocan, C. T. Matea, D. Bartos, O. Mosteanu, T. Pop, T. Mocan, C. Iancu. Advances in cancer research using gold nanoparticles mediated photothermal ablation. *Clujul medical* (1957). 89(2), 199-202, 2016. 10.15386/cjmed-573.
- [29] L. Mocan, C. T. Matea, D. Bartos, O. Mosteanu, T. Pop, T. Mocan, C. Iancu. Advances in cancer research using gold nanoparticles mediated photothermal ablation. *Clujul Med*. 89(2), 199-202, 2016. 10.15386/cjmed-573.
- [30] G. Sharma, R. Dave, J. Sanadya, P. Sharma, K. Sharma. Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 1(2), 109-126, 2010. .
- [31] P. Sánchez-Moreno, J. de Vicente, S. Nardecchia, J. A. Marchal, H. Boulaiz. Thermo-Sensitive Nanomaterials: Recent Advance in Synthesis and Biomedical Applications. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland). 8(11), 935, 2018. 10.3390/nano8110935.
- [32] V. P. Torchilin. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature reviews. Drug discovery*. 13(11), 813-827, 2014. 10.1038/nrd4333.
- [33] J. Chomoucka, J. Drbohlavova, D. Huska, V. Adam, R. Kizek, J. Hubalek. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 62(2), 144-149, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.014>.
- [34] C. Martinelli, C. Pucci, G. Ciofani. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL bioengineering*. 3(1), 011502-011502, 2019. 10.1063/1.5079943.
- [35] T. Bu, M. Zhang, Y. Tian, F. Bai, P. Jia, Y. Bai, T. Zhe, L. Wang. Gold nanoparticles-functionalized microorganisms assisted construction of immunobiosensor for sensitive detection of ochratoxin A

in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 299, 126969, 2019. 10.1016/j.snb.2019.126969.

[36] S. Li, Y. Zhang, W. Wen, W. Sheng, J. Wang, S. Wang, J. Wang. A high-sensitivity thermal analysis immunochromatographic sensor based on au nanoparticle-enhanced two-dimensional black phosphorus photothermal-sensing materials. *Biosensors and Bioelectronics*. 133, 223-229, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.039>.

[37] A. M. Elsied, P. C. Dieffenbach, P. K. Diwakar, A. Hassanein. Nanosecond laser-metal ablation at different ambient conditions. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 143, 26-31, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.02.012>.

[38] A. Bogaerts, Z. Chen, R. Gijbels, A. Vertes. Laser ablation for analytical sampling: what can we learn from modeling? *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 58(11), 1867-1893, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2003.08.004>.

[39] S. Medici, M. Peana, D. Coradduzza, M. A. Zoroddu. Gold nanoparticles and cancer: Detection, diagnosis and therapy. *Seminars in Cancer Biology*. 76, 27-37, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.06.017>.

[40] M. Zhang, T. Bu, F. Bai, S. Zhao, Y. Tian, K. He, Y. Zhao, X. Zheng, L. Wang. Gold nanoparticles-functionalized three-dimensional flower-like manganese dioxide: A high-sensitivity thermal analysis immunochromatographic sensor. *Food Chemistry*. 341, 128231, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128231>.

[41] J. Simon, B. Anugop, V. P. N. Nampoori, M. Kailasnath. Effect of pulsed laser irradiation on the thermal diffusivity of bimetallic Au/Ag nanoparticles. *Optics & Laser Technology*. 139, 106954, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.106954>.

[42] J. T. Poolman. En; *Escherichia coli*. S. R. Quah. ed. Oxford. Academic Press. 585-593. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>.

[43] J. A. F. Sutton, O. T. Carnell, L. Lafage, J. Gray, J. Biboy, J. F. Gibson, E. J. G. Pollitt, S. C. Tazoll, W. Turnbull, N. H. Hajdamowicz, B. Salamaga, G. R. Pidwill, A. M. Condliffe, S. A. Renshaw, W. Vollmer, S. J. Foster. *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*. 17(3), e1009468, 2021. 10.1371/journal.ppat.1009468.

[44] A. G. Mainous, W. J. Hueston, C. J. Everett, V. A. Diaz. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S aureus* in the United States, 2001–2002. *The Annals of Family Medicine*. 4(2), 132-137, 2006. .

- [45] P. N. Reddy, K. Srirama, V. R. Dirisala. An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment*. 10, 1179916117703999, 2017. .
- [46] H. K. Kim, D. Missiakas, O. Schneewind. Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunological methods*. 410, 88-99, 2014. .
- [47] H. Karathia, E. Vilaprinyo, A. Sorribas, R. Alves. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One*. 6(2), e16015, 2011. 10.1371/journal.pone.0016015.
- [48] S. Mohammadi, B. Saberidokht, S. Subramaniam, A. Grama. Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC Systems Biology*. 9(1), 96, 2015. 10.1186/s12918-015-0253-0.
- [49] P. Nambisan. En; Chapter 13 - Relevance of Intellectual Property Rights in Biotechnology. P. Nambisan. ed. Academic Press. 291-309. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809231-6.00013-2>.
- [50] T. T. V. Phan, V. T. Nguyen, S.-H. Ahn, J. Oh. Chitosan-mediated facile green synthesis of size-controllable gold nanostars for effective photothermal therapy and photoacoustic imaging. *European Polymer Journal*. 118, 492-501, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.023>.
- [51] H. Kitching, A. J. Kenyon, I. P. Parkin. The interaction of gold and silver nanoparticles with a range of anionic and cationic dyes. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 16(13), 6050-6059, 2014. 10.1039/C3CP55366C.
- [52] H. B. Lee, Y. M. Yoo, Y.-H. Han. Characteristic optical properties and synthesis of gold-silica core-shell colloids. *Scripta Materialia*. 55(12), 1127-1129, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2006.08.044>.
- [53] A. Ceja-Fdez, T. Lopez-Luke, J. Oliva, J. Vivero-Escoto, A. L. Gonzalez-Yebra, R. A. Rojas, A. Martinez-Perez, E. de la Rosa. Labeling of HeLa cells using ZrO₂:Yb(3+)-Er(3+) nanoparticles with upconversion emission. *J Biomed Opt*. 20(4), 046006, 2015. 10.1117/1.jbo.20.4.046006.
- [54] F. Bedolla-Cázares, P. E. Hernández-Marcelo, M. A. Gómez-Hurtado, G. Rodríguez-García, R. E. del Río, Y. López-Castro, J. P. García-Merinos, J. M. Torres-Valencia, J. B. González-Campos. Silver nanoparticles from AgNO₃-affinin complex synthesized by an ecofriendly route: chitosan-based electrospun composite production. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 19(3), 897-906, 2017. 10.1007/s10098-016-1285-x.
- [55] A. M. Silva, Oliveira, C. H. A., Fernandes, C. C. L., Costa, M. V. O., da Silva, F. F. M., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba

- (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore) fruit. *African Journal of Food Science*. 11(11), 353-361, 2017. <https://doi.org/10.5897/AJFS2017.1626>.
- [56] D. F. Susanto, H. W. Apamarta, A. Widjaja, S. Gunawan. Identification of phytochemical compounds in *Calophyllum inophyllum* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(9), 773-781, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.08.001>.
- [57] D. C. Neckers. Rose Bengal. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 47(1), 1-29, 1989. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)85002-6](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)85002-6).
- [58] K. Pate, P. Safier. En; 12 - Chemical metrology methods for CMP quality. S. Babu. ed. Woodhead Publishing. 299-325. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7>.
- [59] M. Bernal R, M. Guzmán. El Antibiógrama de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*. 4(3-4), 112-121, 1969. 10.7705/biomedica.v4i3-4.1891.
- [60] A facile seed growth method to prepare stable Ag@ZrO₂ core-shell SERS substrate with high stability in extreme environments. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 228, 117676, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117676>.
- [61] J. Liesche, M. Marek, T. Günther-Pomorski. Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Frontiers in Microbiology*. 6(107), 2015. 10.3389/fmicb.2015.00107.
- [62] S. Park, H. Kim, S. C. Lim, K. Lim, E. S. Lee, K. T. Oh, H. G. Choi, Y. S. Youn. Gold nanocluster-loaded hybrid albumin nanoparticles with fluorescence-based optical visualization and photothermal conversion for tumor detection/ablation. *J Control Release*. 304, 7-18, 2019. 10.1016/j.jconrel.2019.04.036.
- [63] B. Seo, K. Lim, S. S. Kim, K. T. Oh, E. S. Lee, H.-G. Choi, B. S. Shin, Y. S. Youn. Small gold nanorods-loaded hybrid albumin nanoparticles with high photothermal efficacy for tumor ablation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 179, 340-351, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.068>.
- [64] M. Mohajeri, B. Behnam, G. E. Barreto, A. Sahebkar. Carbon nanomaterials and amyloid-beta interactions: potentials for the detection and treatment of Alzheimer's disease? *Pharmacological Research*. 143, 186-203, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.023>.
- [65] Y. He, E. Du, X. Zhou, J. Zhou, Y. He, Y. Ye, J. Wang, B. Tang, X. Wang. Wet-spinning of fluorescent fibers based on gold nanoclusters-loaded alginate for sensing of heavy metal ions and anti-counterfeiting. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 230, 118031, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118031>.

- [66] T. A. Jacinto, C. F. Rodrigues, A. F. Moreira, S. P. Miguel, E. C. Costa, P. Ferreira, I. J. Correia. Hyaluronic acid and vitamin E polyethylene glycol succinate functionalized gold-core silica shell nanorods for cancer targeted photothermal therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 188, 110778, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110778>.
- [67] Y. Hernández, B. C. Galarreta. En; Chapter 4 - Noble Metal-Based Plasmonic Nanoparticles for SERS Imaging and Photothermal Therapy. R. M. Fratila, J. M. De La Fuente. ed. Elsevier. 83-109. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813928-8.00004-1>.
- [68] V. Sanchez-Mendieta, A. Vilchis-Nestor. 18. En; Green synthesis of noble metal (Au, Ag, Pt) nanoparticles assisted by plant extracts. Y.-H. Su. 1 ed. Shanghai, China. InTech. 391-407. 2012. .
- [69] D. Divakaran, J. R. Lakkakula, M. Thakur, M. K. Kumawat, R. Srivastava. Dragon fruit extract capped gold nanoparticles: Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells. *Materials Letters*. 236, 498-502, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.156>.
- [70] A. Rajan, A. R. Rajan, D. Philip. Elettaria cardamomum seed mediated rapid synthesis of gold nanoparticles and its biological activities. *OpenNano*. 2(Supplement C), 1-8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2016.11.002>.
- [71] M. Hamelian, S. Hemmati, K. Varmira, H. Veisi. Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using Pistacia Atlantica extract. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 93, 21-30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.07.018>.
- [72] Zeta potentials of the rare earth element fluorcarbonate minerals focusing on bastnäsite and parisite. *Advances in Colloid and Interface Science*. 256, 152 - 162, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.04.009>.
- [73] K. Xin Lee, K. Shameli, M. Miyake, N. Kuwano, N. B. Bt Ahmad Khairudin, S. E. Bt Mohamad, Y. P. Yew. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Garcinia mangostana* Fruit Peels. *Journal of Nanomaterials*. 2016, 8489094, 2016. 10.1155/2016/8489094.
- [74] Y. Zhang, T. P. S. Dasari, H. Deng, H. Yu. Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 33, 2015. 10.1080/10590501.2015.1055161.
- [75] S. Hameed, Y. Wang, L. Zhao, L. Xie, Y. Ying. Shape-dependent significant physical mutilation and antibacterial mechanisms of gold nanoparticles against foodborne bacterial pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) at lower concentrations. *Materials Science and Engineering: C*. 108, 110338, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110338>.

- [76] K. Zheng, M. I. Setyawati, D. T. Leong, J. Xie. Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano*. 11(7), 6904-6910, 2017. 10.1021/acsnano.7b02035.
- [77] J. C. Prata, C. Venâncio, J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos. Considerations when using microplates and Neubauer counting chamber in ecotoxicity tests on microplastics. *Marine Pollution Bulletin*. 170, 112615, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112615>.
- [78] D. G. Shchukin, R. A. Caruso. Inorganic Macroporous Films from Preformed Nanoparticles and Membrane Templates: Synthesis and Investigation of Photocatalytic and Photoelectrochemical Properties. *Advanced Functional Materials*. 13(10), 789-794, 2003. 10.1002/adfm.200304415.
- [79] G. Q. M. Lu, X. S. Zhao. *Nanoporous Materials: Science And Engineering*. ed. World Scientific Publishing Company. 2004. .
- [80] N. Khazeni, B. Mavis, G. Gündüz, Ü. Çolak. Synthesis of zirconium tungstate–zirconia core–shell composite particles. *Materials Research Bulletin*. 46(11), 2025-2031, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.006>.
- [81] J. Krajczewski, H. B. Abdulrahman, K. Kołataj, A. Kudelski. Zirconium(IV) oxide: New coating material for nanoresonators for shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 193, 480-485, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.064>.
- [82] C. Su, J. Li, D. He, Z. Cheng, Q. Zhu. Synthesis of isobutene from synthesis gas over nanosize zirconia catalysts. *Applied Catalysis A: General*. 202(1), 81-89, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(00\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(00)00461-0).
- [83] E. W. Leib, U. Vainio, R. M. Pasquarelli, J. Kus, C. Czaschke, N. Walter, R. Janssen, M. Müller, A. Schreyer, H. Weller, T. Vossmeier. Synthesis and thermal stability of zirconia and yttria-stabilized zirconia microspheres. *Journal of Colloid and Interface Science*. 448, 582-592, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.02.049>.
- [84] A. Bai, H. Song, G. He, Q. Li, C. Yang, L. Tang, Y. Yu. Facile synthesis of core–shell structured ZrO₂@SiO₂ via a modified Stöber method. *Ceramics International*. 42(6), 7583-7592, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.01.166>.
- [85] M. K. Trivedi, A. Branton, D. Trivedi, G. Nayak, K. Bairwa, S. Jana. Spectroscopic Characterization of Disulfiram and Nicotinic Acid after Biofield Treatment. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 6(5), 1000265, 2015. .

[86] S. M. Delphine, A. R. S. J. Rani Juliet, S. Janarthanan, R. S. Samuel. Study on growth, spectral, optical and thermal characterization of an NLO crystal: 6-Methyl nicotinic acid (6MNA). Optics & Laser Technology. 90, 133-135, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2016.11.013>.

[87] X. Xu, X. Ma, H. Wang, Z. Wang. Aptamer based SERS detection of Salmonella typhimurium using DNA-assembled gold nanodimers. Microchimica Acta. 185, 2018. 10.1007/s00604-018-2852-0.

PRODUCTOS OBTENIDOS

- ✓ Del Moral-G, T. López-Luke, A. Saavedra-Molina, M. A. Gómez-Hurtado, G. Rosas. Time-dependent eco-friendly method to produce Au nanometric assemblies with fluorescent properties. Journal of Crystal Growth. 564, 126130, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2021.126130>.

PROCEEDINGS

- ✓ Del Moral, A., Borjas-Garcia, S., & Rosas, G. (2018). Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Taraxacum officinale Extract. Microscopy and Microanalysis, 24(S1), 1740-1741. doi:10.1017/S1431927618009182
- ✓ Del Moral, A., Rosas, G., & Lopez, T. (2020). Effect of Temperature on the Green Synthesis of Gold Nanoparticles by Cuphea aequipetala Plant Extract. Microscopy and Microanalysis, 26(S2), 2290-2292. doi:10.1017/S1431927620021091

CURRICULUM VITAE

ESTUDIOS

Posgrado:

Doctorado en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH. Morelia, Michoacán. Desde 2019 hasta 2023.

Maestría en Metalurgia y Ciencias de los materiales.

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH. Morelia, Michoacán. Desde 2017 hasta 2019.

Universidad:

Ingeniería Bioquímica.

Instituto Tecnológico de Morelia “José María Morelos y Pavón”. Morelia, Michoacán. Desde 2011 hasta 2015.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

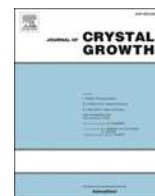
- Time-dependent eco-friendly method to produce au nanometric assemblies with fluorescent properties. Trabajo presentado en el XXX International Materials Research Congress y International Conference on Advanced Materials. Cancún, México del 14 al 19 de agosto de 2022.
- Efecto de la temperatura en la síntesis verde de nanopartículas de oro con extracto de Cuphea aequipetala. Congreso Internacional de la sociedad de química de México. Llevado a cabo del 30 de agosto al 3 de septiembre de 2021.
- Effect of temperature on the green synthesis of gold nanoparticles by Cuphea aequipetala plant extract. Nanotechnology and Nanoscience (iNano-2020) webinar programado del 19 al 20 de octubre de 2020, USA.

- Effect of Temperature on the Green Synthesis of Gold Nanoparticles by Cuphea Aequipetala Plant Extract. Participación en el Microscopy & Microanalysis 2020. USA, del 3 al 7 de agosto 2020.
- Green synthesis of gold nanostructures for drug delivery in breast cancer cells. Participación en el XVIII International Materials Research Congress, Cancún, Quintana Roo, del 18 al 23 de agosto de 2019.
- Síntesis verde de nanoestructuras de oro y caracterización fitoquímica de la planta Taraxacum officinale para aplicaciones biomédicas. Participación en el Congreso de Ingeniería y Física aplicada a la biomedicina en León, Guanajuato del 7 al 9 de mayo de 2019.
- Síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando el extracto de la planta Taraxacum officinale para aplicaciones biomédicas. Participación en el VIII Simposio Internacional de Bioingeniería en Morelia, Michoacán del 21 al 22 de noviembre del 2018.
- Antioxidant potential evaluation of Taraxacum officinale for green synthesis of gold. Participación en el Primer congreso internacional de Nanobioingeniería, Monterrey, Nuevo León, del 7 al 9 de noviembre de 2018.
- Synthesis of gold nanoparticles using of Taraxacum officinale and its comparative evaluation of the antioxidant potential. Participación en el XVII International Materials Research Congress, Cancún, Quintana Roo, del 19 al 24 de agosto de 2018.
- Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Taraxacum officinale extract. Participación en el Microscopy & Microanalysis 2018 Meeting, Baltimore, Maryland, USA, del 5 al 9 de agosto 2018.
- Síntesis de nanopartículas de oro mediante Taraxacum officinale y evaluación comparativa del potencial antioxidante de la planta. Participación en el Primer Congreso de la D.E.S. Ciencias Exactas, Metalurgia y Materiales. Morelia, Michoacán del 16 al 20 de abril del 2018.
- Evaluación del potencial antioxidante, cuantificación de fenoles totales y síntesis de nanopartículas de oro con Taraxacum officinale. Participación en el 12° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Morelia, Michoacán, octubre 2017.
- Evaluación del potencial antioxidante, cuantificación de fenoles totales y síntesis de nanopartículas de oro con Taraxacum officinale. Participación en el VII Simposio Internacional de Bioingeniería en Morelia, Michoacán del 27 al 29 de septiembre del 2017.

- Estancia en Verano Nicolaita de Investigación y presentación de artículo en libro de memorias del 24 de junio al 16 de agosto de 2013.
- Elaboración de jugo de mango incorporando proteínas de Orthoptera Acrididae. Participación en el XIV Evento de Investigación: Tecnología Alimentaria e Ingeniería Ambiental. En el Instituto Tecnológico de Morelia departamento de Ing. Bioquímica del 17 al 19 de noviembre 2015.

IDIOMAS

- Español
- Inglés Intermedio: Constancia examen Toefl ITP 523 puntos Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Visa Americano y Pasaporte Mexicano Vigentes hasta 2028.



Time-dependent eco-friendly method to produce Au nanometric assemblies with fluorescent properties

A. Del Moral-G^a, Tzarara López-Luke^a, Alfredo Saavedra-Molina^b, Mario A. Gómez-Hurtado^b, G. Rosas^{a,*}

^a Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Francisco J. Múgica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Francisco J. Múgica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

ARTICLE INFO

Communicated by K. Deppert

Keywords:

B1. Au Assemblies
B1. Nanomaterials
A1. Dendrites
B2. Eco-friendly method
A1. Fluorescence analysis

ABSTRACT

A time-dependent eco-friendly synthesis of Au assemblies was carried out using *Taraxacum officinale* plant extract in the present study. Au nanomaterials have potential applications in imaging therapy cancer diagnostics due to their biocompatibility and fluorescence response when irradiated with Ultraviolet light. Also, synthesis methods whose chemistry minimizes toxic residues are of interest to scientists, mainly when intended to use Au nanomaterials for biomedical treatments. Furthermore, the obtained products' fluorescence intensities were also measured to determine if they could be helpful biosensors. Scanning electron microscopy (SEM), Transmission electron microscopy (TEM), UV–Vis spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), Infrared spectroscopy (FTIR), Atomic absorption spectrophotometry (AAS), and Zeta potential (ZP) analyzed the obtained products. SEM shows Au self-assemblies with dendritic morphology and an average size of 158 nm. TEM images also confirm dendrites with flat-flower morphology with a thickness of around 10 nm. UV–Vis spectrum displays surface plasmon resonance (SPR) bands typical of Au nanostructures. XRD results further confirm the Au fcc nanostructure of dendrites. FTIR spectra show that the Au ions reduction compounds were sugars, proteins, and compounds with benzene rings. Also, AAS indicates 89% of conversion efficiency from Au ions to assemblies. Fluorescence analyses show that the Au nanostructures' intensities in 280 u.a. could be significant for widespread applications as fluorescent biosensors in therapy and imaging. Finally, the ZP value for Au assemblies was -26.6 mV indicating good colloidal stability at the end of the reaction.

1. Introduction

With the development of nanotechnology, Au-based nanomaterials have been used in different fields such as biosensors, drug delivery, therapy, and SERS templates for signal amplification [1–5]. New nanomaterials, synthesis methods, and potential applications emerge due to Au's novel and intriguing physicochemical properties in its nano state [6–10].

In this sense, the self-assembly systems can create complex 3D non-periodic, heterogeneous nanostructures for electronic or biological devices through mass production processes [11–13]. The nanostructures' properties are strongly dependent on the nanomaterials' morphology, size, and individual building blocks [14–16]. Self-assembly is the autonomous and spontaneous organization of nano-components in

patterns or structures [17]. It provides the basis for essential new industrial nanofabrication techniques integrated by the building blocks of individual nanostructures where one of their dimensions is below 100 nm [18]. In this way, the structural units can be 0D, 1D, or 2D [19].

Diverse protocols for synthesizing gold nanostructures include the use of various reducing agents as ascorbic acid [20,21], sodium citrate [22], sodium borohydride [1], hydroxylamine [23], L-Tyrosine [24], and ethylenediamine [25]; and stabilizing agents such as chitosan [26], cetyl trimethyl ammonium bromide [27], dodecanethiol [15] and polyvinylpyrrolidone [28]. Some studies also report plant extract synthesis with different stabilizing agents as microalgae powder of *Chlorella vulgaris* [29] and *Zingiber officinale* [30]. These diverse synthesis methods help to prepare different nanostructure shapes including spheres [28–32], triangles [33,34], flowers [35], stars [36], rods [37], dendrites

* Corresponding author.

E-mail address: grtrejo@umich.mx (G. Rosas).

<https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2021.126130>

Received 19 October 2020; Received in revised form 22 March 2021; Accepted 25 March 2021

Available online 29 March 2021

0022-0248/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

[38], and popcorn [39].

Commonly, the conventional chemical processes to produce Au nanomaterials generate toxic synthesis residues [40]. An alternative method to minimize that possible environmental contamination is the eco-friendly synthesis for Au nanostructures through plant extracts. Eco-friendly synthesis is an economical, easy, and environmentally friendly way to produce metallic assemblies [41–43]. However, there are a few scientific publications where eco-friendly methods have developed nanostructured Au assemblies. For example, Klekotko et al. [44] synthesized Au nanopopcorns using *Cistus incanus* extract at room temperature. The nanostructures showed sizes greater than 100 nm with a branched sphere shape and a popcorn morphology. Nootchanat et al. [45] used starch as a stabilizing agent and H_2O_2 as a reducing agent, thus obtaining gold nanosheets with sizes between 5 and 10 μm . Other authors have synthesized gold nanostructures through conventional chemical syntheses, such as Lee et al. [46], in which they produce nanowires with a size of 6 nm in diameter and 2 μm long, employing aerosol microdroplets containing HAuCl_4 and NaBH_4 , supported by high pressure, and N_2 gas.

Moreover, 2D nanostructures with other metals have already been synthesized using eco-friendly methods with plant extracts; for example, Ohemeng et al. [47] produced assemblies of Ag (spherical, cylindrical, irregular, and other morphologies with different sizes) and Fe assemblies (100 nm cylinders). Thus, demonstrating that eco-friendly synthesis can be used for different metals nanostructures preparation.

In the present study, the Au assemblies' synthesis was carried out using an eco-friendly method with the *Taraxacum officinale* plant extract. Furthermore, the fluorescence properties of the obtained products were also measured. The fluorescence properties of gold nanomaterials are commonly used as sensors in imaging therapy applications in cancer treatments [48–50].

Taraxacum officinale contains more than 40 identified components, such as flavonoids and coumarin derivatives [51]. Among these, luteolin 7-glucoside, luteolin 7-diglucoside, free luteolin, and chrysoeriol stand out [52,53]. Diverse studies indicate possible clinical applications of some components of this plant, proposing the influence against the growth of tumor cells in experimental animals, anti-inflammatory action, inhibition of alpha-glucosidase in vitro for the treatment of diabetes, protection of pancreatitis induced by cholecystokinin, stimulant of the secretion and functioning of the gallbladder [41,54]. In this sense, due to the characteristics described for *Taraxacum officinale*, the organic compounds functioning as stabilizing agents in the Au nanostructures might be a valuable tool to reduce the secondary effects generated by cancer cells.

2. Material and methods

2.1. Preparation of the extract and precursor salt

A mechanical ball milling was performed for 10 min to increase the surface contact area of the *Taraxacum officinale* leaves purchased in a local market. Then, 2 g of powder was dissolved (green color and sweet smell) in 100 ml of deionized water (concentration of 0.02 g / ml) at 65 °C for 25 min under magnetic stirring (1000 rpm) on a hotplate. The solution was allowed to stand for 10 min and filtered with 150 mm Whatman paper. The final solution had dark brown color and was used immediately for the gold ions bioreduction. The tetrachloroauric acid (HAuCl_4) precursor salt (Sigma Aldrich Reagent at 99.4% purity) used in the synthesis was 5 mM.

2.2. Synthesis and characterization of Au nanomaterials

To perform the gold ion reduction reaction, 1.4 ml of HAuCl_4 (5 mM, pH 2.1) mix with 7 ml of extract (0.02 g / ml, pH 5.6) at room temperature. After 2 h, a color change from light brown to violet was observed in the reaction solution. This solution was characterized by the

techniques mentioned below. Au assemblies (pH 6.8) were formed after the reaction solution was stored in the darkness for 9 months at 4 °C. After this time, the products are characterized again. The Au nanomaterials were characterized by Ultraviolet–visible (UV–Vis) on an Ocean Optics USB-4000 spectrometer. Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis was performed to know the functional groups associated with the reaction in a Bruker Tensor 27 spectrometer at 26.7 °C with a relative humidity of 37%. X-ray Diffraction (XRD) characterization was carried out on the Bruker D8 Advanced X-ray diffractometer, DAVINCI, in an angular range of 10–100 ° ($\text{K}\alpha$ copper radiation). A scanning electron microscope (JEOL JSM-7600F) and transmission electron microscope (Phillips Tecnai F20) analyzed the particles' morphology and size. Atomic absorption spectroscopy (AAS) determined the Au reduction reaction efficiency via the amount of Au ions remaining in the solution. For these purposes, a Perkin Elmer 3100 equipment was used at 242.8 nm and oxygen-acetylene flame. The solids were separated from the solution by centrifugation before performing the AAS analysis. After recognizing the absence of the surface plasmon peak corresponding to Au nanosolids, AAS determined the Au ion concentration in solution.

2.3. Fluorescence analysis

The optical properties were evaluated through fluorescence spectroscopy (FS) in a Shimadzu rf-5301pc spectrofluorophotometer with a Xenon lamp used at 375 nm and 530 nm corresponding to excitation and emission, respectively.

2.4. Zeta potential analysis

ZP analysis was measured on individual Au nanoparticles (2 h of reaction) and Au assemblies (9 months) at a concentration of 980 ppm. This analysis was carried out using 300 μL of samples at 25 °C, employing a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument (He-Ne red laser at 633 nm) that uses electrophoretic light scattering; the samples were dispersed in PBS at a pH of 7.4, with a detection range for nanoparticles between 3.8 nm and 100 μm in diameter.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of Au dendrites

Fig. 1a-f shows TEM images of Au dendritic assemblies after 9 months of bioreduction using *Taraxacum officinale* plant extract. The dendritic Au particle appears with multiple branches added in random directions. Other quasi-spherical particles appeared next to the dendritic formations, varying in size from 10 to 30 nm. This result suggests that individual Au nanoparticles formed in the early stages of growth coalesce to form the anisotropic Au self-assembly (9 months). These findings are perhaps due to the chemical transformation of the plant extract's biomolecules that initially acted as surfactants, this being the driving force behind self-assembly. Therefore, *T. officinale* plant extract contains appropriate organic substances to reduce Au ions, as discussed later in the IR analysis section.

More structural details of the Au assemblies are presented in Fig. 2a-c, showing high-magnification bright-field TEM images of individual dendrites. These micrographs confirm the dendrites' flat morphology, which is formed by around 20 faceted nanoparticles with approximately 30 nm in size, where some of them have a tip-shaped termination. Nearby particles to Au assemblies have similar morphology to the aggregates' components indicating its frustrations to adhere, perhaps because surfactant biomolecules avoid its coalescence. The size of the Au assemblies was directly measured from these images. Fig. 2d shows the corresponding histogram obtained with 150 individuals, which indicates an average dendritic size of 158 nm with a high-frequency range of 130–160 nm.

Fig. 3a-c displays high-magnification HAADF-TEM images from the

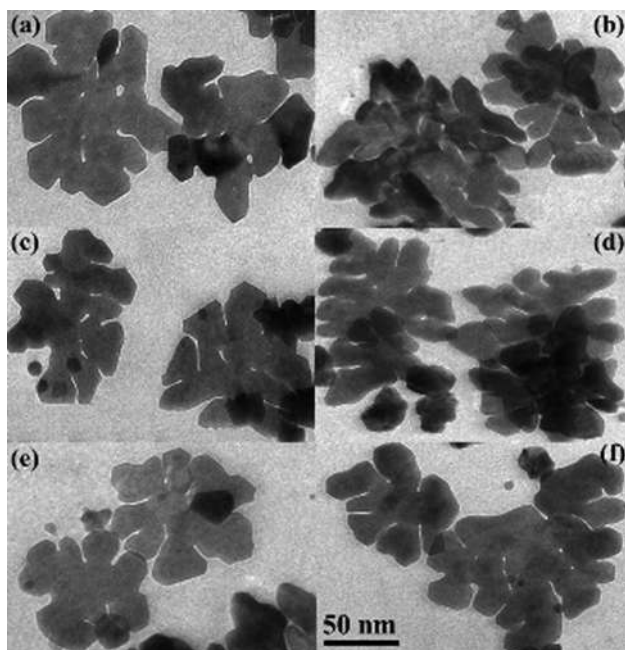


Fig. 1. TEM images of the Au assemblies obtained with *Taraxacum officinale* extract (a-f).

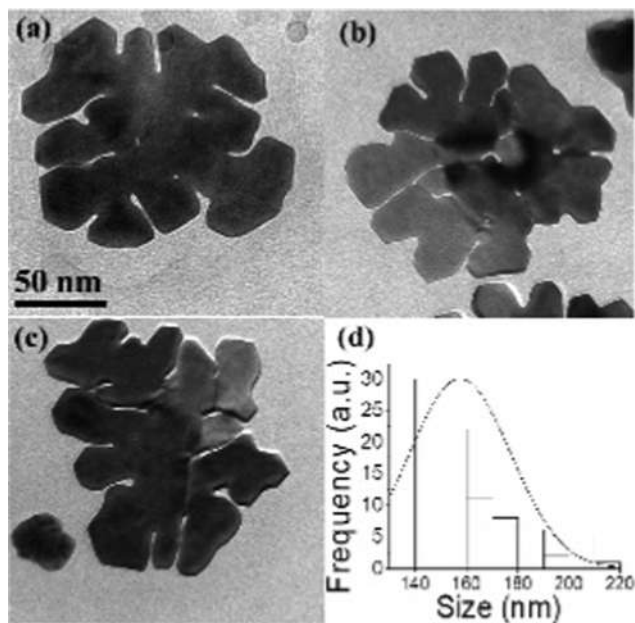


Fig. 2. High-magnification bright-field TEM images of individual dendrites (a-c) and histogram (d).

Au dendrites showing a homogeneous Z contrast. The homogeneous contrast in all dendrite validates low superficial texture, maybe due to growth in the same crystallographic orientation, confirming the planar assembly nature. The dendrites thickness can deduce with the contrast between the smallest quasi-spherical nanoparticles with 30 nm in size (light gray contrast) and the Au self-assemblies (dark gray contrast). Thus, quasi-spherical particles give us an idea of the dendrites' thickness, defining a 2D nanostructure type. Furthermore, the difference in mass contrast in both particles only indicates that the dendritic Au assemblies have a flat morphology.

Fig. 3d shows the dendrites' elemental composition (EDS), where the highest intensity signal corresponds to Au, and the other peaks belong to

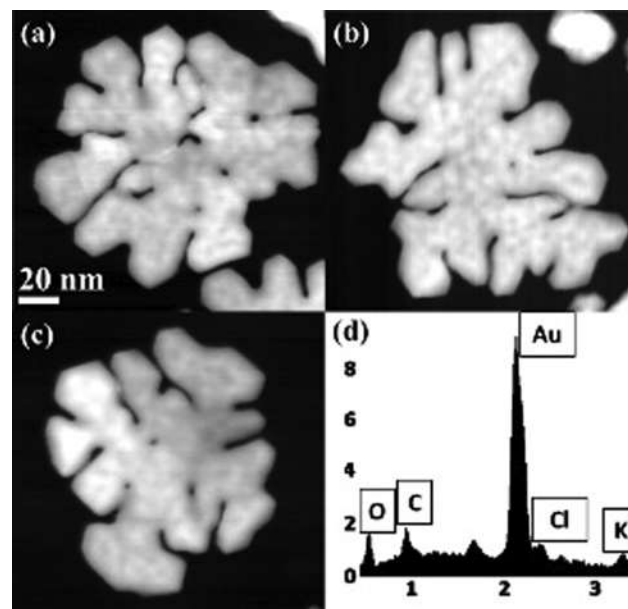


Fig. 3. High-magnification HAADF-TEM images of the Au assemblies (a-c) and the dendrites' elemental composition (EDS) (d).

C and O coming from the extract residues. These results confirm appropriate organic substances in *Taraxacum officinale* to reduce Au ions and stabilize the Au assemblies shape morphology, discussed in the IR analysis section.

The synthesis reaction was performed using a 5 mM HAuCl₄ solution and 0.02 g / ml plant extract in a 1:4 volumetric ratio. Fig. 4a-b illustrates the *Taraxacum officinale* plant extract's UV-vis spectra and the corresponding Au ions' reduction after 9 months of storing at 4 °C without stirring. The first spectrum presents noisy bands from 225 nm to 700 nm; this signal is a normal behavior of the organic substances contained in the extract, with energy orbitals that fall within the range of visible light radiation causing excitation of electrons from π level to higher, responding to the incidence of UV-Vis light. From the Au assemblies' spectrum, two superficial plasmon resonance (SPR) bands occur at 549 nm and 578 nm, characteristic of Au nanostructures. This behavior suggests two particle size and shape distributions derived from the individual nanoparticles and Au assembly units. According to the literature [55], Au nanostructures' plasmon resonance bands are well-expected between 500 and 600 nm, attributing to the Au dendrites' shape. These results agree with derivatives from the TEM analysis showing diverse morphologies. The Au assemblies' synthesis showed a color change in the reaction solution (inserts), initially after 2 h from light purple to dark violet after 9 months of reaction. This color change is due to the aggregation of the Au nanoparticles in the colloid [56].

Fig. 4c shows the X-ray diffraction pattern of Au assemblies. There are 4 diffraction peaks located at 38.1°, 44.2°, 64.8°, and 77.4°, attributed to the crystallographic planes (111), (200), (220), and (311), respectively. This angular distribution corresponds to the cubic structure fcc of the Au (ICDD PDF # 00-004-0784). This result confirms the Au assembly's structural nature, which agrees with the EDS and UV-Vis techniques. From the Debye-Scherrer equation and FWHM measured at (111) reflection, the average crystal size was 63 nm confirming the dendrites' nanometric crystallinity.

Au Nanoparticles aggregation processes can be associated with colloidal chemical variations. A comparative IR analysis among supernatants from the reaction medium, at 2 h of redox process (Fig. 5a) and after 9 months of reaction to generate the Au assemblies (Fig. 5b) is presented. These results revealed a diminishing in aryl carbonyl compounds concentration; thus, continuous oxidation process along the reaction period, and probably such class of compounds, is directly related

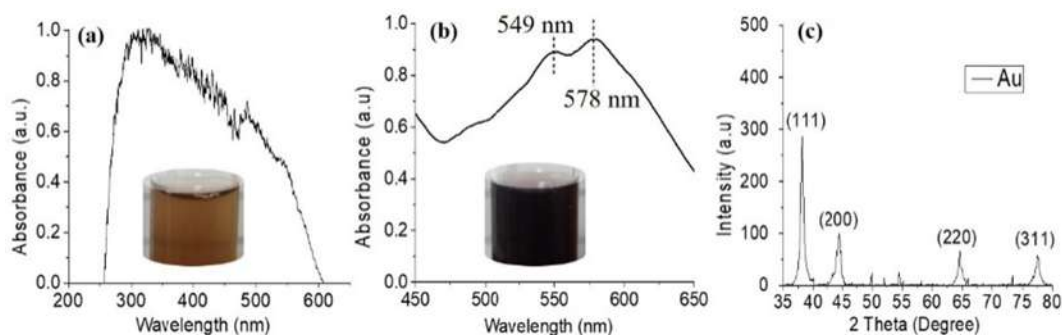


Fig. 4. UV-vis spectrum of the *Taraxacum officinale* plant extract (a), the corresponding UV-vis spectrum to the Au nanostructures (b), and the X-ray diffraction pattern of Au assemblies (c).

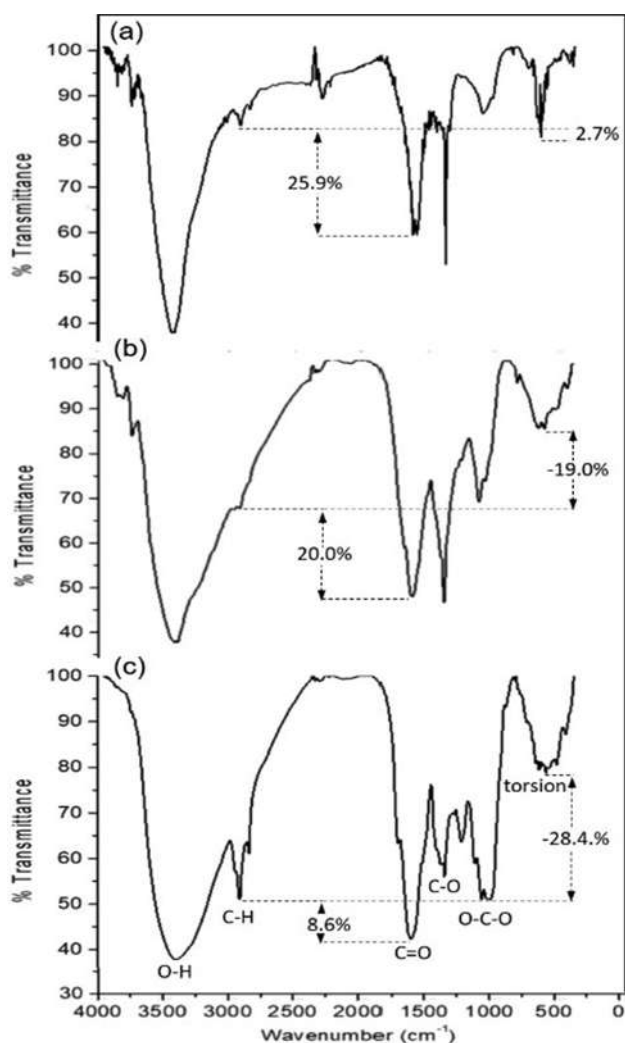


Fig. 5. IR spectrum of Au nanoparticles synthesized after 2 h of reaction (a), IR spectrum of Au assemblies after 9 months of reaction (b), and IR spectrum of the functional groups involved in the synthesis process with *Taraxacum officinale* plant extract (c).

to stabilizing processes during supramolecular arrangements. This phenomenon's main clue is uncovered by comparing intensities (%T) of strategic vibration bands on the IR spectrum. The intensity of the C-H vibration (near 2900 cm⁻¹) band was considered as constant since hydrocarbons from extract can be considered as inert components, while carbonyl vibration (near 1620 cm⁻¹) and that related to arene ring

torsion (near 660 cm⁻¹) are associated with reactive moieties from the plant extract [57]. Thus, [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{CO})$] and [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{arene torsion})$] were measured to give $D_T = 25.9\%$ and 2.7% , respectively (Fig. 5a), while [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{CO})$] and [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{arene torsion})$] were 20% and 19%, respectively, as shown in Fig. 5b. This data, together with the final pH = 6.8 in the reaction medium, supported the above theory; thereby, such variation along 9 months possibly influenced the spatial distribution and geometric arrangement during Au crystalline growing. It is good to mention that IR spectrum from *Taraxacum officinale* plant extract (Fig. 5c) showed vibration bands at 3046 (O-H), 2929, 2852 (C-H), 1637 (C-O), 1261 (C-O), 1064 (O-C-O), and 671 (arene torsion) cm⁻¹ [58], and $D_T = 8.6\%$ and -28.4% for [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{CO})$] and [$D_T = \nu(\text{CH}) - \nu(\text{arene torsion})$], respectively; suggesting the presence of hydrocarbons, aromatic, and hydroxyl compounds as its main constituents [52,53], where aromatic compounds can act as reductant agents. As seen, variations in plant extract's chemical composition are revealed with time; consequently, the reductant power from aromatic compounds to yield Au nanoparticles (2 h of reaction) finally constitutes the Au assemblies (9 months of reaction).

Transmission electron microscopy (TEM) images from one of the dendritic assembly branches were obtained. Fig. 6a shows a bright-field TEM micrograph, illustrating the particles' tendency towards a faceted triangular shape with tip termination following an anisotropic growth attributed to the shape biological modifiers present in the plant extract probably give the constitution to the assembly. Fig. 6b corresponds to a high-resolution TEM image whose interplanar distance was 2.34 Å belonging to Au fcc lattice planes (111) (insert). These images demonstrate some preferential crystallographic growth for the nano-units' that finally form the assemblies with dendritic structure. The crystal mechanism of growth was proposed below in Fig. 7, according to measurements through different time stages from 2 h of reaction until 9 months. It is essential to point out Au nanostructures' crystal growth habit in triangular or hexagonal shapes similar to other works [59,60].

Aided by the different individual morphologies present in the samples analyzed by TEM and SEM in different stages of time, a possible

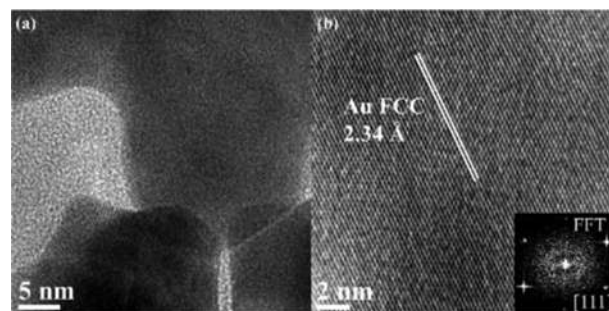


Fig. 6. Bright-field TEM micrograph (a) and high-resolution TEM image with fcc lattice planes (insert) (b).

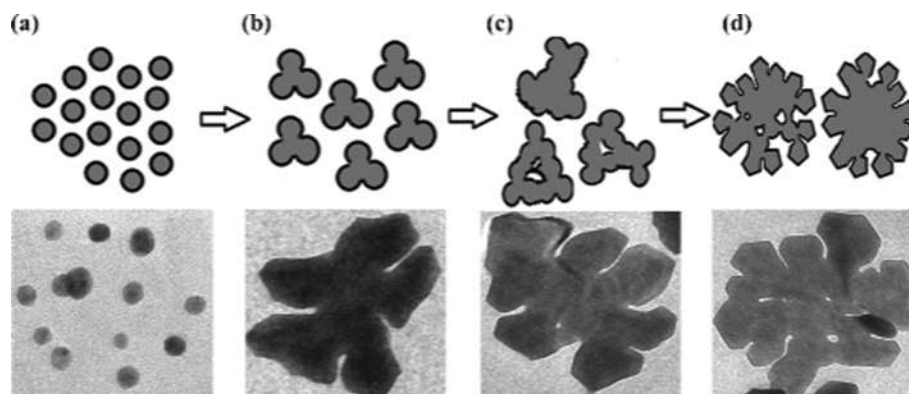


Fig. 7. Possible mechanism for the growth of Au dendrites expressed in 4 steps. 2-column.

mechanism for the growth of Au dendrites was speculated below, expressing in 4 steps (Fig. 7). Initially, Au nanoparticles were formed after 2 h of reaction with 10 nm of average size (subsection a). In a second stage (between 3 and 5 months), the nanoparticles joined in 3 units following a triangular morphology with a size of 35 nm (subsection b). Subsequently, these triangular morphology arrangements merge (between 5 and 7 months) at their corners to form groups of up to 5 or 6 units (part c). This last arrangement coalesces again (7–9 months) following a pseudo-triangular morphology, forming large nanostructures or the so-called Au assemblies that reach approximately 150 nm (subsection d). It is essential to mention that after 9 months, the organic agents that were initially covering the surface of the nanoparticles are chemically transformed, causing the aggregation of the nanomaterials until they form the Au dendrite-flat morphology.

These findings reinforce the crystal orientation mechanism where the organic compounds deposited on the material surface adhering in the direction with the highest electronic charge density (111) in Au. This behavior causes the assemblies growth homogeneously due to the coalescence of smaller nanoparticles in this same direction. Nootchanat et al. [45] propose the formation of gold nanosheets, explaining their results using this theory.

The concentration of unreacted Au ions was determined to evaluate the biosynthesis reaction efficiency by atomic absorption spectrophotometry (AAS). A calibration curve for Au standard solutions (0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, and 15 ppm) was used, obtaining a $y = 0.0148x + 0.0021$, $R^2 = 0.9992$ values. Samples were repeatedly centrifuged in this study until Au SPR disappeared in the supernatant corresponding to the assemblies. Then that supernatant was analyzed for the remaining ions by AAS. The analysis indicated that the unreacted ions were 111 ppm of 1007 ppm for 5 mM Au, which means 896 ppm of ions were reduced to nanomaterials, indicating an 89% reaction effectiveness conversion. This result indicates that the *T. officinale* plant extract is suitable for the synthesis of this nanomaterial.

3.2. Fluorescence analysis of Au nanostructures

Luminescence is often associated with the effects of nanoparticle size and other structural parameters such as surfactants, valence states of metal atoms, and the crystallinity of nanomaterials, thus having a significant influence on their properties and emission mechanisms. Fig. 8a-b shows the fluorescence spectra corresponding to the *Taraxacum officinale* plant extract and the Au assemblies. Fig. 8a displays an emission spectrum at 510 nm and the excitation spectrum at 375 nm corresponding to the plant extract. The intensities are close to 23 (a.u.), indicating a low luminescence response to the organic compounds. Fig. 8b shows the Au assemblies' excitation and emission spectra having an emission band at 510 nm when was excited at 380 nm. This emission is due to the *T. officinale* plant residues interacting with the Au electrons when excited, reaching intensities approximately 280 (a.u.). These fluorescence measurements in Au assemblies could be significant for their potential applications as fluorescent sensors in therapy and imaging.

3.3. Zeta potential analysis of Au nanostructures

ZP is a crucial parameter that provides valuable information about nanoparticles' charge and, therefore, their stability. By mean, the higher the absolute value of the zeta potential more stable the system will be. So, the value of zeta potential plays an essential role in controlling metal nanoparticles' existence [61].

The zeta potential values of -26.6 mV (mobility $-1.771 \mu\text{mcm} / \text{Vs}$, conductivity $2.14 \text{ mS} / \text{cm}$) were observed for the Au assemblies and -30.4 mV (mobility $-2.022 \mu\text{mcm} / \text{Vs}$, conductivity $2.48 \text{ mS} / \text{cm}$) for the AuNPs. As observed, AuNPs are considered more stable than Au assemblies because their surface potential values are between -30 mV and $+30$ mV [61]. Some studies have proposed that surface-active biomolecules (stabilizers) in the reaction mixture could create

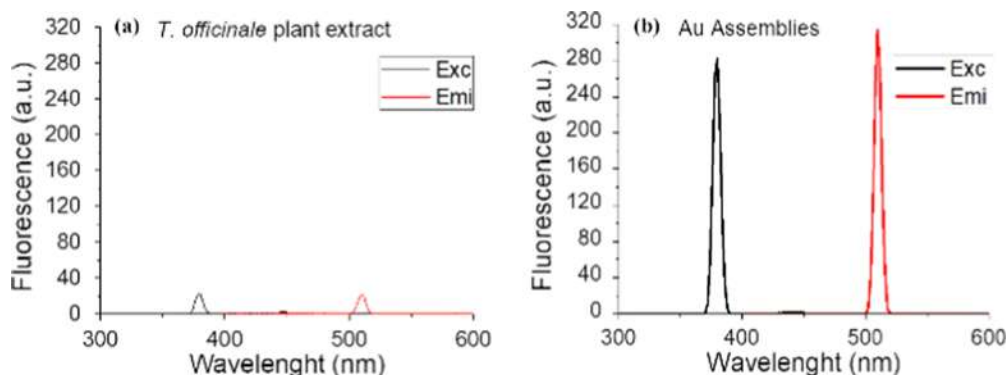


Fig. 8. Fluorescence spectra of the a) *Taraxacum officinale* plant extract in aqueous solution and b) Au assemblies synthesized with the *T. officinale* plant extract.

electrostatic and electrosteric interactions providing more stable nanoparticles [62].

Hence, it is suggested that the chemical transformation of the organic surfactants, as previously determined by FT-IR technique, produces electrostatic and electrosteric forces by zeta potential measurements remains aqueous system stability for 9 months. This surfactant transformation generates the coalescence of the Au nanoparticles to form the self-assemblies, blocking the crystallographic planes (111) and allowing the planes' development (110) as observed by the HR-TEM technique. Zeta potential values for both nanostructures were almost remained, indicating good colloidal stability. The increment in zeta potential value at 9 months is due to new particles' formation (Au assemblies). Speculating, judging by a long time for the formation of the Au assemblages together with the final size obtained (158 nm), the atoms diffusion rate must have been shallow, suggesting an effective stabilization process of the species. Furthermore, it is plausible to think of Au ions' kinetically slow bioreduction process from 2 h to 9 months.

4. Conclusions

In summary, Au dendritic assemblies were obtained using *Taraxacum officinale* plant extract after 9 months reaction. SEM micrographs show Au dendritic particles with multiple branched aggregated in random directions. TEM showed self-assemblies forming a dendrite with approximately 150 nm and 10 nm of thickness having a flat flower type morphology defining a 2D nanostructure type. The faceted Au assemblies present growth in the (111) planes influenced, maybe for the organic surfactants. UV-Vis spectrum shows two surface plasmon resonance (SPR) bands occurring at 547 nm and 578 nm, typical of the Au nanostructures. XRD confirms the Au fcc structure of the self-assembly. FTIR analysis found that the Au ions reduction compounds are sugars, proteins, and molecules with benzene rings. Using AAS, the reaction efficiency of gold reduced to assemblies was 89%. The fluorescence analyzes show that the gold nanostructures could be used as a biosensor to detect cancer cells and imaging-therapy applications. The Zeta value for Au assemblies was -26.6 mV indicating good colloidal stability after 9 months of reaction. As far as is known, there is no previous work showing a structure similar to a nanometric flat dendritic flower of Au. This type of Au assembly's protocol is toxic-free been an environmentally friendly procedure supported with the easily acquired *Taraxacum officinale* plant.

5. Formatting of funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CRediT authorship contribution statement

A. Del Moral-G: Methodology, Investigation, Writing - original draft, Formal analysis. **Tzarara López-Luke:** Conceptualization, Supervision. **Alfredo Saavedra-Molina:** Visualization. **Mario A. Gómez-Hurtado:** Supervision. **G. Rosas:** Resources, Writing - review & editing, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] T. Yin, Y. Li, K. Bian, R. Zhu, Z. Liu, K. Niu, H. Liu, Z. Gao, D. Gao, Self-assembly synthesis of vaporeotide-gold hybrid nanoflower for photothermal antitumor activity, *Mater. Sci. Eng., C* 93 (2018) 716–723, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.017>.
- [2] D. Divakaran, J.R. Lakkakula, M. Thakur, M.K. Kumawat, R. Srivastava, Dragon fruit extract capped gold nanoparticles: Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells, *Mater. Lett.* 236 (2019) 498–502, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.10.156>.
- [3] E. Rafatmah, B. Hemmateenejad, Dendrite gold nanostructures electrodeposited on paper fibers: Application to electrochemical non-enzymatic determination of glucose, *Sens. Actuators, B* 304 (2020), 127335, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127335>.
- [4] S. Lu, T. You, Y. Gao, N. Yang, C. Zhang, P. Yin, Rapid fabrication of three-dimensional flower-like gold microstructures on flexible substrate for SERS applications, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 212 (2019) 371–379, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.01.018>.
- [5] C. Zheng, M. Yin, B. Su, A. Peng, Z. Guo, X. Chen, X. Chen, A novel near-infrared light-responsive photoelectrochemical platform for detecting microcystin-LR in fish based on Ag₂S cubes and plasmonic Au nanoparticles, *Talanta* 221 (2021), 121447, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121447>.
- [6] Y. Wei, Y. Nie, Z. Han, H. Huang, X. Liao, X. Wang, Z. Fan, Y. Zheng, Au@ polydopamine nanoparticles/tocilizumab composite as efficient scavengers of oxygen free radicals for improving the treatment of rheumatoid arthritis, *Mater. Sci. Eng., C* 118 (2021), 111434, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111434>.
- [7] Z. Guo, J. Lu, D. Wang, W. Xie, Y. Chi, J. Xu, N. Takuya, J. Zhang, W. Xu, F. Gao, H. Wu, L. Zhao, Galvanic replacement reaction for in situ fabrication of litchi-shaped heterogeneous liquid metal-Au nano-composite for radio-photothermal cancer therapy, *Bioact. Mater.* 6 (3) (2021) 602–612, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.033>.
- [8] J. Simon, S. Udayan, E.S. Bindiya, S.G. Bhat, V.P.N. Nampoori, M. Kailasnath, Optical characterization and tunable antibacterial properties of gold nanoparticles with common proteins, *Anal. Biochem.* 612 (2021), 113975, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113975>.
- [9] J.A. Fuentes-García, J. Santoyo-Salzar, E. Rangel-Cortes, G.F. Goya, V. Cardozo-Mata, J.A. Pescador-Rojas, Effect of ultrasonic irradiation power on sonochemical synthesis of gold nanoparticles, *Ultrason. Sonochem.* 70 (2021), 105274, <https://doi.org/10.1016/j.ultrasonch.2020.105274>.
- [10] S. Kaviya, Synthesis, self-assembly, sensing methods and mechanism of bio-source facilitated nanomaterials: A review with future outlook, *Nano-Structures & Nano-Objects.* 23 (2020), 100498, <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100498>.
- [11] E. Wiercigroch, P. Swit, A. Kisielowska, I. Piwoński, K. Malek, Photocatalytic deposition of plasmonic Au nanostructures on a semiconductor substrate to enhance Raman sensitivity, *Appl. Surf. Sci.* 529 (2020), 147021, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147021>.
- [12] K. Daware, M. Kature, R. Kalubarme, R. Shinde, K. Patil, N. Suzuki, C. Terashima, S. Gosavi, A. Fujishima, Detection of toxic metal ions Pb²⁺ in water using SiO₂@ Au core-shell nanostructures: A simple technique for water quality monitoring, *Chem. Phys. Lett.* 732 (2019), 136635, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136635>.
- [13] A.K. Yagati, A. Go, S.G. Chavan, C. Baek, M.-H. Lee, J. Min, Nanostructured Au-Pt hybrid disk electrodes for enhanced parathyroid hormone detection in human serum, *Bioelectrochemistry* 128 (2019) 165–174, <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.011>.
- [14] J. Zheng, C. Zhou, M. Yu, J. Liu, Different sized luminescent gold nanoparticles, *Nanoscale* 4 (14) (2012) 4073–4083, <https://doi.org/10.1039/C2NR31192E>.
- [15] U. Pyell, A.H. Jalil, C. Pfeiffer, B. Pelaz, W.J. Parak, Characterization of gold nanoparticles with different hydrophilic coatings via capillary electrophores and Taylor dispersion analysis. Part I: Determination of the zeta potential employing a modified analytic approximation, *J. Colloid Interface Sci.* 450 (2015) 288–300, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.006>.
- [16] S.Y. Moon, T. Sekino, T. Kusunose, S.-I. Tanaka, Simple one-step synthesis of water and organic media soluble gold nanoparticles with various shapes and sizes, *J. Cryst. Growth* 311 (3) (2009) 651–656, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2008.09.085>.
- [17] G.M. Whitesides, B. Grzybowski, Self-Assembly at All Scales, *Science* 295 (5564) (2002) 2418, <https://doi.org/10.1126/science.1070821>.
- [18] R. Sammons. En; 3 - Biological responses to hydroxyapatite. M. Mucalo. ed. Woodhead Publishing. 53-83. 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-033-0.00003-1>.
- [19] C. Ngó, M. Voorde. Nanotechnology in a nutshell: From simple to complex systems. Nanotechnology in a Nutshell: From Simple to Complex Systems. 1-495, 2014. <https://doi.org/10.2991/978-94-6239-012-6-1>.
- [20] X. Han, D. Wang, J. Huang, D. Liu, T. You, Ultrafast growth of dendritic gold nanostructures and their applications in methanol electro-oxidation and surface-enhanced Raman scattering, *J. Colloid Interface Sci.* 354 (2) (2011) 577–584, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.11.045>.
- [21] M.F. Zayed, R.A. Mahfoze, S.M. El-kousy, E.A. Al-Ashkar, In-vitro antioxidant and antimicrobial activities of metal nanoparticles biosynthesized using optimized Pimpinella anisum extract, *Colloids Surf., A* 585 (2020), 124167, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124167>.
- [22] X.-D. Lin, J.-F. Li, Y.-F. Huang, X.-D. Tian, V. Uzayisenga, S.-B. Li, B. Ren, Z.-Q. Tian, Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy: Nanoparticle synthesis, characterization and applications in electrochemistry, *J. Electroanal. Chem.* 688 (2013) 5–11, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.07.017>.
- [23] I.S. Tódor, L. Szabó, O.T. Marişca, V. Chiş, N. Leopold, Gold nanoparticle assemblies of controllable size obtained by hydroxylamine reduction at room temperature, *J. Nanopart. Res.* 16 (12) (2014) 2740, <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2740-4>.
- [24] A. Jakhmola, R. Vecchione, V. Onesto, F. Gentile, M. Profeta, E. Battista, A. C. Manikas, P.A. Netti, A theoretical and experimental study on l-tyrosine and

- citrate mediated sustainable production of near infrared absorbing twisted gold nanorods, *Mater. Sci. Eng., C* 118 (2021), 111515, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111515>.
- [25] X. Wang, X. Zheng, H. Han, Y. Fan, S. Zhang, S. Meng, S. Chen, Photocatalytic hydrogen evolution from biomass (glucose solution) on Au/CdS nanorods with Au³⁺ + self-reduction, *J. Solid State Chem.* 289 (2020), 121495, <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2020.121495>.
- [26] F. Fu, B. Yang, X. Hu, H. Tang, Y. Zhang, X. Xu, Y. Zhang, S.S.B. Touhid, X. Liu, Y. Zhu, J. Zhou, J. Yao, Biomimetic synthesis of 3D Au-decorated chitosan nanocomposite for sensitive and reliable SERS detection, *Chem. Eng. J.* 392 (2020), 123693, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123693>.
- [27] K. Okitsu, S. Semboshi, Synthesis of Au nanorods via autocatalytic growth of Au seeds formed by sonochemical reduction of Au(I): Relation between formation rate and characteristic of Au nanorods, *Ultrason. Sonochem.* 69 (2020), 105229, <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2020.105229>.
- [28] W.H. Eisa, E. Al-Ashkar, S.M. El-Mossalamy, S.S.M. Ali, PVP induce self-seeding process for growth of Au@Ag core@shell nanocomposites, *Chem. Phys. Lett.* 651 (2016) 28–33, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.03.009>.
- [29] R. A. Zayadi, F. Abu Bakar, Comparative study on stability, antioxidant and catalytic activities of bio-stabilized colloidal gold nanoparticles using microalgae and cyanobacteria, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4), 103843, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103843>.
- [30] R.A. Zayadi, F. Abu Bakar, M.K. Ahmad, Elucidation of synergistic effect of eucalyptus globulus honey and Zingiber officinale in the synthesis of colloidal biogenic gold nanoparticles with antioxidant and catalytic properties, *Sustain. Chem. Pharm.* 13 (2019), 100156, <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100156>.
- [31] B. Shang, X. Zhang, R. Ji, Y. Wang, H. Hu, B. Peng, Z. Deng, Preparation of colloidal polydopamine/Au hollow spheres for enhanced ultrasound contrast imaging and photothermal therapy, *Mater. Sci. Eng., C* 106 (2020), 110174, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110174>.
- [32] M.F. Zayed, W.H. Eisa, S.M. El-kousy, W.K. Mleha, N. Kamal, Ficus retusa-stabilized gold and silver nanoparticles: Controlled synthesis, spectroscopic characterization, and sensing properties, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 214 (2019) 496–512, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.042>.
- [33] S. Das, B. Satpati, T.S. Bhattacharya, T. Bala, Synthesis of Au–Ag triangular nanocomposite with promising SERS activity, *Nano-Structures & Nano-Objects*. 22 (2020), 100438, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.100438>.
- [34] M.F. Zayed, W.H. Eisa, A.M. Hezma, Spectroscopic and Antibacterial Studies of Anisotropic Gold Nanoparticles Synthesized Using *Malva parviflora*, *J. Appl. Spectrosc.* 83 (6) (2017) 1046–1050, <https://doi.org/10.1007/s10812-017-0406-6>.
- [35] V.A. Dhumale, P.V. Shah, I.S. Mulla, R.B. Sharma, Switching of hydrophilic to ultra hydrophilic properties of flower-like gold nanostructures, *Appl. Surf. Sci.* 256 (13) (2010) 4192–4195, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.01.123>.
- [36] X. Li, X. Lin, X. Zhao, H. Wang, Y. Liu, S. Lin, L. Wang, S. Cong, Self-assembled monolayer film of concave star-shaped Au nanocrystals as highly efficient SERS substrates, *Appl. Surf. Sci.* 518 (2020), 146217, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146217>.
- [37] M.K. Singh, P. Chettri, J. Basu, A. Tripathi, B. Mukherjee, A. Tiwari, R.K. Mandal, Synthesis of rod-shaped Au–Cu intermetallic nanoparticles and SERS detection, *Mater. Lett.* 249 (2019) 33–36, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.065>.
- [38] F.-H. Cho, Y.-C. Lin, Y.-H. Lai, Electrochemically fabricated gold dendrites with high-index facets for use as surface-enhanced Raman-scattering-active substrates, *Appl. Surf. Sci.* 402 (2017) 147–153, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.01.055>.
- [39] F. Lou, A. Wang, J. Jin, Q. Li, S. Zhang, One-pot synthesis of popcorn-like Au@Polyluminol nanoflowers for sensitive solid-state electrochemiluminescent sensor, *Electrochim. Acta* 278 (2018) 255–262, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.194>.
- [40] R. Augustine, A. Hasan, En; Chapter 11 - Multimodal applications of phytanoparticles. N. Thajuddin, S. Mathew. ed. Elsevier. 195-219. 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822348-2.00011-5>.
- [41] A. Selvaraj, S. Muthupandian, V. Badathala, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Taraxacum officinale* and its Antimicrobial Activity, *South Indian Journal of Biological Sciences*. 1, 115, 2015. 10.22205/sijbs/2015/v1/i2/100433.
- [42] M. Hamelian, S. Hemmati, K. Varmira, H. Veisi, Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using *Pistacia Atlantica* extract, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 93 (2018) 21–30, <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.07.018>.
- [43] K. Singh, D. Kukkar, R. Singh, P. Kukkar, N. Bajaj, J. Singh, M. Rawat, A. Kumar, K.-H. Kim, In situ green synthesis of Au/Ag nanostructures on a metal-organic framework surface for photocatalytic reduction of p-nitrophenol, *J. Ind. Eng. Chem.* 81 (2020) 196–205, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.09.008>.
- [44] M. Klekotko, K. Brach, J. Olesiak-Banska, M. Samoc, K. Matczyszyn, Popcorn-shaped gold nanoparticles: Plant extract-mediated synthesis, characterization and multiphoton-excited luminescence properties, *Mater. Chem. Phys.* 229 (2019) 56–60, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.02.066>.
- [45] S. Nootchanat, C. Thammacharoen, B. Lohwongwatana, S. Ekgasit, Formation of large H2O2-reduced gold nanosheets via starch-induced two-dimensional oriented attachment, *RSC Adv.* 3 (11) (2013) 3707–3716, <https://doi.org/10.1039/C3RA22830D>.
- [46] J. K. Lee, D. Samanta, H. Nam, R. Zare, Spontaneous formation of gold nanostructures in aqueous microdroplets, *Nature Communications*. 9, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04023-z>.
- [47] P.O. Ohemeng, E. Dankyi, S. Darko, A. Yaya, A.A. Salifu, C. Ahenkorah, V. A. Apalangya, Iron and silver nanostructures: Biosynthesis, characterization and their catalytic properties, *Nano-Structures & Nano-Objects*. 22 (2020), 100453, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.100453>.
- [48] S. Pan, L. Pei, A. Zhang, Y. Zhang, C. Zhang, M. Huang, Z. Huang, B. Liu, L. Wang, L. Ma, Q. Zhang, D. Cui, Passion fruit-like exosome-PMA/Au-BSA/Ce6 nanovehicles for real-time fluorescence imaging and enhanced targeted photodynamic therapy with deep penetration and superior retention behavior in tumor, *Biomaterials* 230 (2020), 119606, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119606>.
- [49] F. He, H. Ji, L. Feng, Z. Wang, Q. Sun, C. Zhong, D. Yang, S. Gai, P. Yang, J. Lin, Construction of thiol-capped ultrasmall Au–Bi bimetallic nanoparticles for X-ray CT imaging and enhanced antitumor therapy efficiency, *Biomaterials* 120453 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120453>.
- [50] H. Shen, L. Liu, Y. Ran, L. Ma, M. Zhang, L. Qin, L. Zhang, G. Xie, W. Feng, A novel fluorescence biosensor for the detection and imaging of tumor-related mRNA in living cells based on Au/hGNPs-FA nanocarrier, *Sens. Actuators, B* 317 (2020), 128214, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128214>.
- [51] K. Schütz, D.R. Kammerer, R. Carle, A. Schieber, Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2) (2005) 179–186, <https://doi.org/10.1002/rcm.1767>.
- [52] M. Majewski, B. Lis, J. Juszkiewicz, K. Ognik, D. Jedrejek, A. Stochmal, B. Olas, The composition and vascular/antioxidant properties of *Taraxacum officinale* flower water syrup in a normal-fat diet using an obese rat model, *J. Ethnopharmacol.* 265 (2021), 113393, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113393>.
- [53] K. Díaz, L. Espinoza, A. Madrid, L. Pizarro, R. Chamý, Isolation and Identification of Compounds from Bioactive Extracts of *Taraxacum officinale* Weber ex F. H. Wigg. (Dandelion) as a Potential Source of Antibacterial Agents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018, 2706417, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2706417>.
- [54] B. Lis, B. Olas, Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products – history and present, *J. Funct. Foods* 59 (2019) 40–48, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.012>.
- [55] X. Huang, M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *J. Adv. Res.* 1 (1) (2010) 13–28, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- [56] B. Vivek, K. Aditya Narayan, Synthesis and characterization of gold nanoparticles as a sensing tool for the lateral flow immunoassay development, *Sensors, International*. 1 (2020), 100051, <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100051>.
- [57] V.L. Furer, E.I. Borisoglebskaya, V.I. Kovalenko, Band intensity in the IR spectra and conformations of calix[4]arene and thiacalix[4]arene, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61 (1–2) (2005) 355–359, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.05.009>.
- [58] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. ed. Elsevier Science. 1991. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057116-4.50001-8>.
- [59] M.C. Mendoza-Ramirez, H.G. Silva-Pereyra, M. Avalos-Borja, Hexagonal phase into Au plate-like particles: A precession electron diffraction study, *Mater. Charact.* 164 (2020), 110313, <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2020.110313>.
- [60] W. Changshun, C. Kan, Z. Jiejun, X. Zeng, X. Wang, L. Hongchen, S. Daning, Synthesis of High-Yield Gold Nanoplates: Fast Growth Assistant with Binary Surfactants, *J. Nanomater.* 2010 (2010), <https://doi.org/10.1155/2010/969030>.
- [61] Z. Sun, Z. Cui, H. Li, p-Amino benzenesulfonic acid functionalized gold nanoparticles: Synthesis, colorimetric detection of carbaryl and mechanism study by zeta potential assays, *Sens. Actuators, B* 183 (2013) 297–302, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.032>.
- [62] M. Irfan, T. Ahmad, M. Moniruzzaman, S. Bhattacharjee, B. Abdullah, Size and stability modulation of ionic liquid functionalized gold nanoparticles synthesized using *Elaeis guineensis* (oil palm) kernel extract, *Arabian J. Chem.* 13 (1) (2020) 75–85, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.02.001>.

Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Taraxacum officinale* Extract

A. Del Moral¹, S. E. Borjas-Garcia² and G. Rosas¹

¹. Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, UMSNH, Morelia, Michoacán, Mexico.

². Instituto de Física y Matemáticas, UMSNH, Morelia, Michoacán, Mexico.

In recent years, the development of nanotechnology has increased, which has led to the need to optimize the synthesis methods of nanomaterials. In this sense, conventional chemical synthesis has become increasingly important [1], although the main problem with the use of this method is a significant amount of toxic and dangerous waste. An alternative derived from this method is the so-called "green synthesis" [2], which promotes the reduction of precursor salts of the metals through organisms to produce and stabilize nanometric materials (1-100nm) in a more efficient way, economical and friendly with the environment [3].

In the present study, the synthesis of gold nanoparticles was carried out using *Taraxacum officinale* extract which grows in environments with low humidity and sunlight, on the other hand, the corresponding precursor salt used was Tetrachloroauric Acid (HAuCl₄). The extract was prepared using the whole plant from the stem to the vilane, which was mechanically triturated by ball mill, later the infusion was done mixing 100 ml of distilled water with different concentration of plant powder (1, 1.5 and 2 g), it was heated at 55 ° C for 30 minutes and then it was filtered, the gold solution was elaborated with a concentration of 5 mM in distilled water. On the other hand, for the synthesis process 6 ml of *Taraxacum officinale* extract were mixed with 3 ml of gold solution at room temperature without agitation, generating a volume ratio of 2:1, the main indication of the synthesis was the change of color in the mixture of light brown to purple, the size and size distribution was analyzed by Ultraviolet-Visible (OceanOptics USB 4000), later the morphology and size of the nanoparticles were determined using Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM- 7600F) and Transmission Electron Microscopy (Phillips Tecnai F20), finally with the objective of corroborating the composition and crystal structure, the samples were analyzed by X-ray diffraction (Bruker D8 Advance, DAVINCI Lynx eye). Figure 1 shows the UV-Vis spectra associated with gold nanoparticles at characteristic wavelengths between 500 and 600 nm, indicating that the *Taraxacum officinale* plant is efficient to synthesize nanomaterials. These results were obtained by varying the concentration of the extract (0.02, 0.015, 0.01 g / ml), in which can be seen that the band corresponding to 0.02 g / ml indicates smaller and more homogeneous particle sizes and shapes compared with the other bands. These samples were analyzed by SEM technique which allows corroborating the information obtained by UV-vis spectra. Figure 2 shows in section a) that the nanoparticles synthesized with 0.02 g ml of extract have spherical shapes and of smaller size compared with sections b) and c), corresponding to the lower concentrations of extract. These results can be attributed to the fact that the higher the quantity of extract used, the more significant the amount of stabilizing substances present in the plant extract to obtain nanoparticles. On the other hand, by decreasing the organic compounds coming from the plant, the reducing agents and stabilizing agents also lower which generates coalescence of the nanoparticles. These results lead to an increase the particle size and shape from spherical to triangular and some rods (Figs 2 a-b). To observe in detail the morphology of the nanoparticles, the sample with smaller and larger sizes (0.02, 0.01 g / ml) was analyzed by TEM. Figure 3 a) correspond to AuNPs synthesized with 0.02 g/ml. This Figure shows that the nanoparticles are spherical with an average size of 15 nm. However, Fig. 3 b) that correspond to 0.01

g/ml displays a distribution of shapes such as spheres, triangles, and rods with an average size of 43 nm. These results agree well with the Uv-vis and SEM techniques.

Finally, the sample synthesized at a concentration of plant extract of 0.02 g / ml and 5mM of the Tetrachloroauric Acid solution by X-ray diffraction. Figure 3c shows the XRD pattern that corroborates the crystalline structure of the synthesized AuNPs indexing the planes 111, 200 and 220 at angles 37 °, 44.5 °, 64.8 °, of the fcc lattice [4].

References:

- [1] M. Quintana *et al*, Journal Ciencia y Desarrollo **34** (2008), p. 62.
- [2] V. Sanchez -Mendieta *et al*, Journal InTech **1** (2012), p. 391.
- [3] N. Castro *et al*, Journal Ciencia e Ingeniería Neogranadina **21** (2011), p. 169.
- [4] The authors acknowledge funding from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

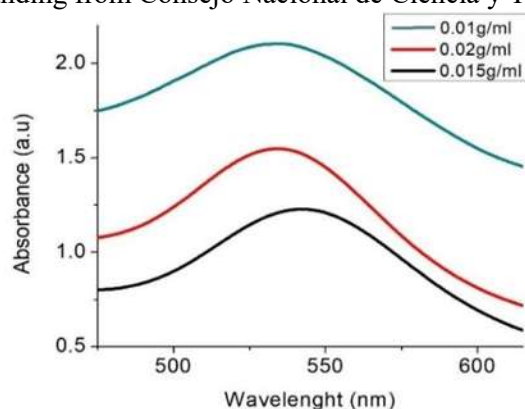


Figure 1. UV-Vis spectra of gold nanoparticles synthesized varying the concentration of extract.

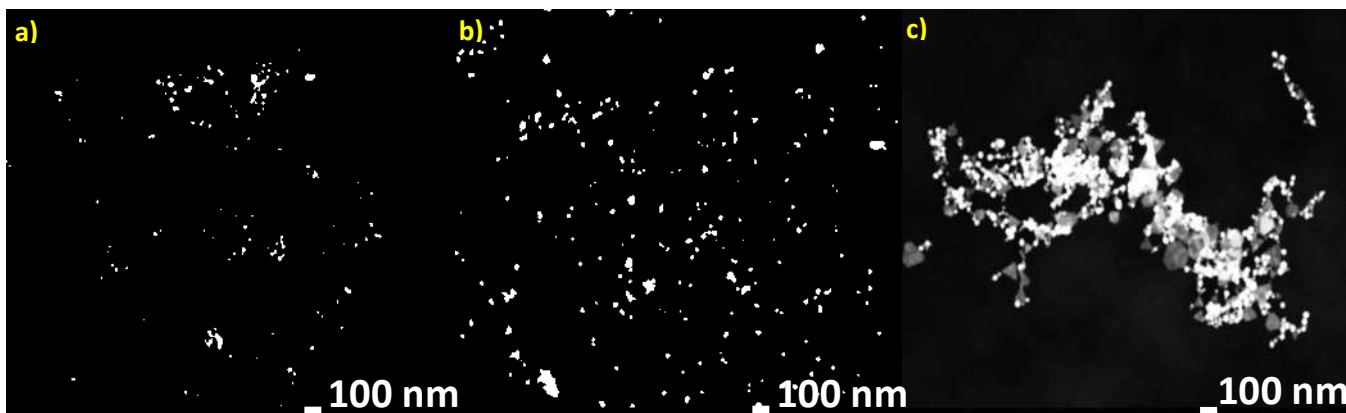


Figure 2. SEM micrographs of gold nanoparticles, a) 0.02g/ml, b) 0.015 g/ml and c) 0.01 g/ml.

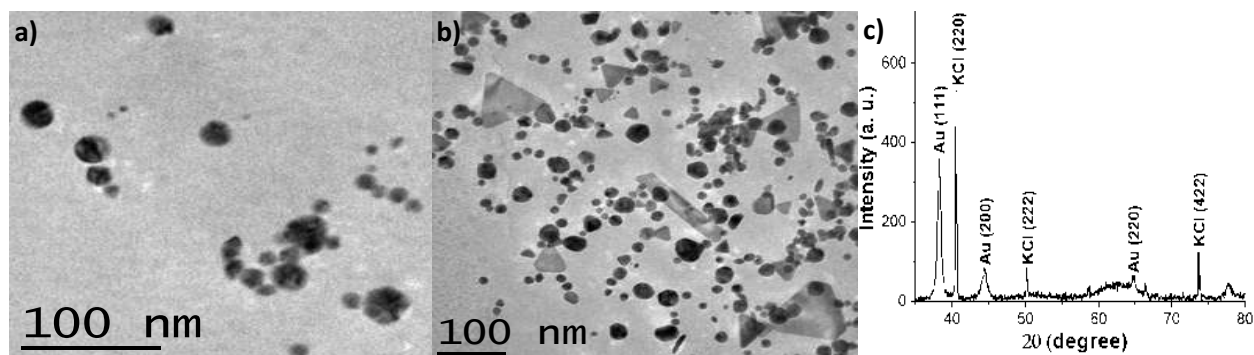


Figure 3. TEM micrographs of gold nanoparticles (a-b) and XRD diffraction pattern (c).

Effect of Temperature on the Green Synthesis of Gold Nanoparticles by *Cuphea aequipetala* Plant Extract

Amalia Del Moral, Gerardo Rosas and Tzarara Lopez

Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Morelia, Michoacan de Ocampo, Mexico

Over the past two decades, nanomedicine has experienced unprecedented expansive growth based on the development of nanomaterials [1]. The processing of nanomaterials must be highly reproducible that controls its composition and biocompatibility [2]. Synthesis methods through plant extracts mean a solution to reduce the use of pollutants for the environment. Moreover, due to its low toxicity, it can be used in some medicinal treatments [3].

In this work, the synthesis of Au nanoparticles was performed using *Cuphea aequipetala* plant extract, and the precursor salt used was tetrachloroauric acid (HAuCl_4). The extract was prepared using the whole plant, which was triturated to obtain fine powders. Later, the infusion was processed to mix 100 ml of deionized water with 1 g of plant powder heating at 60 ° C for 25 min. The resultant solution was filtered and used for Nps preparation. The gold precursor solution was elaborated at 5 mM in deionized water. For the synthesis process, 1 ml of *Cuphea aequipetala* extract was mixed with 1 ml of gold solution, generating a volume ratio of 1:1. As an essential part of this study, the temperature was modified, so the different conditions were room temperature, 40°C, 50°C and 60°C without agitation. After the synthesis procedure, the first indication of the formation of the nanoparticles was the color change from yellow to light purple. The size and size distribution was analyzed in an Ultraviolet-Visible spectrophotometer (Cary 5000, Varian), the morphology and size of the nanomaterials were observed by Scanning Electron Microscopy (JEOL JSM- 7600F), and the composition and crystal structure of the nanoparticles were determined using X-ray diffraction (Bruker D8 Advance, DAVINCI Lynx eye).

Figure 1 shows the UV-Vis spectra of gold nanoparticles, the peaks are located between 500 and 600 nm, and it is characteristic of Au nanostructures. In section a), the formation of AuNps is observed presenting a band with low absorbance (25°C), and it is extended when the temperature is increased, indicating an increment in the size of the synthesized nanostructures. It is noticeably appreciated in the temperature at 40 ° C, 50 ° C and 60 ° C. In section b), the sample synthesized at room temperature was used for the analysis of diffraction of X-rays, which demonstrates the crystalline structure of the gold being FCC denoted with planes 111, 200, 220, 311. Figure 2 presents Scanning Electron Micrographs of AuNps with the synthesis temperature modification. In subsection a) corresponding to the synthesis of AuNps at room temperature, it is appreciated that the nanoparticles are spherical and dispersed, having a size less than 20 nm. In subsection b) by using a temperature of 40 ° C, spherical particles with sizes close to 50 nm are distinguished, presenting coalescence. In section c) using a temperature of 50 ° C, it is observed that the particles are still spherically shaped but size close to 80 nm, and finally in subsection d) are distinguished faceted and quasi-spherical particles with a size close to 100 nm, which is due to the increase in temperature to 60 ° C.

In conclusion, in this work, it was observed that the *Cuphea aequipetala* plant is capable of synthesizing gold nanoparticles from its reducing and stabilizing agents. In addition to the fact that the increase in temperature generates an acceleration of the reaction producing larger structures, that is to say, higher production of nuclei and an accelerated coalescence, emphasizing that at room temperature, the smallest particles were produced with a spherical shape [4].

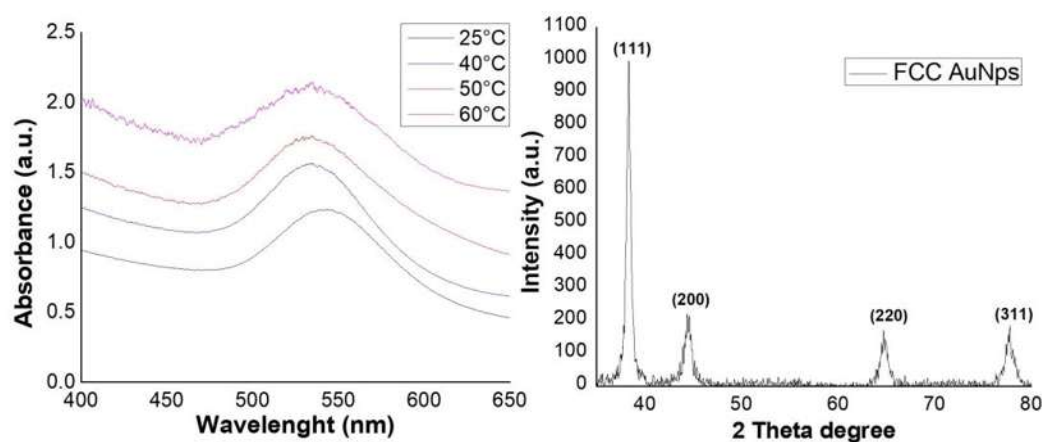


Figure 1. a) UV-Vis spectra of gold nanoparticles by modifying the temperature at 25°C, 40°C, 50°C and 60°C. b) X-ray diffraction pattern of AuNps sample synthesized at 25°C.

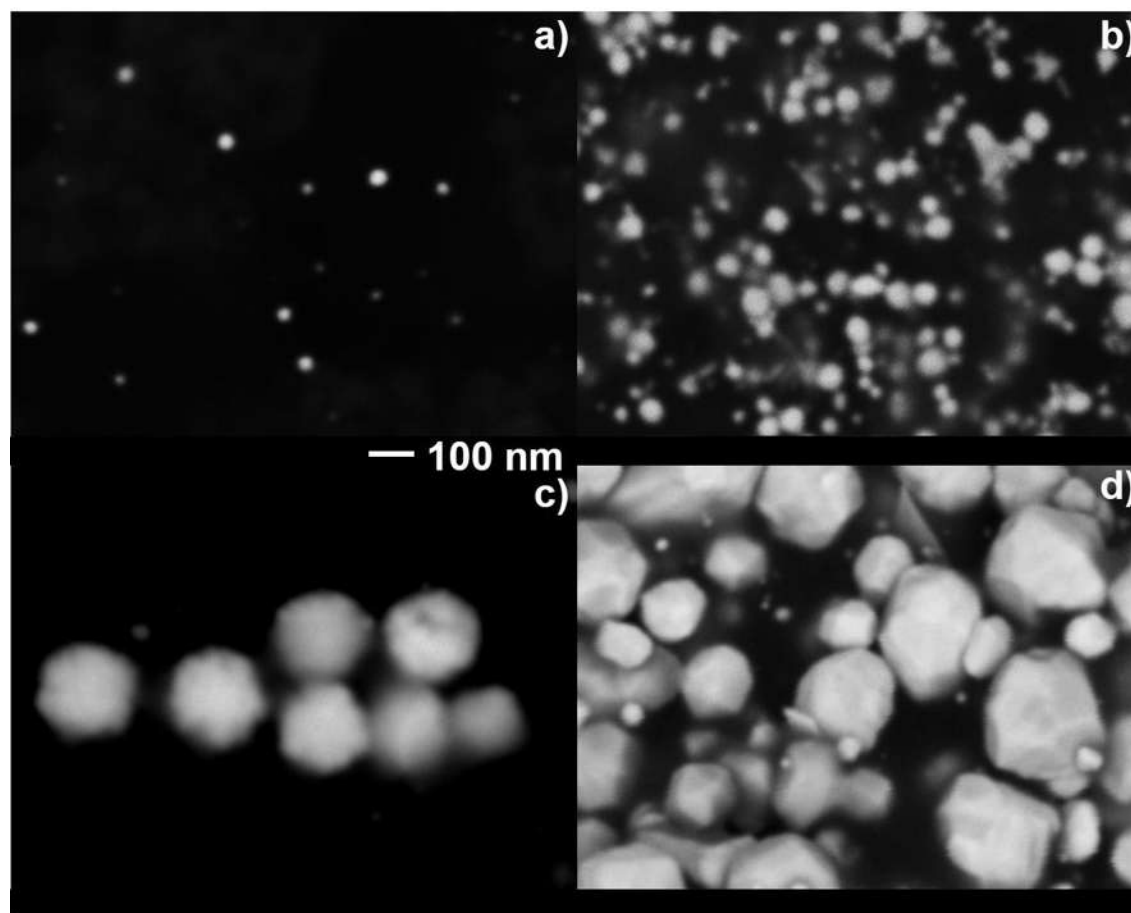


Figure 2. SEM images at 100 000 X, showing gold nanoparticles synthesized by modifying the temperature of a) room temperature, b) 40 ° C, 50 ° C, and d) 60 ° C.

References

- [1] NASROLLAHZADEH M, SAJADI S M, SAJJADI M,ISSAABADI Z. En; Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology. NASROLLAHZADEH M, SAJADI S M, SAJJADI M, ISSAABADI Z,ATAROD M. ed. Elsevier. 1 -27. 2019.
- [2] ADAMS F C,BARBANTE C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 86, 3-13, 2013.
- [3] GRUMEZESCU A M. *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. ed. Elsevier Science. 2018.
- [4] The authors appreciate the fundings provided by CONACyT.

TOEFL ITP Score Report

Name of Institution: UNIV MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HGO

Name: DEL MORAL AMALIA INES

DOB: 08/09/1993

Sex: F

Degree:

Native Country: Mexico

Native Language: Spanish

Scaled Scores:

Student Number:

Times Taken TOEFL: 1

Test Date: 03/29/2019

Form: TOEFL ITP

Listening Comprehension: 54

Structure & Written Expression: 50

Reading Comprehension: 53

Total Score: 523



The North American Computer Test is securely safeguarded. The paper contains a watermark. Hold it at an angle to view.

The TOEFL ITP Assessment Series is designed to be used for placement, progress monitoring, and exit purposes. TOEFL ITP scores can also be used for admissions to programs and institutions where English is not the dominant language of instruction for content courses. Learn more at www.ets.org/toefl_itp/use.

127-888-1027 • PBT 01610 • Printed in U.S.A.

J N 770462

Student's File Copy
Do Not Copy

Copyright © 2012 by Educational Testing Service.