



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE INGENIERÍA

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

TESIS

***Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Au  
con Potencial Aplicación Biomédica***

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Mayra Cecilia Ramírez Camacho

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA  
UNIDAD ENSENADA**

**Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Au con Potencial  
Aplicación Biomédica**

**TESIS QUE PRESENTA**

**Mayra Cecilia Ramírez Camacho**

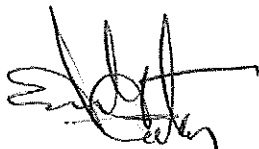
Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias**

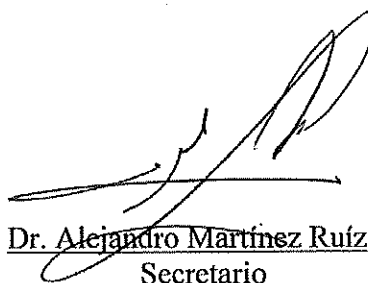
Aprobada por:



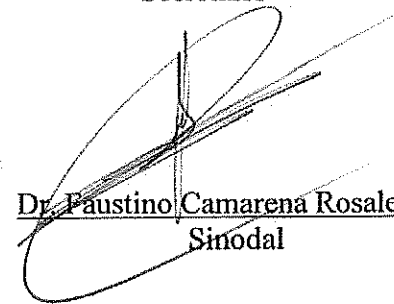
Dra. Nina Bogdanchikova  
Director de tesis  
Presidente



Dr. Leonel S. Cota Araiza  
Sinodal



Dr. Alejandro Martínez Ruíz  
Secretario

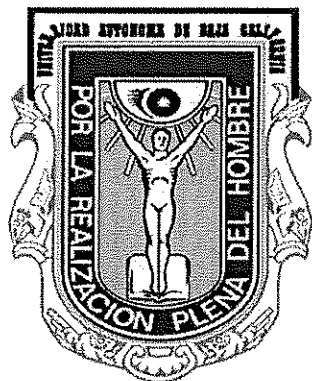


Dr. Faustino Camarena Rosales  
Sinodal

Ensenada Baja California, México. Junio 2010

# Agradecimientos





A la Dra. Nina Bogdanchikova, de quien he aprendido mucho, por sus buenos consejos  
y contribuciones a mi desarrollo académico y personal.

A Dr. Inga Tuzovskaya y M.C. Arturo Susarrey, por confiar en mí y crear oportunidades para  
el mejoramiento de mi investigación.

A Israel Gradilla, Francisco Ruíz, Jesús Antonio Díaz Hernández, Eric Flores, por su apoyo  
técnico en la caracterización de las muestras.

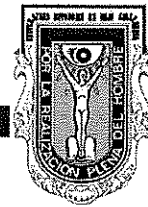
A Margot Saenz, Juan Peralta por su apoyo en el servicio de cómputo.

Al Dr. José Manuel Cornejo Bravo y Dr. Rodolfo Zanella, en la caracterización e  
interpretación de potencial zeta.

A Roberto Vázquez por su apoyo en la parte biológica.

A CNyN-UNAM y UABC  
y los proyectos CONACYT y PAPIIT

# Dedicatoria



A mis padres, por brindarme su amor y por ser un ejemplo constante de superación  
A mi familia, Alejandro, Leo, Araceli, Yetsira, y los cuates por darle alegría mis días  
A Adriana, Nuyeli, Liliana, Evelyn, Aldo, Yohanna por los momentos y las risas compartidas  
A Elienai, Marlene, Mache y a mis otros compañeros del posgrado, por hacer mi vida  
estudiantil más divertida y estimulante.



# Contenido



# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	.....	I
<b>Dedicatoria</b>	.....	II
<b>Figuras</b>	.....	VI
<b>Tablas</b>	.....	XI
<b><u>Capítulo 1 Introducción</u></b>		
Referencias Capítulo 1	.....	1
	.....	6
<b><u>Capítulo 2</u></b>		
2. Nanomateriales	.....	8
2.1 Descripción de NPs	.....	9
2.2 Síntesis de NPs metálicas.	.....	11
2.2.1. Síntesis de AuNPs esféricas	.....	12
2.2.2. Síntesis de AuNPs esféricas	.....	13
2.2.3. Propiedades de las AuNPs	.....	16
2.2.3.1. Teoría Mie	.....	20
Hipótesis	.....	23
Referencias Capítulo 2	.....	24
<b><u>Capítulo 3 Método Experimental</u></b>	.....	27
3.1 Selección de Métodos de Síntesis de AuNPs	.....	28
3.2 Preparación de las AuNPs	.....	30
3.2.1 Síntesis de AuNPs por el método de citrato	.....	30
3.2.2 Síntesis de AuNPs por el método de borohidruro	.....	32
3.2.3 Síntesis de AuNPs por el método de hidroxilamina	.....	33
3.3 Elección del método de citratos	.....	34

3.3.1 Optimización de la síntesis de AuNPs por el método de citratos	34
3.4 Funcionalización de AuNPs con cisteína	35
3.5 Técnicas de caracterización	36
3.5.1 Espectroscopia UV-Visible	36
3.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectrofotometría de energía dispersa (EDS)	38
3.5.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)	40
3.5.4 Potencial zeta	41
Referencias del Capítulo 3	45
<b>Capítulo 4</b>	47
4.0 Resultados y Discusión	47
4.1 Elección de Métodos de Síntesis de AuNPs	48
4.2. Caracterización de AuNPs	49
4.2.1 Muestras obtenidas por el método de citratos	49
4.2.1.a Caracterización química y morfológica por EDS y SEM	49
4.2.1.b Caracterización óptica por UV-Visible	50
4.2.1.c Caracterización de morfolología y tamaño por TEM	52
4.2.2 Muestras obtenidas por el método de borohidruro de sodio	53
4.2.2.a Caracterización química y morfológica por EDS y SEM	53
4.2.2.b Caracterización óptica por UV-Visible	55
4.2.2.c Caracterización de morfolología y tamaño por TEM	55
4.3.3 Muestras obtenidas por el método de hidroxilamina	56
4.3.3.a. Caracterización química y morfológica por EDS y SEM	56

4.2.3.b. Caracterización óptica por UV-Visible	.....	57
4.2.3.c. Caracterización de morfología y tamaño por TEM	.....	58
4.3 Estabilidad de los coloides de Au	.....	58
4.4 Reproducibilidad de síntesis de AuNPs	.....	59
4.5 Selección del método óptimo: síntesis de AuNPs por citratos	.....	61
4.6 Optimización del método de síntesis de citrato de sodio	.....	62
4.6.1 Análisis de las 4 muestras sintetizadas por el método de citrato	.....	66
4.7 Cinética durante almacenaje de AuNPs preparadas con citrato	.....	69
4.8 Funcionalización de AuNPs con cisteína	.....	73
4.8.1. Análisis de las 4 muestras seleccionadas funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína	.....	78
4.9 Almacenaje en aire y selección de muestras con cinética	.....	81
4.10 Carga del coloide por potencial Z	.....	85
Referencias Capítulo 4	.....	88
5. Conclusiones	.....	89

Figuras



# Indice de Figuras

## Capítulo 1

Figura 1. Principales aplicaciones terapéuticas de las AuNPs .....	4
--	---

## Capítulo 2

Figura 2. Clasificación de nanomateriales: a) 0-D nanopartículas de oro, b) 1-D fibras poliméricas, c) 2-D, películas poliméricas y d) 3-D superred obtenida por autoensamblaje de nanopartículas de oro .....	9
--	---

Figura 3. Clasificación de diferentes tipos de nanopartículas (a) según su morfología; (b) según su composición .....	10
---	----

Figura 4. Reducción de AuNPs usando ácido tánico y el método de reducción rápida y lenta .....	14
--	----

Figura 5. Micrografías SEM de AuNPs preparadas con a) citrato de sodio, aumento: 80,000 diámetros, 1 mm = 125 Å y b) ácido cítrico como agentes reductores, aumento: 40.000 diámetros, 1 mm = 250 Å .....	15
---	----

Figura 6. Esquema de división de energía desde el nivel atómico hasta sólido en bulto .....	16
---	----

Figura 7. Esquema del desplazamiento de los electrones de conducción de un metal al aplicar un campo electromagnético externo E. El desplazamiento origina una fuerza restauradora, proporcional al desplazamiento .....	18
--	----

Figura 8. Esquema de una nanopartícula en situación de equilibrio (a) y de no equilibrio (b) al aplicar un campo electromagnético externo E <sub>ext</sub> . El campo produce un desplazamiento de las cargas electrónicas, que se acumulan en la superficie de la partícula y producen un campo electromagnético que tiende a restaurar el equilibrio E <sub>rest</sub> .....	19
--	----

Figura 9. Diferentes interacciones electrónicas que las NPs presentan cuando son traspasadas por fotones de luz .....	21
---	----

Figura 10. Dispersiones coloidales de nanopartículas metálicas. Obsérvese que el color de la dispersión depende de las características de las nanopartículas .....	22
--	----

Figura 11. Espectros de soluciones coloidales de AuNPs .....	22
--	----

### **Capítulo 3**

Figura 12. Diagrama de preparación de AuNPs por método de citrato de sodio	31
Figura 13. Diagrama para la preparación de AuNPs por el método de borohidruro de sodio	32
Figura 14. Diagrama para la preparación de AuNPs por el método de hidroxilamina	33
Figura 15. Esquema de funcionalización de AuNPs con cisteína	35
Figura 16. (a) Equipo UV-visible Cary 300 Scan y (b) cubeta de cuarzo óptico	36
Figura 17. Diagrama de un espectrofotómetro UV-visible típico	37
Figura 18. SEM JSM-5300	38
Figura 19. Esquema de tipos de electrones emitidos	39
Figura 20. (a) TEM JEM-2010 <sup>22</sup> y (b) rejilla de cobre para colocar la muestra	40
Figura 21. Esquemático de la trayectoria del haz de electrones para TEM	41
Figura 22. (a) Equipo de medición de potencial zeta, (b) celda utilizada	41
Figura 23. Representación esquemática del potencial zeta	42
Figura 24. Configuración óptica del equipo de potencial zeta	43

### **Capítulo 4**

Figura 25. Diferencias principales entre los tres métodos de síntesis elegidos.	48
Figura 26. Moléculas reductoras y estabilizadoras de la suspensión coloidal: (a) citrato de sodio; (b) borohidruro de sodio; (c) sulfato de bis (hidroxilamina); (d) gelatina	49
Figura 27. Estudio EDS de partícula típica de la muestra	50

Figura 28. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de citrato de sodio, con (a) menor y (b) mayor amplificación, imagen del patrón que se observa en toda la muestra	50
Figura 29. Espectro UV-VIS de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada	51
Figura 30. Espectro UV-Vis que muestra la medición del ancho de pico: (a) ajuste del ancho de pico al origen y (b) medición del ancho de pico	52
Figura 31. Micrografías TEM de nanopartículas de oro preparadas con el método de citratos con diferentes ampliaciones	53
Figura 32. Estudio EDS de partícula típica mostrada en SEM	54
Figura 33. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de borohidruro de sodio con (a) menor y (b) mayor amplificación	54
Figura 34. Espectro UV-Vis de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada	55
Figura 35. Micrografía TEM de nanopartículas de oro preparadas con el método de borohidruro de sodio (a) mayor y (b) menor magnificación	55
Figura 36. Estudio EDS de partícula típica mostrada en SEM. El análisis elemental denota la presencia de oro una vez que las NPs se lavaron	56
Figura 37. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de hidroxilamina (a) menor y (b) mayor amplificación	57
Figura 38. Espectro UV-VIS de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada	57
Figura 39. Micrografía de TEM de muestra preparada por el método de ácido sulfúrico de hidroxilamina (a) menor y (b) mayor amplificación	58
Figura 40. Fotografía de soluciones coloidales después de 2 horas de haber sido sintetizadas, (a) método de citratos, (b) borohidruro de sodio, (c) método de hidroxilamina	59

Figura 41. Reproducibilidad de las muestras sintetizadas con el método de citrato de sodio	60
Figura 42. Espectro UV-Vis de la reproducción del método de citrato de sodio	60
Figura 43. Representación de diámetros de las AuNPs obtenidas por los 3 métodos	61
Figura 44. (a) Espectro UV-VIS de las muestras preparadas con diferentes concentraciones de citrato	63
Figura 44. (b) Espectro UV-VIS de las muestras preparadas con diferentes concentraciones de citrato de sodio con ajuste	64
Figura 45. Máximos de absorbancia de muestras preparadas con diferentes concentraciones de reductor; (a) intensidad de picos; (b) posición de picos; (c) anchura de picos de los datos obtenidos por espectroscopia UV-visible	65
Figura 46. Espectro UV-visible de los máximos de absorbancia de las 4 muestras seleccionadas, AuCit	66
Figura 47. Micrografías de TEM con diferentes ampliificaciones. El inserto muestra el histograma de distribución de diámetros de nanopartícula. a) AuCit 1:1; b) AuCit 1:3	68
Figura 47. Micrografías de TEM con diferentes ampliificaciones. El inserto muestra el histograma de distribución de diámetros de nanopartícula. c) AuCit 1:10; d) AuCit 1:20	69
Figura 48. Espectros UV-vis (a) al momento de síntesis; (b) una semana de haber sido sintetizadas	71
Figura 48. Espectros UV-Vis. (c) dos semanas; (d) cuatro semanas después de haber sido sintetizadas las muestras	72
Figura 49. Grafica de pH contra concentración de cisteína agregada.	73
Figura 50. Espectro UV-VIS (a) ocho muestras funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína	74
Figura 50. Espectro UV-VIS (b) ocho muestras	

funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína con ajuste .....	75
Figura 51. Gráficos de datos obtenidos de las ocho muestras funcionalizadas con cisteína (a) máximos de absorbancia; (b) posición de picos en el espectro; (c) ancho de pico .....	76
Figura 52. Muestras elegidas para ser estudiadas .....	77
Figura 53. Fotografía de a) AuCitCys 1:10:20; b) AuCitCys 1:10:30; c) AuCitCys 1:10:200; y d) AuCitCys 1:10:300 .....	77
Figura 54. Micrografías de TEM de a) AuCitCys 1:10:20 y b) AuCitCys 1:10:30, con diferente amplificación .....	79
Figura 54. Micrografía de TEM de c) AuCitCys 1:10:200 y d) AuCitCys 1:10:300, con diferente amplificación .....	80
Figura 55. Espectro UV-VIS de muestra AuCitCys 1:10:20 .....	81
Figura 56. Espectro UV-VIS de muestra 1:10:30 .....	82
Figura 57. Enlaces nanopartículas debido a las moléculas de cisteínas .....	82
Figura 58. Espectro UV-VIS, de muestra 1:10:200 .....	83
Figura 59. Espectro UV-VIS de muestra 1:10:300 .....	83
Figura 60. Aglomeración de AuNPs .....	84
Figura 61. Cambios de potencial zeta al funcionalizar las AuNPs con cisteína .....	86

# Tablas



# Indice de Tablas

## Capítulo 1

Tabla 1. Tabla que muestra ligandos y la superficie que estos funcionalizan .....	3
---	---

## Capítulo 2

Tabla 2. Ejemplos típicos de varias NPs .....	9
---	---

Tabla 3. Resumen de precursores, reductores y estabilizadores poliméricos .....	12
---	----

Tabla 4. Comparación de tamaños promedio de AuNPs utilizando varios agentes reductores .....	15
--	----

Tabla 5. Valores de diámetros promedio calculados teóricamente $d_{teor}$ , valores determinados experimentalmente $d_{exp}$ y máximos de absorción $\lambda_{abs}$ .....	22
---	----

## Capítulo 3

Tabla 6. Parámetros a considerar durante la selección de método de síntesis . .....	28
---	----

Tabla 7. Tabla comparativa de métodos de síntesis obtenidos de la literatura .....	29
--	----

Tabla 8. Reactivos utilizados para la síntesis y funcionalización de las AuNPs .....	44
--	----

Tabla 9. Comparativo de los métodos utilizados y cumplimiento de condiciones deseadas .....	61
---	----

## Capítulo 4

Tabla 10. Condiciones de preparación de coloides de Au .....	63
--	----

Tabla 11. Información de posición, intensidad y anchura de picos obtenida de los espectros UV-Visible .....	65
---	----

Tabla 12. Concentración de cisteína para muestras. pH de la cisteína es 3.39 .....	73
--	----

Tabla 13. Información de posición, intensidad y anchura de picos obtenida de los espectros UV-visible .....	76
---	----

Tabla 14. Diámetro y carga neta del coloide medido por potencial Z

.....



## Capítulo 1 Introducción

Desde la famosa conferencia de Richard Feynman (1959) titulada: *There's plenty of room at the bottom*, el mundo volteó los ojos hacia la nanotecnología<sup>1</sup>, la cual tiene como objetivo la investigación y desarrollo a nivel atómico, molecular o macromolecular a una escala inferior a los 100 nm para crear estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades funcionales innovadoras<sup>2</sup>.

Los materiales se comportan de manera diferente a escala nanométrica de como lo hacen los mismos materiales a mayor escala<sup>3</sup>, es decir, las propiedades físicas y químicas, tales como la conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad y la reactividad, entre otras, cambian en los nanomateriales.

Este descubrimiento ha provocado el desarrollo de nuevos nanomateriales con características provechosas para implementar tecnologías en diversos campos tales como en la industria de la energía<sup>4</sup>, en información y comunicaciones, el desarrollo de bienes consumibles<sup>5</sup>, el mejoramiento del medio ambiente, y en los campos de la biología y la medicina<sup>6</sup>.

En estos dos últimos campos ha surgido un área de gran interés que es la *nanobiotecnología*. En esta área de estudio se aplica la ingeniería, construcción y manipulación de


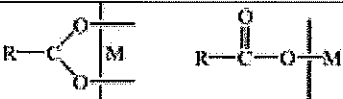


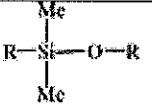
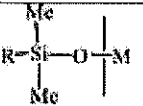
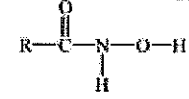
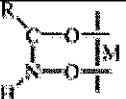
nanoestructuras en un rango de 1 – 100 nm, utilizando modelos biológicos como inspiración<sup>7</sup> para el desarrollo de materiales que puedan insertarse en sistemas biológicos y así crear nuevos tratamientos contra enfermedades. Estas nanopartículas deben mostrar alto grado de biodegradación y mínima toxicidad<sup>8</sup>. Por ejemplo, en la actualidad los tratamientos de quimioterapia en cáncer por administración sistémica intravenosa son agresivos y causan daños severos a las células y a los tejidos saludables, provocando efectos secundarios que contribuyen a la degradación de la salud del paciente. Para minimizar el daño colateral asociado con la quimioterapia, comúnmente se utilizan dosis menores a las óptimas, porque la administración de las dosis necesarias para inducir el efecto anti-cáncer deseado podría matar al paciente<sup>9</sup>. La *nanobiotecnología* puede utilizarse para diseñar nanomateriales que transporten un fármaco anticanceroso a un sitio específico en el que tenga un efecto en particular sin afectar a otras células o a otros tejidos. El direccionamiento de fármacos implica una liberación lenta y selectiva del fármaco en el órgano deseado. Es deseable que los nanomateriales se desplacen inalterados hasta el área tumoral, y que eviten al sistema inmunológico y no se acumulen en órganos y tejidos saludables.

Los aspectos fundamentales para la fabricación de nanopartículas transportadoras de fármacos son los siguientes: baja o casi nula citotoxicidad, ausencia de efectos secundarios, estabilidad química durante el transporte, selectividad y bajo costo<sup>10</sup>. Se han creado varios transportadores tales como: polímeros<sup>11</sup>, dendrímeros<sup>12</sup>, liposomas<sup>13</sup>, nanotubos<sup>14</sup>, nanorodillos<sup>14</sup>.

Una de las formas de producir nanopartículas (NPs) afines a los organismos vivos es que las NPs sean recubiertas o funcionalizadas con moléculas biológicas. Éstas pueden interactuar o enlazarse con el sustrato biológico y así proporcionar una manera controlable de direccionamiento y de etiquetado.

En la Tabla 1 se muestran los diferentes tipos de ligandos y superficies que funcionalizan a las NPs<sup>15</sup>.

Tabla 1. Tabla que muestra ligandos y la superficie que estos funcionalizan

Ligando	Nombre	Superficie que modifica	Enlace propuesto
R-S-H	Tiol	Au, Ag, Cu, Hg, Fe	$R-S-M$
R-S-S-R	Disulfuros		
R-N <sup>+</sup> ≡C <sup>-</sup>	Isocianido	Pt, Pd	$R-C≡N-M$
	Ácido carboxílico	Óxidos metálicos	
	Fosfonatos	Óxidos metálicos	
	Silohexanos	Óxidos metálicos	
	Ácidos hidroxámicos	Óxidos metálicos	

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido ampliamente estudiadas por sus excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Son biocompatibles y presentan baja toxicidad<sup>16</sup>, pueden ser producidas en distintos tamaños, formas y se funcionalizan fácilmente con un amplio abanico de ligandos<sup>17</sup>. En un estudio que tuvo por objeto determinar la citotoxicidad e inmunogenicidad de las AuNPs frente a células macrofágicas, se observó que las AuNPs no son tóxicas, no disparan la respuesta inmune y son capturadas por los mecanismos de crecimiento de las células. Estos resultados son sólo un ejemplo que confirma la biocompatibilidad de las AuNPs, corroborando su excelente potencial en nanoimmunología, y para la nanobiotecnología y nanomedicina<sup>18</sup>.

Entre las propiedades únicas de las AuNPs podemos mencionar que: a) el oro puede ser funcionalizado por medio de grupos tiol<sup>19</sup>; b) el control del tamaño de las AuNPs es relativamente sencillo; c) sus características de plasmón que puede ir desde el rango visible hasta el infrarrojo nos

permiten una rápida caracterización al momento de la síntesis<sup>20</sup>; d) y su baja toxicidad. Las AuNPs también tienen un alto grado de estabilidad y biocompatibilidad. La funcionalización de las AuNPs se realiza generalmente mediante enlaces tiol<sup>21</sup>, (véase Tabla 1) si bien también muestran afinidad por los grupos amino, fosfito y bisulfito. Numerosas moléculas han sido ligadas a la superficie de las AuNPs con distintos propósitos, con lo que ha quedado demostrado su amplio rango de aplicación. La molécula cisteína es predominante en el plasma sanguíneo con una concentración de 8µM y cuenta con un grupo tiol. Además, también tiene dos grupos funcionales (COO<sup>-</sup> y NH<sub>2</sub>) estos nos pueden servir para adherir alguna molécula de interés farmacéutico<sup>22</sup>. Inclusive, en las AuNPs funcionalizadas se pueden utilizar procedimientos de modificación post-sintética<sup>23</sup>.

En la Figura 1 se muestran algunas aplicaciones interesantes y prometedoras de las AuNPs desde el punto de vista terapéutico y de liberación de fármacos.

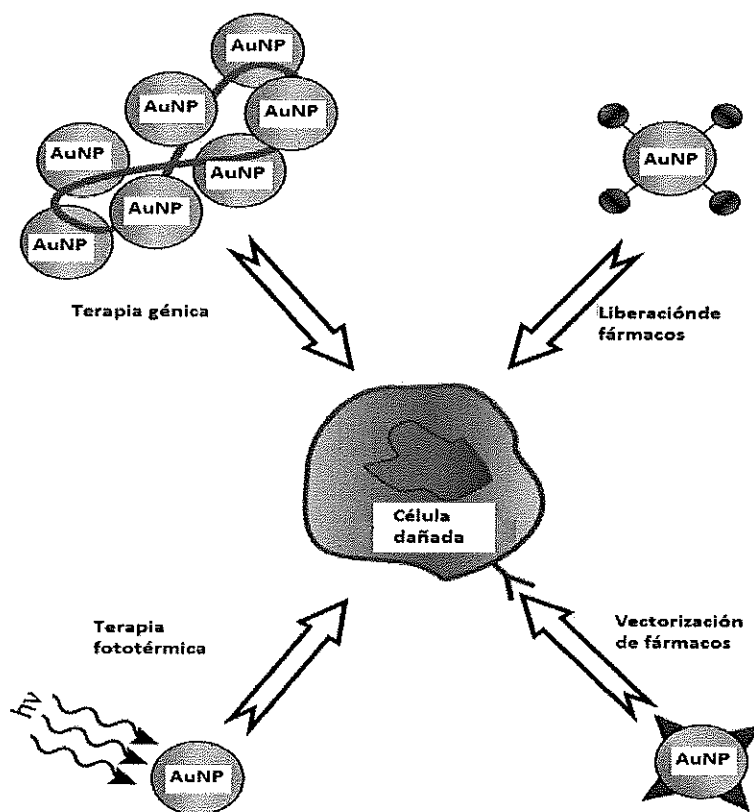


Figura 1. Principales aplicaciones terapéuticas de las AuNPs.

Las AuNPs han sido funcionalizadas con péptidos<sup>24</sup> que favorecen su transporte a través de la membrana celular. También se utilizan para la vectorización de componentes celulares. El péptido TAT (indicador de localización nuclear) permite a las TAT-AuNPs atravesar la membrana celular (células humanas de fibroblasto) para ubicarse dentro del núcleo<sup>25</sup>.

El objetivo de este estudio es realizar una revisión de varios métodos de síntesis de AuNPs y elegir uno para sintetizar AuNPs esféricas. Posteriormente, las AuNPs se funcionalizarán con el aminoácido cisteína para obtener un conjugado NP-ligando y en el futuro probarlas como nanotransportadores de fármacos en sistemas biológicos.

## Referencias Capítulo 1

---

- <sup>1</sup> Plenty of Room for Biology at the Bottom: An Introduction to Bionanotechnology, E. Gazit, Imperial College Press (2007).
- <sup>2</sup> Avances Recientes en Nanomedicina Básica y Clínica, K. J. Morrow et al, Med. Clin. N Am, 91 (2007), 805-843.
- <sup>3</sup> <http://www.accenture.com/NR/rdonlyres/8CABEEEE-B177-42C0-A668-5FB649DBF984/0/ResumenejecutivoNANOTECONOLOGIA.pdf>
- <sup>4</sup> EPS Nano Fuel Devices Series, [www.bluefueltechnology.com](http://www.bluefueltechnology.com)
- <sup>5</sup> [www.nanopedia.case.edu/](http://www.nanopedia.case.edu/)
- <sup>6</sup> Nanotechnology Demystified, Demystified Series, L. D. Williams, W. Adams, McGraw-Hill.
- <sup>8</sup> Nanostructured Materials for Biomedical Applications, D. Shi et al; Journal of Nanomaterials (2008) 2.
- <sup>9</sup> Nanotechnology Environmental Implications and Solutions, L. Theodore, WILEY, 92-93.
- <sup>10</sup> Nano The Essentials, T. Pradeep, McGraw-Hill Professional (2007).
- <sup>11</sup> Targeted Charge-Reversal Nanoparticles for Nuclear Drug Delivery, P.S. Xu et al, Angew. Chem., Int. Ed. 46 (2007) 4999–5002.
- <sup>12</sup> Acid- and Salt-triggered Multifunctional Poly (propylene imine) Dendrimer as a Prospective Drug Delivery System, C. M. Paleos et al, Biomacromolecules, 5 (2004) 524–529.
- <sup>13</sup> The Vesosome — Multicompartment Drug Delivery Vehicle, E.T. Kisk, et al, Curr. Med. Chem., 11 (2004), 199–219.
- <sup>14</sup> Targeted Delivery of Amphotericin B to Cells by Using Functionalized Carbon Nanotubes, S. M. Prato et al, Angew. Chem., Int. Ed., 44 (2005) 6358–6362.
- <sup>15</sup> Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, R. W. Murray et al, Langmuir, (1998) 14, 17-30.
- <sup>16</sup> Gold Nanoparticles are Taken up by Human Cells But Do Not Cause Acute Citotoxicidad, E. Connor, et al, Small, 1 (2005) 3, 325-327.
- <sup>17</sup> Biological Properties of Naked Metal Nanoparticles, Bhattacharyar et al, Advance Drug Delivery Reviews, 60 (2008) 1289-1306.
- <sup>18</sup> Biocompatibility of Gold Nanoparticles and their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview, R. R. Bhonde et al, Langmuir, 21 (2005) 23, 10644-10654.

<sup>19</sup> Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, G. M. Whitesides et al, *Chem Rev.*, 105 (2005), 1103-69.

<sup>20</sup> Biological and Chemical Gold Nanosensors Based on Localized Surface Plasmon Resonance, G. Barbillon et al, *Gold Bull.* (2007) 402, 40-44.

<sup>21</sup> Polymer Size and Concentration Effects on the Size of Gold Nanoparticles Capped by Polymeric Thiols, P.V. Braunet et al, *Langmuir*, (2004) 20, 5613-5620.

<sup>22</sup> Glutathione Measurement in Human Plasma Evaluation of Sample Collection, Storage and Derivatization Conditions for Analysis of Dansyl Derivatives by HPLC, D.P. Jones, *Clin. Chim. Acta*, 275 (1998), 175-184.

<sup>23</sup> Coating Gold Nanoparticles with Peptide Molecules Via a Peptide Elongation Approach, Y. Gao et al, *Colloids Surf., B Biointerfaces*, (2003) 28, 199-207.

<sup>24</sup> Functional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents, L. Sun et al, *Langmuir* 24 (2008) 18, 10293-10297.

<sup>25</sup> Tat Peptide as an Efficient Molecule to Translocate Gold Nanoparticles Into the Cell Nucleus, C.C. Berry et al, *Bioconjug. Chem.*, 16 (2005), 1176-1180.

# Antecedentes



## **Capítulo 2**

### **2. Nanomateriales**

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (ya sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de los anteriores) cuyas dimensiones por lo menos una mide entre 1 y 100 nm. Las propiedades de los materiales difieren si se presentan en dimensiones nanométricas o en mayores dimensiones. De acuerdo al número de dimensiones que tienen proporciones nanométricas, los nanomateriales se pueden clasificar (Figura 2) en cuatro tipos:

- a) Materiales de dimensiones cero: las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico (puntos cuánticos, NPs)
- b) De una dimensión: tienen longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de los nanómetros (nanotubos y nanoalambres)
- c) De dos dimensiones: tienen áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm (películas delgadas)
- d) De tres dimensiones: en la que los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas (superred)<sup>1</sup>.

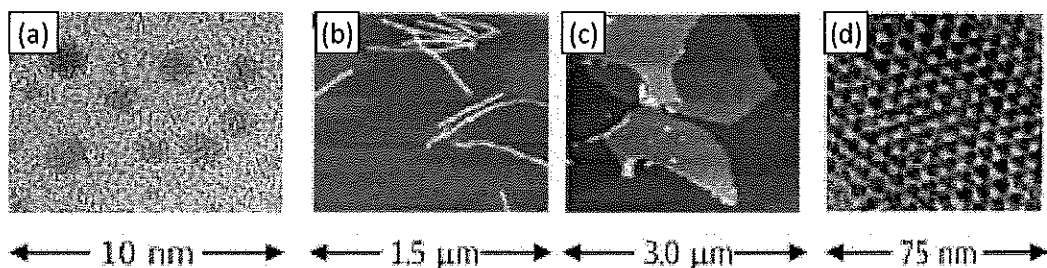


Figura 2. Clasificación de nanomateriales: a) 0-D nanopartículas de oro, b) 1-D fibras poliméricas, c) 2-D, películas poliméricas y d) 3-D superred obtenida por autoensamblaje de nanopartículas de oro<sup>1</sup>

A continuación sólo consideraremos los nanomateriales de dimensión cero, nanopartículas, ya que sus propiedades, métodos de síntesis y aplicaciones son los que interesan en este estudio.

## 2.1 Descripción de NPs

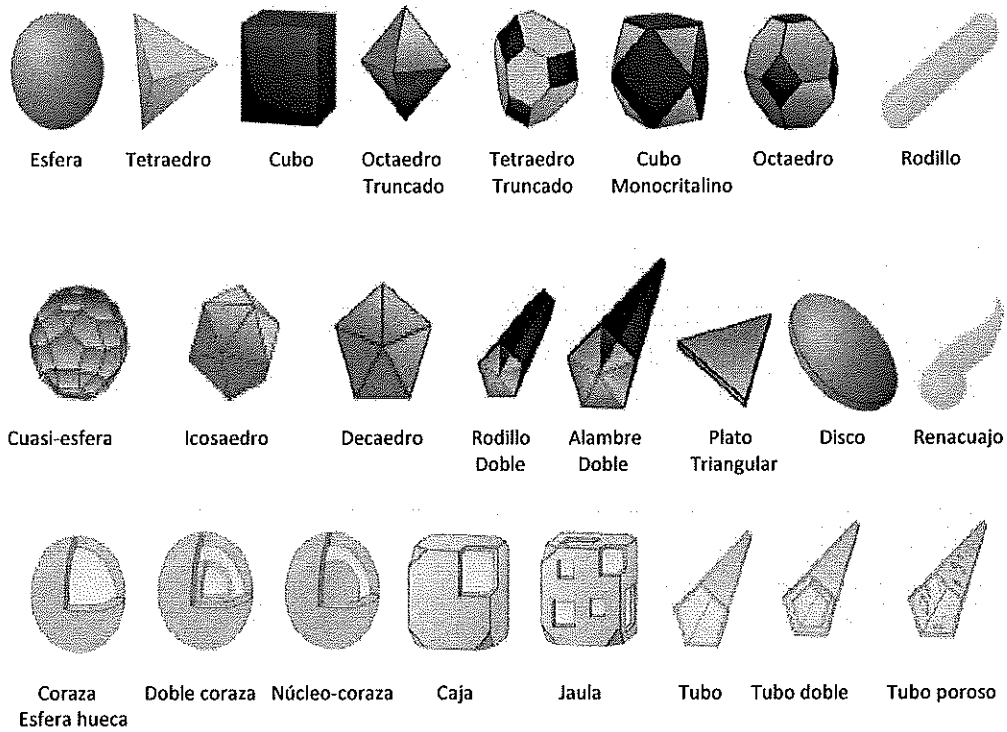
Como hicimos referencia al principio de este capítulo, las NPs pueden definirse como aquellas partículas de cuyas dimensiones se encuentran dentro del rango entre 1 - 100 nm. Estas partículas pueden consistir de 10 hasta 10,000 átomos<sup>2</sup>.

Las NPs se caracterizan por su tamaño y morfología (esfera, tetraedro, cubo, placas triangulares<sup>3</sup> y otras, Figura 3a). Pueden estar compuestas de materiales semiconductores, metálicos, óxidos de metal, orgánicos, poliméricos y biológicos (Tabla 2). Una nanopartícula puede ser amorfa o cristalina. Cuando es cristalina usualmente se llama nanocrystal.

Tabla 2. Ejemplos típicos de varias NPs.

Composición	Nanopartículas
Metales puros	Au, Ag, Pd, Pt, Cu, Ni, Ru, etc.
Bimetales	Fe-Co, Co-Ni, Pd-Au, etc.
Aleaciones	FePt, CoPt, PdNi, PtRu, etc.
Semiconductores	GaAs, CdTe, CdSe, CdS, ZnSe, AgBr, etc.
Óxidos	SiO <sub>2</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , TiO <sub>2</sub> , CeO <sub>2</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , ZrO <sub>2</sub> , ZnO, SnO <sub>2</sub> , etc.

(a) Por morfología



(b) Por composición, estructura de nanocompuestos.

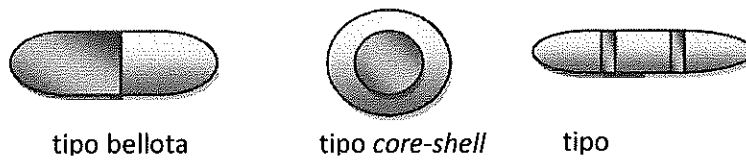


Figura 3. Clasificación de diferentes tipos de nanopartículas (a) según su morfología; (b) según su composición.

Los nanotubos de carbón y nanotubos de péptidos son ejemplos típicos de nanoestructuras tipo tubo, mientras que las NPs basadas en fulerenos y una variedad de cápsulas nanométricas orgánicas, inorgánicas, poliméricas o biológicas se pueden clasificar como tipo esfera hueca (Figura 3b). Por composición, las nanopartículas tipo bellota, *core-shell* y alternativos han sido ampliamente sintetizadas.

## 2.2 Síntesis de NPs metálicas

La obtención de nanopartículas metálicas estables en solución ha sido un área muy activa de investigación. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las de metales nobles como Au<sup>4</sup>, Ag<sup>5</sup>, Pt<sup>6</sup> y Pd<sup>7</sup>, fundamentalmente.

Se han desarrollado diversos métodos de síntesis de nanopartículas metálicas, tanto químicos como físicos, con el propósito de diseñar sus dimensiones, forma, composición y modificadores de superficie, y así controlar el comportamiento de las NPs frente a diversos estímulos (por ejemplo: radiación electromagnética o reactividad química, entre otros).

Para la síntesis de nanopartículas metálicas<sup>1</sup>, específicamente en dispersiones coloidales, se utilizan diferentes tipos de precursores, reductores, otros compuestos químicos y otros métodos, con el fin de promover o controlar la reacción de reducción, la nucleación inicial y crecimiento subsecuente de los núcleos iniciales.

En la Tabla 3, se resumen las variables utilizadas en diferentes síntesis de dispersiones coloidales metálicas. Los precursores pueden ser metales elementales, sales inorgánicas y complejos metálicos tales como: Ni, Co, H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, RhCl<sub>3</sub> y PdCl<sub>2</sub>. Los agentes reductores: citrato de sodio, peróxido de hidrógeno, hidrocloreto de hidroxilamina, ácido cítrico, monóxido de carbono, fósforo, hidrógeno, formaldehído, metanol acuoso, carbonato de sodio y hidróxido de

---

\* Los términos cúmulo y nanocúmulo en algunas partes de la literatura se utilizan como sustituto de la palabra nanopartícula. Algunas veces, se utilizan para referirse a agregados de partículas coloidales. Sin embargo, en este trabajo definimos a los cúmulos a agregados de átomos en el rango menor a 1 nm.

sodio. Algunos ejemplos de estabilizadores poliméricos son: alcohol de polivinil (PVA) y policrilato de sodio<sup>8</sup>.

Tabla 3. Resumen de precursores, reductores y estabilizadores poliméricos

Precursor	Agente reductor	Estabilizador polimérico
Ánodo metálico (Pd, Ni, Co)	Hidrogeno (H <sub>2</sub> )	Polivinilpirrolidona (PVP)
Cloruro de paladio (PdCl <sub>2</sub> )	Citrato de sodio (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	Polivinil alcohol (PVA)
Hidrógeno hexacloroplatinato IV (H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> )	Hidrocuro de Hidroxilamina (NH <sub>4</sub> OH+HCl)	Polietileno-amida
Potasio tetracloroplatinato II K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> )	Monóxido de carbono (CO)	Polifosfato de sodio
Nitrato de plata (AgNO <sub>3</sub> )	Fósforo en éter (P)	Poliacrilto de de sodio
Tetraoxiclorato de plata (AgClO <sub>4</sub> )	Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Polifosfato de sodio
Ácido cloroáurico (HAuCl <sub>4</sub> )	Peróxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Halogenuros de tetralquilamonio
Cloruro de rodio (RhCl <sub>3</sub> )	Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) Hidróxido de sodio (NaOH) Formaldehído (HCHO) Tetraborohidruo de sodio (NaBH <sub>4</sub> ) Iones de amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	

### 2.2.1. Síntesis de AuNPs esféricas

Las AuNPs<sup>9,10</sup> son nanopartículas metálicas muy estables; presentan aspectos tales como el ensamblado de múltiples tipos, lo que las involucra con la *Ciencia de los Materiales* que estudia el comportamiento de partículas individuales, con la Electrónica relacionada con el tamaño, propiedades magnéticas y ópticas (efecto de tamaño cuántico) de las AuNPs, y con sus aplicaciones en la Catálisis y la Biología.

En comparación con la mayoría de nanomateriales inorgánicos, las AuNPs pueden ser sintetizadas en una gran variedad de formas como: triángulos, hexágonos, estrellas, rodillos (nanorod), etc. La morfología más común es la esférica. Durante la síntesis, el cloruro de oro es

agregado a un solvente acuoso en la presencia de un agente reductor. Las NPs se forman rápidamente, lo cual es observado por el cambio de color en la solución que va del amarillo al rojo. Cuando se utiliza un estabilizador neutral como el citrato, no existe favorecimiento de planos cristalográficos. En la mayoría de los métodos de síntesis, se utilizan moléculas estabilizadoras que contengan fosfina, tioles, carboxilato, o aminas. Estas moléculas son importantes, principalmente por la interacción entre la superficie de las nanopartículas y el baño que las rodea. Si no se cuenta con agentes estabilizadores, las partículas en la solución son más susceptibles a la oxidación y las fuerzas de atracción de *Van der Waals* lo que causa que se agreguen y precipiten de la solución.

Existe una gran variedad de métodos de síntesis y estabilización de NPs. A continuación se presenta una lista de algunos métodos, en la que el acomodo ha sido arbitrario: reducción de citrato<sup>11</sup>, Brust-Schiffrin, método de dos fases, síntesis y estabilización por tioles<sup>12</sup>, ligandos de sulfuro<sup>13</sup>, di-sulfuro<sup>14</sup>, tri-tioles<sup>15</sup> otros ligandos son: fosfina<sup>16</sup>, óxido de fosfina<sup>17</sup>, ligandos de carboxilato<sup>18</sup>, microemulsión<sup>19</sup>, micelas reversas<sup>20</sup>, surfactantes, membranas<sup>21</sup>, y polielectrolitos<sup>22</sup>, *seeding growth*<sup>23</sup>; y métodos físicos como la fotoquímica<sup>24</sup>, sonoquímica<sup>25</sup>, radiólisis<sup>26</sup> y termólisis<sup>27</sup>.

Una de las metas de esta tesis es realizar una comparación entre varios métodos de síntesis de AuNPs, lo que se hará detalladamente en el capítulo 3 de Metodología Experimental.

### 2.2.2. Síntesis de AuNPs esféricas

En la Figura 4 se muestra un esquema del crecimiento controlado de AuNPs, donde el tamaño es elegido por la porción entre ácido tánico y citrato utilizado para reducir Au (III), en nanopartículas de oro metálico Au (0). El ácido tánico es un reductor más agresivo que el citrato y genera núcleos de oro rápidamente, a lo que le sigue la reducción de los núcleos sobrantes por el citrato (el citrato reduce los núcleos sobrantes inmediatamente después). Geuze et al<sup>30</sup>, utilizaron esta diferencia en actividad de reducción por dos reductores distintos para crecer AuNPs con una distribución de tamaño muy estrecha de  $\sim 3$  a  $17$  nm<sup>28</sup>. A concentraciones menores de ácido tánico se forman menor cantidad de núcleos, permitiendo al citrato terminar de reducir el resto de Au (III) en núcleos. Esto produce AuNPs más grandes (hasta 50 nm) pero con una distribución de tamaño heterogénea. Sin embargo, utilizar concentraciones mayores de ácido tánico puede

producir nanopartículas más pequeñas, ya que estas altas concentraciones llevan a la rápida formación de un número mayor de núcleos.

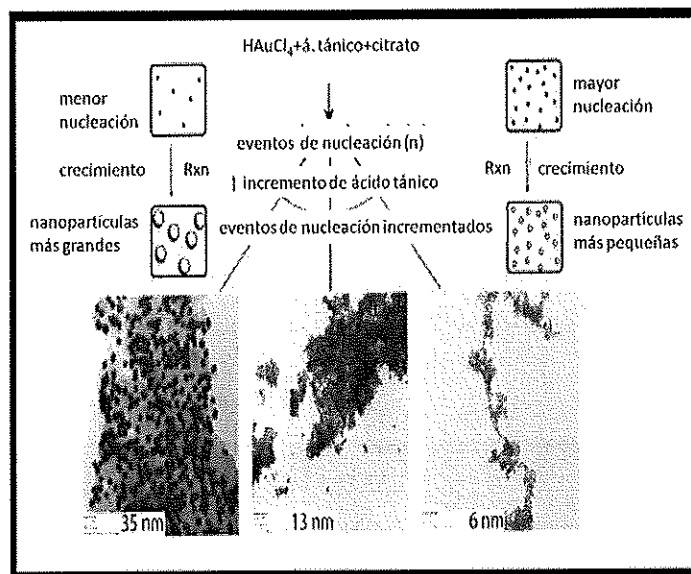


Figura 4. Reducción de AuNPs usando ácido tánico y el método de reducción rápida y lenta<sup>30</sup>.

La formación de partículas más pequeñas por debajo de los 3 nm de diámetro requiere de reductores más agresivos. Murray et al<sup>31</sup> y Hutchinson et al<sup>32</sup> han mostrado separadamente que el uso de borohidruro de sodio a temperatura ambiente es lo suficientemente agresivo para la nucleación y formación de pequeñas NPs en un intervalo de 1.5 nm<sup>29</sup> a 5.2 nm<sup>30</sup>. Para estudios de este tipo, los agentes estabilizadores como fosfinas y alcanotioles son importantes para controlar la reacción y mantener distribuciones de tamaño estrecho.

En general, una reacción de reducción fuerte promueve una alta velocidad de reacción y favorece la formación de nanopartículas más pequeñas<sup>31</sup>. Un agente reductor débil, induce una velocidad de reacción más baja y favorece la formación de partículas relativamente grandes. Por lo tanto, el tamaño y la distribución de tamaño de coloides metálicos varía significativamente con el tipo de agente reductor utilizado.

La influencia de varios agentes reductores en el tamaño y la distribución de AuNPs se resume en la Tabla 4<sup>34</sup>.

Tabla 4. Comparación de tamaños promedio de AuNPs utilizando varios agentes reductores<sup>34</sup>

Agentes reductores	436	456	XRD <sup>††</sup>	SEM
Citrato de sodio	29.1	28.6	17.5	17.6±0.6
Peroxido de hidrogeno	25.3	23.1		15.7±1.1
Hidroxilcloruro de hidroxilamina			37.8	22.8±4.2
Acido cítrico	23.5	22.8		12.5±0.6
Monóxido de carbono	9.1	7.4	9.0	5.0±0.5
Fosforo			13.9	8.1±0.5

\*Todas las medidas están en nanómetros.

† Los tamaños de las partículas se determinaron utilizando dispersión de luz con la longitud de onda indicada.

†† Los tamaños de partículas se determinaron basándose en difracción de rayos-X.

Los agentes reductores también influyen notoriamente en la morfología de partículas de oro coloidal. La Figura 5 muestra micrografías electrónicas de AuNPs preparadas con citrato de sodio (Figura 5a) y ácido cítrico (Figura 5b) como agentes reductores, bajo las mismas condiciones de síntesis.

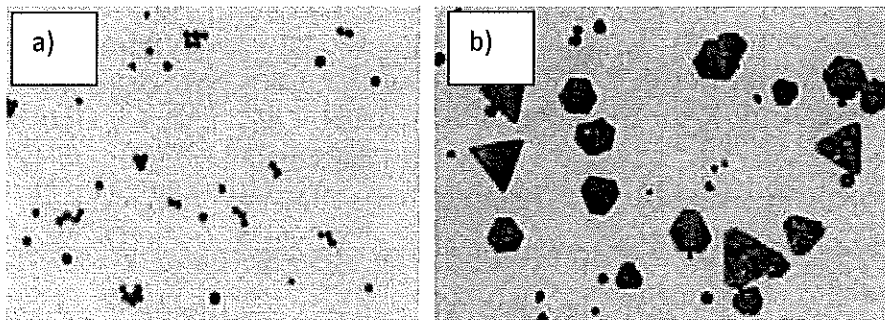


Figura 5. Micrografías SEM de AuNPs preparadas con (a) citrato de sodio, aumento: 80.000 diámetros, 1 mm = 125 Å y (b) ácido cítrico como agentes reductores, aumento: 40.000 diámetros, 1 mm = 250 Å<sup>35</sup>.

Se obtuvieron AuNPs esféricas, utilizando citrato de sodio o peróxido de sodio como agente reductor, mientras que con hidroxilcloruro de hidroxilamina se obtuvieron AuNPs cúbicas de fase {100}, con ácido cítrico se obtuvieron AuNPs triangulares de fase {111}. También la concentración del agente reductor y pH de los agentes influyen notablemente en la morfología de las AuNPs producidas<sup>32</sup>.

### 2.2.3. Propiedades de las AuNPs

Las propiedades de los sólidos en bulto pueden ser descritos, a través de inspeccionar la evolución de estados electrónicos, de átomos a cúmulos a sólidos en bulto. Los metales no son diferentes. La estadística de estados de Fermi-Dirac, dice que dos electrones no pueden ocupar el mismo estado cuántico al mismo tiempo.

Las ramificaciones de estas estadísticas, en la estructura de bandas de la materia, pueden ser ilustradas con un modelo sencillo de división de un estado (Figura 6).

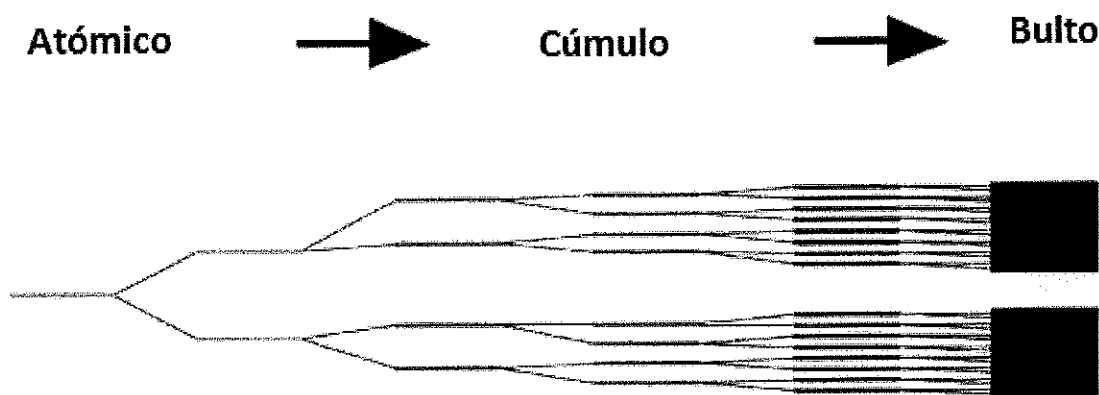


Figura 6. Esquema de división de energía desde el nivel atómico hasta sólido en bulto.

Entre mas y mas átomos sean agregados a cualquier sistema, ese sistema detendrá niveles de energía electrónicos atómicos a niveles más complejos, pero permanecerán las divisiones de los niveles de energía discretos en forma de cúmulo, hasta que la diferencia entre los niveles de energía vecinos sea indistinguible. En este caso, los niveles de energía se consideran como una banda continua de energía y deja de ser discreta. A pesar de que todos los tipos de materia, presentan este comportamiento, la estructura de banda se divide comúnmente en 3 categorías relativistas: aislante, semiconductor y metal. La diferencia entre cada una de estas categorías recae sobre la diferencia de energía relativa, entre el fondo de la banda de conducción y el cima de la banda de valencia.

Para el caso de los metales la energía de Fermi,  $E_f$  (definida como el nivel de energía más alto alcanzado por fermiones a cero absoluto), se traslapa con la banda de conducción; esto permite el movimiento de los electrones energéticos dentro del sólido. Esta propiedad de estados electrónicos para metales, aumenta la propiedad conductiva, la cual influye directamente sobre las propiedades eléctricas.

Las propiedades electrónicas cambian drásticamente, cuando la densidad de estados decrementa y las dimensiones espaciales del movimiento de electrones se confina. Estos cambios en propiedad se traducen en propiedades dinámicas ópticas, debido a las interacciones del material con la luz son principalmente de naturaleza electrónica. Los modos plasmón superficial, son unas de las dinámicas más interesantes de los metales, mientras las dimensiones de los metales se confinan.

La resonancia de los plasmones de superficie, en inglés, *surface plasmon resonance (SPR)* la cual es la propiedad óptica más destacable de las NPs metálicas<sup>33,34</sup>. Consiste en una oscilación colectiva de los electrones en el seno del material cuando son excitados con luz. La SPR es muy sensible a cambios en la superficie del metal, en particular a cambios en la función dieléctrica del medio, por lo que se puede usar para la detección de moléculas adsorbidas en la superficie. Aparecen así algunas de las aplicaciones, como son los chips de análisis de ADN y los dispositivos identificadores de proteínas<sup>35,36</sup>.

La SPR en NPs metálicas produce una banda de absorción en el espectro, debido a la resonancia de las oscilaciones como veremos más adelante. Esta absorción varía desde el infrarrojo hasta el ultravioleta, dependiendo del material, del tamaño de las partículas, del índice de refracción del medio y de las moléculas que recubren a las NPs. La SPR es particularmente intensa en NPs de metales nobles con tamaños entre 5 y 40 nm así como en láminas delgadas con espesores en torno a los 50 nm. Además, para estos metales nobles la frecuencia de resonancia cae en la parte visible del espectro.

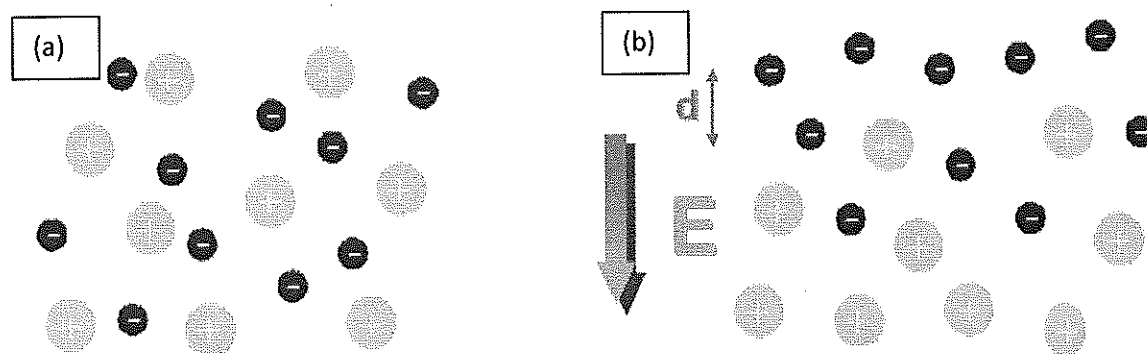
Muchas de las propiedades electrónicas fundamentales del estado sólido pueden ser descritas con éxito haciendo la analogía con un modelo de electrones individuales moviéndose en una red periódica de átomos. Para estudiar las propiedades del estado sólido, se empieza con el concepto del plasma: los electrones libres de un metal tratados como un líquido de electrones con

una alta densidad, del orden de  $10^{23} \text{ cm}^{-3}$ . Desde este punto de vista, las fluctuaciones de la densidad lineal, oscilaciones del plasma, se propagarán a través del volumen del metal. El cuanto de esa oscilación se le llama plasmon de bulto. También existen los plasmones de superficie, para este caso el análisis se debe de tomar en cuenta las condiciones de frontera. Ya que la onda que se propaga a lo largo de la superficie de un metal.

Los plasmones de superficie describen fluctuaciones de la densidad electrónica superficial. Sus campos electromagnéticos decaen exponencialmente con la distancia perpendicular a la superficie y tiene su máximo en dicha superficie, como es característico en las ondas superficiales.

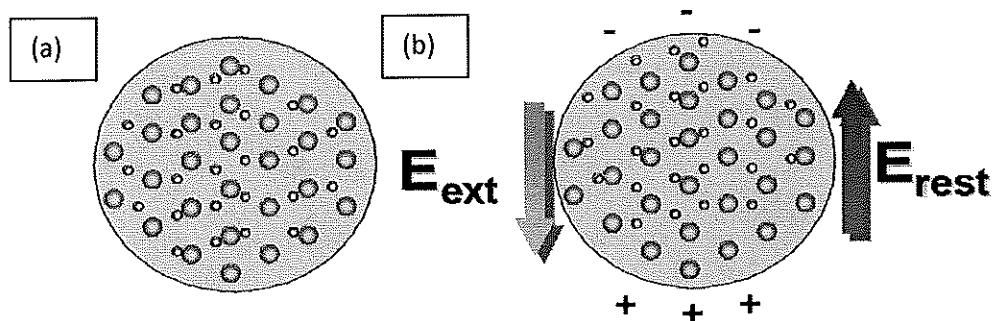
La excitación de los plasmones de superficie por la luz se denota como resonancia de plasmones de superficie (SPR) para superficies planas o estructuras metálicas de tamaño nanométrico. Por tanto, la SPR consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción dentro de las NPs.

Al aplicar un campo electromagnético sobre un material metálico, los electrones no ligados, es decir, los electrones de conducción, se desplazan de su posición de equilibrio una distancia  $d$ . Aparece entonces una fuerza recuperadora, que tiende a restaurar el equilibrio, proporcional a esa distancia, como se muestra en la Figura 7. Este sistema se comporta como un oscilador, aunque dichas oscilaciones quedan ampliamente absorbidas por el material masivo.



**Figura 7. Esquema del desplazamiento de los electrones de conducción de un metal al aplicar un campo electromagnético externo E. El desplazamiento origina una fuerza restauradora, proporcional al desplazamiento.**

Para el caso de NPs, la situación es diferente, ya que se produce una acumulación de carga en la superficie de las mismas. Si aplicamos un campo electromagnético externo (Figura 8) el exceso de carga producido en la superficie de las NPs debido al movimiento de los electrones actúa como fuerza restauradora, mientras el movimiento está amortiguado no sólo por interacciones con los núcleos atómicos si no también con la superficie de la NP. Si se mantiene aplicado el campo electromagnético externo, el sistema se comporta como un oscilador amortiguado, caracterizado por una frecuencia de resonancia  $\omega_p$  que para la mayor parte de los metales de transición cae en la región Ultravioleta-Visible (UV-Vis) del espectro<sup>37</sup>.



**Figura 8. Esquema de una nanopartícula en situación de equilibrio (a) y de no equilibrio (b) al aplicar un campo electromagnético externo  $E_{ext}$ . El campo produce un desplazamiento de las cargas electrónicas, que se acumulan en la superficie de la partícula y producen un campo electromagnético que tiende a restaurar el equilibrio  $E_{rest}$ .**

Cuando el tamaño de la partícula es suficientemente pequeño, el efecto de la superficie se hace más importante y el recorrido libre medio de los electrones se ve modificado por los choques con las paredes de la partícula, lo que aumenta el amortiguamiento de las oscilaciones plasmónicas. Incluso en NPs con tamaños inferiores a 1 nm, la banda de absorción no aparece en los espectros. La teoría de Mie estudia las propiedades de la SPR.

### 2.2.3.1. Teoría Mie

La teoría de Mie fue desarrollada a principios del siglo pasado con el objeto de estudiar y calcular la absorción y dispersión o *scattering* de luz por NPs metálicas en el seno de una matriz dieléctrica<sup>38</sup>.

La teoría se basa en tres hipótesis:

- 1.- La energía de la luz incidente es la misma que la de la dispersada.
- 2.- Principio de linealidad: se supone que la luz absorbida por N partículas, es N veces la dispersada por una de ellas.
- 3.- Las NPs son esféricas y homogéneas.

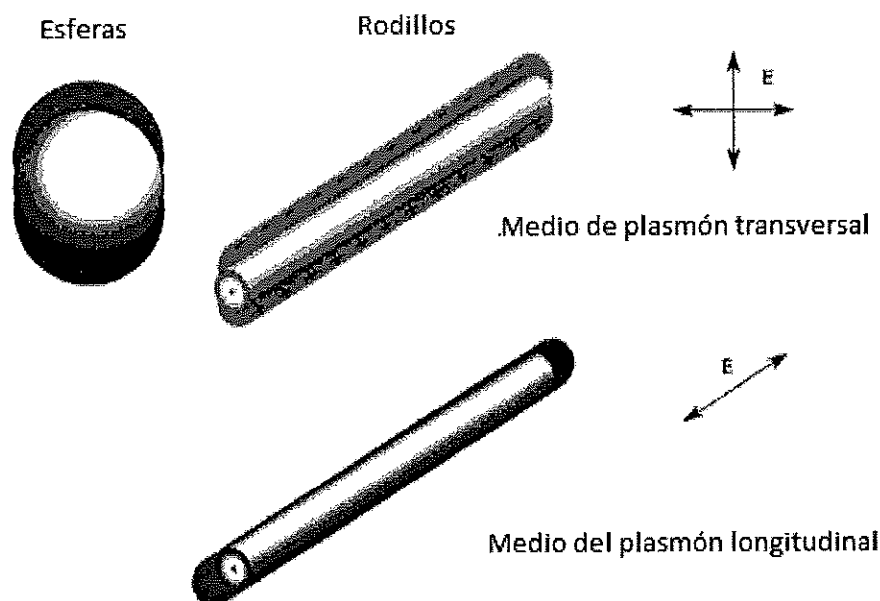
Con estas hipótesis se pueden resolver las ecuaciones de Maxwell y permite expresar la función dieléctrica como  $\epsilon(\omega, R)$ . Sin esta suposición las ecuaciones propuestas por Mie no se pueden resolver analíticamente.

La mayor desviación respecto a esta teoría, ocurre cuando se forman aglomerados de partículas o la forma de estas no es esférica.

En su teoría, Mie supuso la función dieléctrica independiente del tamaño de la partícula y no consideró el movimiento de los electrones dentro de la misma, es decir una dependencia del tipo  $\epsilon(\omega)$ . Esta suposición puede valer para partículas con tamaños superiores a los 400 nm de radio, en los que la constante dieléctrica es la misma que la del material masivo. Sin embargo para NPs pequeñas, con un diámetro inferior a 100 nm (como son las estudiadas en este trabajo), la dependencia de la función dieléctrica con el radio es bastante acusada, esto es una función de tipo  $\epsilon(\omega, R)$ . Es decir, Mie solo tuvo en cuenta el problema de la interacción onda-materia, sin tener en cuenta el movimiento de los electrones dentro de la partícula.

Cuando un campo eléctrico oscilante del rayo de luz se propaga cerca de la AuNP coloidal interaccionara con los electrones libres. Esto causa oscilaciones coordinadas, de la carga de electrón que se encuentra en resonancia con la frecuencia de la luz, plasmón. Por ejemplo: nanorodillos coloidales, despliegan dos modos de plasmón que difieren en energía, debido a la

longitud y anchura de la NP (Figura 9). Una esfera es simétrica por cualquier perspectiva, y puede ser caracterizada por un plasmón, mientras que un rodillo desplegará plasmones longitudinales, tanto como transversales debido al alargamiento en un solo eje (Figura 9). Los plasmones longitudinales se van recorriendo cada vez, a más bajas energías tanto como la proporción de orientación incrementa, mientras que el medio transversal, se encuentra centrado alrededor de los 520 nm longitud de onda de absorción consistentemente. De hecho, este efecto puede ser observado colorimétricamente, porque una solución coloidal bien dispersada de AuNPs, presentará un color rojo-rubí, mientras que una dispersión de nanorods de oro, tomarán un color café tanto que, la absorción del plasmón longitudinal disipa las longitudes de onda del rojo de la luz transmitida. Aparte del corrimiento del plasmón longitudinal característico, presentado por diferentes morfologías de las estructuras, el tamaño de NP producirá un efecto pronunciado en el medio de plasmón transversal.



**Figura 9.** Diferentes interacciones electrónicas que las NPs presentan cuando son traspasadas por fotones de luz.

Por lo tanto caracterizar las AuNPs es muy sencillo, debido al color que presentan ya que éste varía dependiendo del tamaño de la NP. Ésta es una ventaja que presentan las NPs de Au, Ag y Co, entre otras. En la Figura 4 se muestra el cambio de color en 3 diferentes suspensiones coloidales de NPs de distintos tamaños. En la Figura 11 y Tabla 5 se muestran los espectros UV-

visibles obtenidos dependiendo del color del coloide, así como datos obtenidos del diámetro de AuNPs con sus máximos de absorbanca<sup>39</sup>.

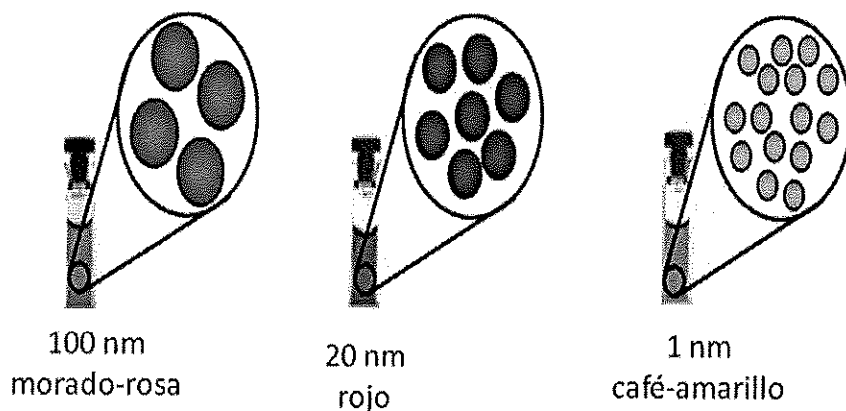


Figura 10. Dispersiones coloidales de nanopartículas metálicas. Obsérvese que el color de la dispersión depende de las características de las nanopartículas<sup>40</sup>.

Tabla 5. Valores de diámetros promedio calculados teóricamente  $d_{teorr}$  valores determinados experimentalmente  $d_{exp}$  y máximos de absorción  $\lambda_{abs}$ <sup>28</sup>

	$d_{teorr}$ (nm)	$d_{exp}$ (nm)	$\lambda_{abs}$ (nm)
Au1	4.5	4.3	512
Au2	11.1	8.8	519
Au3	33.4	28.3	525
Au4	101.5	84.5	563

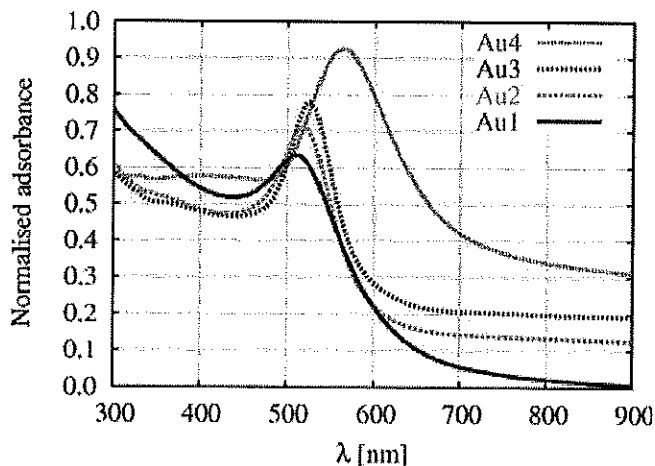


Figura 11. Espectros de soluciones coloidales de AuNPs<sup>28</sup>.

Las AuNPs han sido una opción para muchas investigaciones debido a su facilidad de síntesis, el alto grado de control sobre su forma y tamaño, su estabilidad a largo plazo en una amplia variedad de solventes y condiciones de pH, y su naturaleza de modificación de superficie-molécula (ligando). El ligando que será unido a la superficie de la nanopartícula, tal como un aminoácido, proteína o un ácido nucleico, puede proporcionar un medio a través del cual la

nanopartícula sea direccionada dentro de un cuerpo o hacia una célula. La AuNP con ligando puede fungir como detector, como medio de diagnóstico o para fines terapéuticos<sup>41</sup>.

En el presente trabajo se planea dar los primeros pasos en el desarrollo de nanotransportadores de fármacos.

Revisando la literatura, se encontró que no existe un análisis sistemático de los métodos de preparación de AuNPs que tome en cuenta características como: facilidad, reproducibilidad y bajo costo de síntesis; alta estabilidad y morfología adecuada de AuNPs los cuales son muy importantes para el desarrollo de nanotransportadores de fármacos. Por esta razón, en este estudio se pretende realizar este análisis y seleccionar aquellos métodos (o por lo menos un método) que cumplan con dichas características como parte principal para el trabajo eficaz en área de el desarrollo de nanotransportadores.

Se propone tomar como modelo, la funcionalización con cisteína de las AuNPs preparadas con el método seleccionado.

Para estos métodos de síntesis se pretende determinar las concentraciones de reductor y funcionalizador a las cuales las AuNPs se mantengan estables a largo plazo.

## Hipótesis

Es posible seleccionar un método de síntesis de AuNPs funcionalizadas con cisteína que cumplan con las características de facilidad, reproducibilidad y bajo costo, para desarrollar nanotransportadores de fármacos. Las concentraciones del reductor y del funcionalizador, determinan la estabilidad a largo plazo de las AuNPs.

---

## Referencias Capítulo 2

---

- <sup>1</sup> Las Nanopartículas: Pequeñas Estructuras con Gran Potencial, Claudia E. Gutierrez Wing et al, Contacto Nuclear, 39 (2005), 24-29.
- <sup>2</sup> Self-Assembly and Nanotechnology, Y. S. Lee et al, WILEY (2007) ISBN: 9780470292525, 222-248.
- <sup>3</sup> Shape Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures, Y. Xia et al, MRS Bulletin, 30 (2005) 338-348.
- <sup>4</sup> Facile Controlled Preparation of Gold Nanoparticles with Amphiphilic Thiocalixarene as Reductant and Stabilizer, G. Li et al, Chem. Commun (2009), 3211-3213.
- <sup>5</sup> Inclusional Complexation by Cyclodextrins at the Surface of Silver as Evidenced by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy, Y. Maeda et al, J. Phys. Chem., (1995) 99, 487-488.
- <sup>6</sup> Tuning the Catalytic Activity of Cyclodextrin-Modified Palladium Nanoparticles Through Host-Guest Binding Interactions, J. Liu et al, Langmuir (2001) 17, 6762-6764.
- <sup>7</sup> Synthesis of Thiol Derivatized Gold Nanoparticles in a Two Phase Liquid/Liquid System, M. Brust et al, J. Chem. Soc., Chem. Commun., (1994), 801.
- <sup>8</sup> Nanostructures & Nanomaterials Synthesis, Properties & Applications, Imperial College Press, ISBN 1-86094-480-9.
- <sup>9</sup> Conductive Polymer / Solvent Systems: Solutions or Dispersions, Bernhard Wessling, Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology, Academic press, 5 (1996).
- <sup>10</sup> University of Edinburgh School of Physics: Colloids (Mentions Elixir of Life).
- <sup>11</sup> Nucleation and Growth Process in the Synthesis of Colloidal Gold, Turkevitch J. et al, J. Discuss. Faraday Soc. (1951) 11, 55-75.
- <sup>12</sup> (a) Preparation of Ordered Colloid Monolayers by Electrophoretic Deposition, M. Giersig et al, Langmuir, (1993) 9, 3408-3413. (b) The Fate of Sulfur-Bound Hydrogen on Formation of Self-Assembled Thiol Monolayers on Gold: <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Evidence from Solutions of Gold Clusters, M. Brust et al, J. Am. Chem. Soc., (2003) 125, 1132-1133.
- <sup>13</sup> Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by the Adsorption of Dialkyl Disulfides, T. R. Lee et al, Langmuir, (1998) 14, 7378-7386. (b) Controlled Formation of Smaller Gold Nanoparticles by the Use of Four-Chained Disulfide Stabilizer, T. Yonezawa et al, Langmuir (2001) 17, 271-273. (c) Optimized Photoisomerization on Gold Nanoparticles Capped by Unsymmetrical Azobenzene Disulfides, W. Knoll et al, Chem. Mater. (2003) 15, 20-28. (d) Preparation and Catalytic Effect of Gold Nanoparticles in Water Dissolving Carbon Disulfide, K. Esumi et al, J. Phys. Chem. B. (1999) 103, 2862-2866.

- <sup>14</sup> Linking and Manipulation of Gold Multinanoparticle Structures Using Dithiols and Scanning Force Microscopy, P.M. Echternach et al, *J. Phys. Chem.B.*, (1999) 103, 3647-3650.
- <sup>15</sup> Optimized Surface-Enhanced Raman Scattering on Gold Nanoparticle Arrays, F.R. Aussenegg et al, *Appl. Phys. Lett.*, (2003) 82, 3095-3097.
- <sup>16</sup> Improved Synthesis of Small (dCORE\_1.5 nm) Phosphine-Stabilized Gold Nanoparticles. J. E. Hutchison et al, *J. Am. Chem. Soc.*, (2000) 122, 12890-12891.
- <sup>17</sup> New Type of Monodispersed Gold Nanoparticles Capped by Myristate and PPh<sub>3</sub> Ligands Prepared by Controlled Thermolysis of [Au(C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>-COO)(PPh<sub>3</sub>)], M. Nakamoto et al, *Chem. Lett.* (2003) 32, 452-453.
- <sup>18</sup> Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines, D. V. Leff et al, *Langmuir* (1996) 12, 4723-4730.
- <sup>19</sup> A Formamide, a Water Substitute in Micelles and Microemulsions: Structural Analysis Using a Diels-Alder Reaction as a Chemical Probe, A. Samii et al, *Tetrahedron* (1987) 43, 1725-1735.
- <sup>20</sup> Optical Properties of Self-Assembled 2D and 3D Superlattices of Silver Nanoparticles, M. P. J. Pileni et al, *Phys. Chem. B* (1998) 102, 2214-2220.
- <sup>21</sup> Preparation and Assembly of Colloidal Gold Nanoparticles in CTAB Stabilized Reverse Microemulsion, G. Q. Xu et al, *Mater. Lett.*, (2003) 57, 3282-3286.
- <sup>22</sup> Fabrication of 2D Gold Nanowires by Self-Assembly of Gold Nanoparticles on Water Surfaces in the Presence of Surfactants, T. Bjornholm, *Adv. Mater.*, (2002) 14, 1126-1130.
- <sup>23</sup> (a) Evidence for Seed-Mediated Nucleation in the Chemical Reduction of Gold Salts to Gold Nanoparticles, C. J. Murphy et al, *Chem. Mater.*, (2001) 13, 2313-2322. (b) Size Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles Using Photochemically Prepared Seed Particles, T. Pal et al, *J. Nanopart. Res.* (2001) 3, 257-261. (c) Fabrication of Nanostructures by Hydroxylamine Seeding of Gold Nanoparticle Templates, P. Will et al, *Langmuir* (2001) 17, 1713-1718.
- <sup>24</sup> Solution Behavior of Poly (styrene)-block-poly (2-vinylpyridine) Micelles Containing Gold Nanoparticles, J. Schmidt et al, *Macromolecules* (2000) 33, 4791-4798.
- <sup>25</sup> Synthesis of Gold Nanoparticles Dispersed Within Pores of Mesoporous Silica Induced by Ultrasonic Irradiation and its Characterization, L. D. Zhang et al, *Mater. Res. Bull.*, (2001) 36, 335-342.
- <sup>26</sup> Radiolytic Control of the Size of Colloidal Gold Nanoparticles, D. Meisel et al, *Langmuir* (1998) 14, 7392-7396.
- <sup>27</sup> Thermolysis of Gold (I) Thiolate Complexes Producing Novel Gold Nanoparticles Passivated by Alkyl Groups, M. Nakamoto et al, *Chem. Commun.* (2002) 1622-1623.

- 
- <sup>28</sup> A New Method of Preparing Gold Probes for Multiple-Labelingcyto-Chemistry, H. J. Geuze et al, *Eur J Cell Biol.* 38(1985) 1, 87-93.
- <sup>29</sup> Improved Synthesis of Small (d(CORE) Approximate to 1.5nm) Phosphine-Stabilized Gold Nanoparticles, W. W. Weare et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (2000) 51, 12890-12891.
- <sup>30</sup> Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, M. J. Hostetler et al, *Langmuir*, 14 (1998) 1, 17-30.
- <sup>31</sup> Nucleation in Phase Transitions, V.K La Mer et al, *Ind. Eng. Chem.*, 44 (1952)6, 1270–1277.
- <sup>32</sup> Morphology of Colloidal Gold - A Comparative Study, W.O Miligan et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 17, 3461-3467
- <sup>33</sup> Optical Properties of Metal Clusters, U. Kreibig et al, Springer-Verlag, Berlin (1995).
- <sup>34</sup> Width of Cluster Plasmon Resonances: Bulk Dielectric Functions and Chemical Interface Damping, H. Höve et al, *Phys. Rev. B*, 48 (1993), 18178.
- <sup>35</sup> Metal Nanoparticles as Labels for Heterogeneous, Chip-Based DNA Detection, W. Fritzsche et al. *Nanotechnology* , 14 (2003), R63.
- <sup>36</sup> Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, M. C. Daniel et al, *Chem. Rev.*, 104 (2004) 293.
- <sup>37</sup> Ultraviolet–Visible Absorption Spectra Of the Colloidal Metallic Elements, J. A. Creighton et al, *Chem. Soc. Faraday Trans.*, 87 (1991) 3881.
- <sup>38</sup> Light scattering by small particles, H. C. Hulst, Willey, New York (1957).
- <sup>39</sup> Preparation and Characterization of Isometric Gold Nanoparticles with Pre-Calculated Size, M. Šlouf et al, *Z. Kristallogr. Suppl.*, 23 (2006), 319-324.
- <sup>40</sup> Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents: Synthesis, Formation, Assembly and Application, M. Niederberger, Springer, ISBN: 97818788226700.
- <sup>41</sup> Bioapplications of Nanoparticles, Warren C. W. Chan, (2008), 34.

# Método Experimental



### ***Capítulo 3 Método Experimental***

En este capítulo se realizó el estudio de métodos de síntesis de AuNPs reportadas en literatura en busca del método más amigable para realizar estudios biológicos. Se sintetizaron AuNPs coloidales mediante tres diferentes métodos, partiendo de un precursor de oro y utilizando diferentes reductores en cada uno de los métodos. Se hizo una evaluación de los tres métodos de síntesis. Se eligió el método más eficiente para producir AuNPs. Se funcionalizaron las AuNPs. Se caracterizaron las muestras mediante las técnicas de espectrofotometría UV-Visible, microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*), espectrometría de energía dispersada (EDS, *Energy Dispersive Spectrometry*), microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) y potencial zeta.

### 3.1 Selección de Métodos de Síntesis de AuNPs

La discriminación de métodos de síntesis de AuNPs se llevo a cabo de la siguiente manera: Los criterios más importantes para la selección de métodos de síntesis de NPs reportados se basaron en la forma y tamaño de la NP al sintetizar. En la Tabla 6 se representan siete parámetros fundamentales para dicha síntesis.

Tabla 6. Parámetros a considerar durante la selección de método de síntesis

Parámetros
Morfología esférica
Tamaño
Alta estabilidad
Reproducibilidad
Facilidad de síntesis
Baja toxicidad
Bajo Costo

Entre los parámetros citados se eligieron las siguientes características: morfología esférica; diámetro de NP de ~20 nm; alta estabilidad y reproducibilidad, método de síntesis sencillo, baja toxicidad y bajo costo.

A continuación se justifica cada una de las características elegidas para cada parámetro. Es importante que la morfología sea esférica, debido a que posee una mayor área de reconocimiento de la célula y presenta menor impedimento estérico. La importancia del diámetro de la NP radica en su relación directa con el área total que se va a funcionalizar. Hasta el momento no se ha reportado un tamaño estándar de NP, por lo cual, en este trabajo estudian NPs con diámetro de 20 nm.

La alta estabilidad y reproducibilidad son de especial interés en la farmacéutica, ya que garantizan que el producto tenga un periodo de vida prolongado, lo que facilita su distribución y manejo comercial, y que su producción se repita fácilmente. La toxicidad es relevante en términos

de que se planea utilizar las AuNPs en sistemas vivos, por lo tanto, deben de ser biocompatibles. Por último, es deseable que el método de preparación de las NPs sea sencillo y económico, siempre y cuando satisfaga los parámetros anteriormente mencionados. La Tabla 7 muestra una comparación entre los métodos de síntesis de dispersiones coloidales de Au publicados.

**Tabla 7. Tabla comparativa de métodos de síntesis obtenidos de la literatura**

	Tamaño AuNPs	Morfología	Reactivos	$C_{pre}/C_{red}$	Desventajas	Bibliografía
1	~ 5 a 30nm	Esferas	$NaC_6H_7O_6$ (alginato de sodio)	$C_{pre}= 5mM$ $C_{red}=1mM$	1. NPs pequeñas, 2. Distribución de tamaño muy grande	1
2	NPs de ~3 a 5nm	Esferas	$Na_3C_3H_5O(COO)_3$ $C_{16}TAC$ (cloruro de cetiltrimetilamonio) SDS (dodecil-sulfato de sodio) Tritón X-100 NaOH	$C_{pre}= 0.23mM$ $C_{red}=4.5mM$	1. Partículas pequeñas 2. Morfología no definida	2
3	a) ~170 +/-17nm b) 12nm	Esferas	hidroquinona morfolina paraformaldehído 1,4 dioxano	$C_{pre}= 2.27 \times 10^{-5}M$ $C_{red}=10mM$	1. Síntesis de reactivos 2. Tamaño de NP grande.	3
4	~20-100nm	Nanorods	$Na_3C_3H_5O(COO)_3$ $NaBH_4$ HCl (A. clorohídrico) $HNO_3$ (Ácido nítrico) $H_2SO_4$ (Ácido sulfúrico)	$C_{pre}= 1\%$ $C_{red}=38.8mM$	1. Complicado de reproducir 2. Utiliza muchos reactivos, 3. Nanorods	4
5	~1-30nm	Esferas	$KAu(CN)_2$ (dicianoaurato de potasio) $N,N,N$ -tridecil(3-aza-3deciltridecano) $NH_4I$ (yoduro de amonio) $NaBH_4$	$C_{pre}= 12mM$ $C_{red}=2.4mM$	1. Requiere de 11 horas para la síntesis 2. Distribución de tamaño muy grande.	5
6	200-500nm	Triángulos	$Na_3C_3H_5O(COO)_3$	$C_{pre}= 1\%$ $C_{red}=38.8mM$	1. NPs triangulares 2. 16 horas de síntesis.	6
7	20-50nm	Esferas	PEG (polietilenglicol) acetona	$C_{pre}= 0.244mM$ $C_{red}=56.4mM$	1. Síntesis no controlable porque depende de la luz solar.	7
8	A) NPs ~100-200nm B) NPs ~40-90nm	Esferas	$(NH_2OH)_2 \cdot H_2SO_4$ (á. sulfúrico de hidroxilamina) gelatina NaOH HCl (A. clorohídrico)	$C_{pre}= 3mM$ $C_{red}=10mM$	Fácil	8
9	~20nm	Esferas	$Na_3C_3H_5O(COO)_3$ (citrato de sodio)	$C_{pre}= 5mM$ $C_{red}=1\%$	Fácil	9
10	~3.5nm	Esferas	Citrato de sodio $NaBH_4$	$C_{pre}= 0.25mM$ $C_{red}=0.25mM$	Fácil	10

*\*Todos los métodos parten del precursor de oro ácido cloroáurico ( $HAuCl_4$ ) a excepción del método número 5 que parte de dicianoaurato de potasio.*

Los métodos enlistados a continuación fueron rechazados por las razones que se detallan: A) Método 1: utiliza un bipolímero biocompatible como reductor y estabilizador y, por lo tanto, puede ser utilizado en aplicaciones biológicas; sin embargo, la fuente de irradiación, el material de la cámara de reacción y la temperatura producen un intervalo de tamaños de nanopartículas muy amplio. B) Método 2: requiere de un medio de Tritón X-100 que no es biocompatible y la morfología de las nanopartículas no está definida. C) Método 3: la síntesis del reductor complica la producción de las nanopartículas. D) Método 4: necesita de muchos reactivos y el producto obtenido tiende a tener morfología de rodillos. E) Método 5: la síntesis se lleva a cabo en un lapso de 11 horas y no se obtienen partículas en un intervalo definido de tamaños. F) Método 6: a pesar de que el método es sumamente simple y económico, el producto principal son partículas en forma de triángulos, lo cual para nuestra meta no es un método útil. G) Método 7: ha sido discriminado debido a que es un método poco reproducible, ya que una vez que se han preparado las semillas por medio de una lámpara de UV, éstas son crecidas con luz natural, por lo tanto, el método presenta una amplia gama de factores que pueden afectar la síntesis.

Los métodos 8, 9 y 10 fueron seleccionados por ser los que correspondieron con los parámetros deseados para este estudio y reportaron bajo costo y síntesis sencilla.

## 3.2 Preparación de las AuNPs

A continuación se describen los métodos de síntesis de AuNPs, la descripción de los reactivos véase Tabla 8 al final del presente capítulo. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada de 18 MΩ. Todo el material fue lavado con una mezcla de peróxido de hidrogeno y acido sulfúrico al 10%.

### 3.2.1 Síntesis de AuNPs por el método de citrato

Se prepararon dos soluciones: a) ácido cloroaúrico  $\text{HAuCl}_4$  con 5 mg de Au (10.1 mg de en 100 mL) en agua desionizada; y b) citrato de sodio al 1% en agua desionizada (1 g de citrato de sodio en 100 mL de agua). La solución de  $\text{HAuCl}_4$ , se calentó hasta alcanzar la ebullición. Inmediatamente después de iniciada la ebullición se agitó la solución vigorosamente con un agitador magnético. Se agregaron 1.3 mL de la solución de citrato de sodio al 1%, a gota seguida,

constante y moderada con agitación magnética rigurosa. Se mantuvo en agitación y con temperatura constante hasta que la mezcla dejó de cambiar de color y presentó un color rojo vino. Una vez que se obtuvo dicho color, se retiró la mezcla del calor y se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación durante 15 minutos<sup>9</sup> (Figura 12).

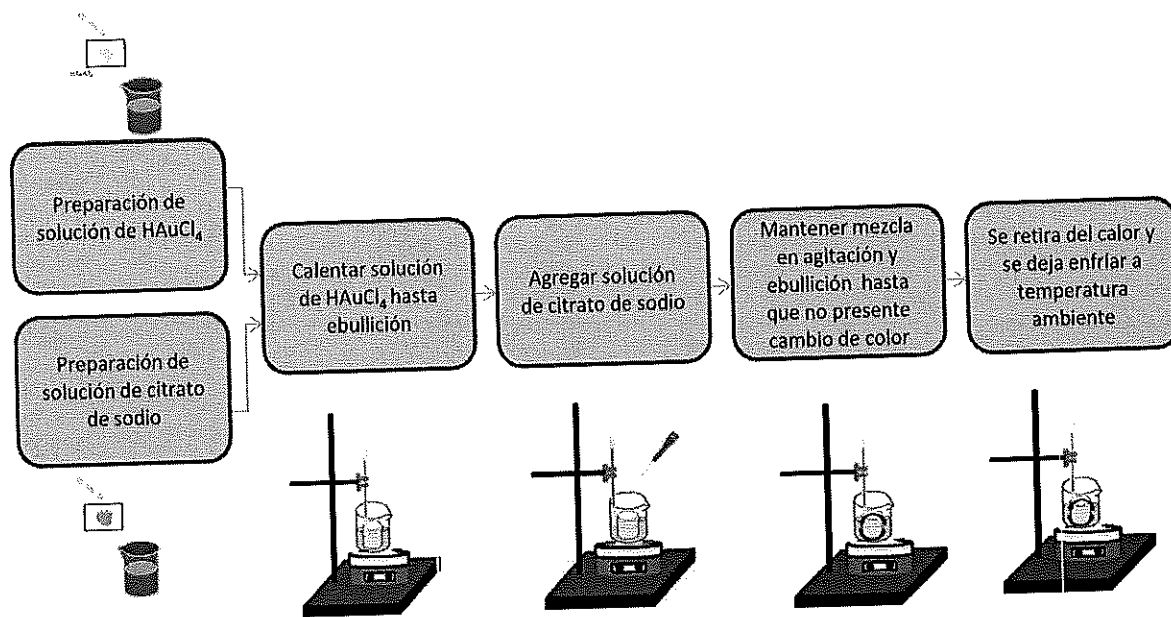
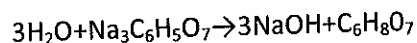


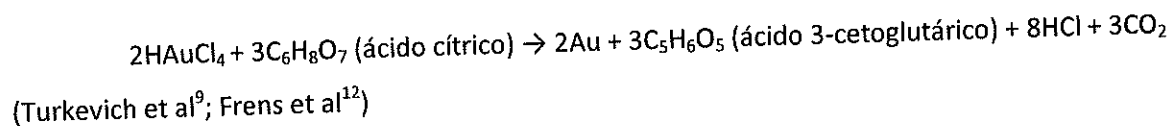
Figura 12. Diagrama de preparación de AuNPs por método de citrato de sodio.

Las soluciones fueron preparadas en vasos de precipitado de 100 mL, se utilizó las pipetas con pipeteador para agregar la solución de citrato de sodio. Se utilizó la balanza *BP 2215* de precisión  $\pm 0.0001$  de compañía *Sartorius* para pesar los reactivos utilizados para preparación de AuNPs. Los reactivos (véase Tabla 8) fueron depositados en papel encerado para pesar, utilizando una espátula de acero inoxidable. El termómetro de mercurio con rango de  $-20$  a  $150^{\circ}\text{C}$  se utilizó para control de la temperatura durante síntesis. El termo-plato con agitación magnética de marca *CIMAREC, HP130915*, y los Agitadores magnéticos de teflón se utilizaron para calentar la solución de HAuCl<sub>4</sub> y agitar la solución durante la síntesis.

Cuando se agrega agua al citrato de sodio se lleva a cabo la reacción de hidrólisis de la sal. El citrato de sodio se convierte en ácido cítrico y la reacción sucede de la siguiente manera<sup>11</sup>:



La reducción de  $\text{HAuCl}_4$  por citrato de sodio se lleva a cabo por medio de la siguiente reacción:



### 3.2.2 Síntesis de AuNPs por el método de borohidruro

Se prepararon tres soluciones: a)  $\text{HAuCl}_4$  al  $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$  en agua desionizada; b) citrato de sodio al  $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$  en agua desionizada; c)  $\text{NaBH}_4$  al  $0.1 \text{M}$  la cual se dejó enfriar a  $-5^\circ\text{C}$  por 15 minutos. En un vaso de precipitados se agregaron 20 mL de solución de  $\text{HAuCl}_4$  y 20 mL de citrato de sodio, utilizando agitación ligera durante 1 minuto. Después se aumentó el vigor de la agitación magnética y se agregaron 0.6 mL  $\text{NaBH}_4$  gota a gota a la mezcla. Se dejó agitando aproximadamente 15 minutos, hasta que la solución se tornó de color rojo-anaranjado<sup>13</sup> (Figura 13).

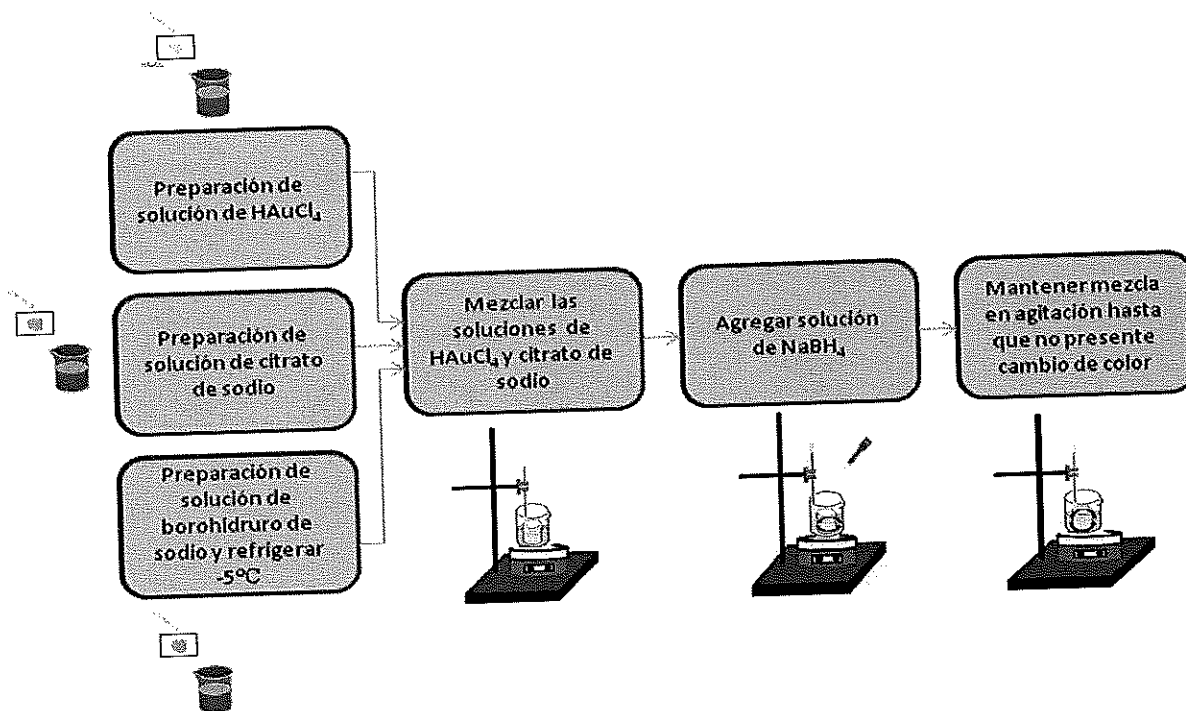
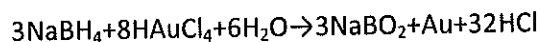


Figura 13. Diagrama para la preparación de AuNPs por el método de borohidruro de sodio.

La reacción propuesta es la siguiente:



### 3.2.3 Síntesis de AuNPs por el método de hidroxilamina

Se prepararon dos soluciones: a)  $\text{HAuCl}_4$  al 3 mM en un medio de 2% gelatina; b) sulfato de hidroxilamina  $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 mM en 2% de gelatina. En un vaso de precipitados se vertieron 100 mL de cada una de las soluciones preparadas anteriormente y se ajustó el pH a 9 (utilizando HCl y NaOH) inmediatamente con agitación magnética constante. Posteriormente se ajustó y mantuvo la solución a  $20^\circ\text{C}$  y pH 9 y con agitación rigurosa por 2 horas. Se obtuvo una solución color azul marino que se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Para preparar la muestra para TEM y SEM, ésta fue filtrada al vacío por aproximadamente 6 horas. El producto obtenido fue una oblea en la que las AuNPs quedaron adheridas al papel filtro<sup>14</sup> (Figura 14).

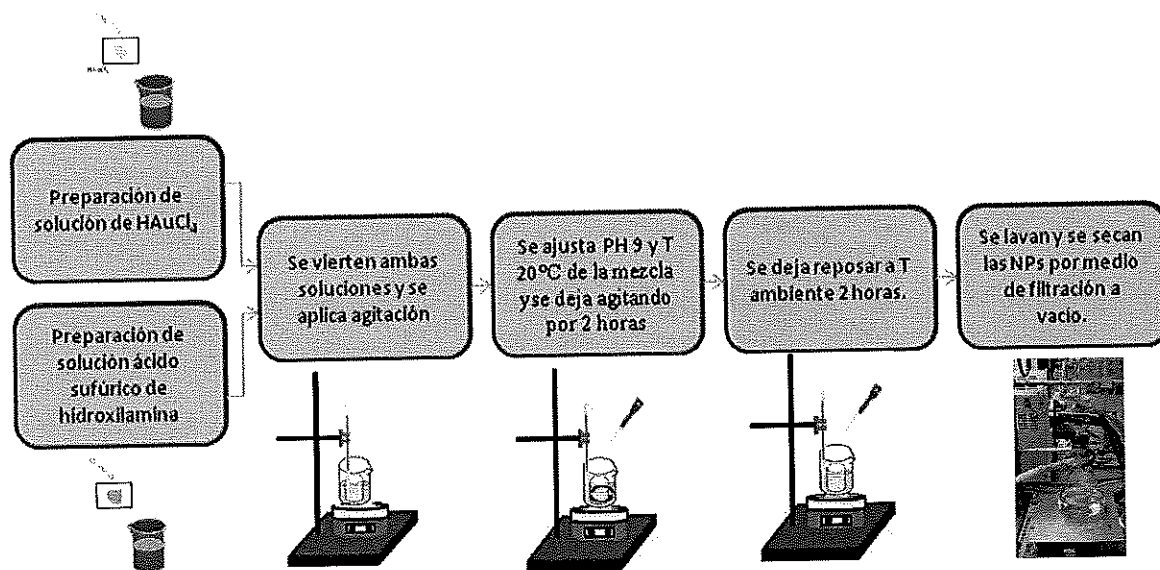
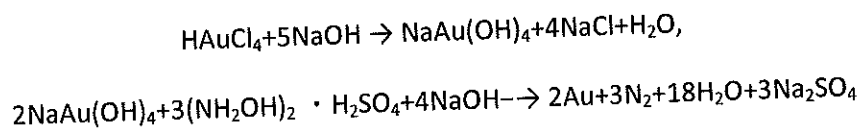


Figura 14. Diagrama para la preparación de AuNPs por el método de hidroxilamina.

Para realizar el filtrado de la solución coloidal se utilizó un matraz Kitazato boca esmerilada (200 mL) y tapón de plástico junto con un embudo Büchner esmerilado con placa filtrante y filtro micropore 0.02 $\mu$ m, de *PALL Corporation* con membrana de Nailon, con manguera de plástico conectada a una bomba de vacío. El control de pH se llevo a cabo con el pH metro digital VWR *Symphony*.

La reacción propuesta es la siguiente:



La efectividad como reductor del sulfato de hidroxilamina se incrementa conforme el valor de pH de la reacción se incrementa; al principio de la reacción se ajusta a 9 utilizando NaOH. La temperatura de la reacción es el factor clave para la producción de AuNPs<sup>11</sup>.

### 3.3 Elección del método de citratos

En este trabajo se eligieron tres métodos de síntesis de AuNPs a partir de diez métodos analizados bibliográficamente. Estos métodos debían cumplir con características óptimas de simplicidad, economía y propiedades de las AuNPs. El único método que cumplió con todas las características fue el método de síntesis por citrato. Una vez elegido el método se optimizaron sus parámetros de síntesis de tal manera que obtuviéramos las AuNPs deseadas.

#### 3.3.1 Optimización de la síntesis de AuNPs por el método de citratos

La optimización del método de síntesis de reducción por citrato de sodio se llevó a cabo variando la concentración del agente reductor citrato de sodio. Para preparar soluciones coloidales se hizo una solución de ácido cloroaúrico  $\text{HAuCl}_4$  de 0.5 mM en agua desionizada, y un grupo de soluciones de citrato de sodio a concentraciones crecientes de 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2.5 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 40 mM y 50 mM en agua desionizada. Primero, 20 mL de la solución

de  $\text{HAuCl}_4$  se calentaron hasta alcanzar la ebullición. Inmediatamente después de iniciada la ebullición se agitó la solución vigorosamente con un agitador magnético. Segundo, se agregó 20 mL de la solución de citrato de sodio a gota seguida, constante y moderada con agitación magnética rigurosa. Se mantuvo en agitación y con temperatura constante hasta que la mezcla dejó de cambiar de color y presentó un color rojo vino. Una vez que se obtuvo dicho color, se retiró del calor y se dejó enfriar a temperatura ambiente con agitación por 5 minutos. Este procedimiento se repitió para cada una de las concentraciones de citrato de sodio. En la Figura 12 se muestra un diagrama de la síntesis. De este grupo de muestras se eligió la muestra con concentraciones de precursor/reductor de  $C_{\text{Au}}=0.5\text{mM}/C_{\text{cit}}=5\text{mM}=1:10$  que presentó mayor estabilidad en el tiempo, menor distribución de tamaños y morfología esférica. Se procedió a la siguiente etapa de experimentos que es la funcionalización.

### 3.4 Funcionalización de AuNPs con cisteína

Para la funcionalización se prepararon varias soluciones a concentraciones creciente de cisteína de 10, 20, 30, 50, 80, 100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ . Primero se realizó la síntesis de las AuNPs siguiendo el procedimiento descrito en la optimización de la síntesis de AuNPs. Una vez que las AuNPs fueron sintetizadas, se dejaron enfriar con agitación hasta que la temperatura disminuyó a 80 °C. Manteniendo la agitación, se agregó la solución de cisteína. La Figura 15 muestra los pasos para la funcionalización.



Figura 15. Esquema de funcionalización de AuNPs con cisteína.

### 3.5 Técnicas de caracterización

Para el estudio de las AuNPs y verificar que estas cumplan con los parámetros deseados mencionados al principio de este capítulo (véase Tabla 6) se utilizaron las siguientes técnicas de caracterización:

#### 3.5.1 Espectroscopia UV-Visible

Por medio de espectroscopia UV-Vis se estudió el estado electrónico del oro (cationes de Au(3+) pico  $\sim 250$  nm, nanopartículas  $\sim 500$  nm, cúmulos con diámetro de menos de 1 nm 300-400 nm<sup>15</sup>). Para la caracterización óptica de las muestras se utilizó el espectrómetro de UV-vis, *Cary 300 SCAN de Varian*<sup>16</sup>. La muestra líquida se colocó dentro de una cubeta de cuarzo óptico de 10 mm de espesor y 3.5 mL de volumen. N. de parte 6610001100

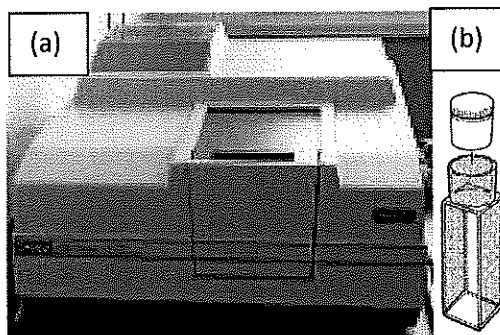


Figura 16. (a) Equipo UV-visible Cary 300 Scan y (b) cubeta de cuarzo óptico<sup>7</sup>.

(Figura 16). Se determinó el espectro de absorbancia de cada una de las muestras para corroborar la producción de AuNPs, y estudiar la cinética de almacenaje de las muestras preparadas.

Para medir concentración de nanopartículas de oro en solución se necesita obtener la curva de calibración (función de altura o área superficial del perfil del pico de concentración de nanopartículas en solución coloidal). En caso del presente trabajo no es posible conseguir soluciones de calibración comerciales porque cada curva de calibración cambia con respecto al tamaño, forma, etc. de las nanopartículas. En nuestro trabajo el método de espectroscopia de UV-Visible se aplicó como un método semi-cuantitativo de caracterización de concentración y propiedades (tamaño, morfología, interacción, etc.) de AuNPs.

Las medidas de absorbancia (o transmitancia) se llevan a cabo por medio del espectrofotómetro UV-Vis y son complementarias a las de luminiscencia. En este tipo de medidas se hace pasar un haz de luz a través de una muestra y posteriormente se analiza que parte de ella ha sido absorbida. Normalmente los espectrofotómetros funcionan con un sistema de doble haz:

uno de ellos incide sobre la muestra mientras que el segundo llega a un detector sin atravesar ningún cuerpo (Figura 17). Posteriormente se comparan las intensidades de ambos haces con lo que se puede calcular la cantidad de luz absorbida o reflejada por la muestra. Con este sistema se evitan posibles errores debidos a la inestabilidad de la lámpara o a su respuesta espectral. Lógicamente, las medidas de absorbancia no pueden realizarse sobre muestras opacas.

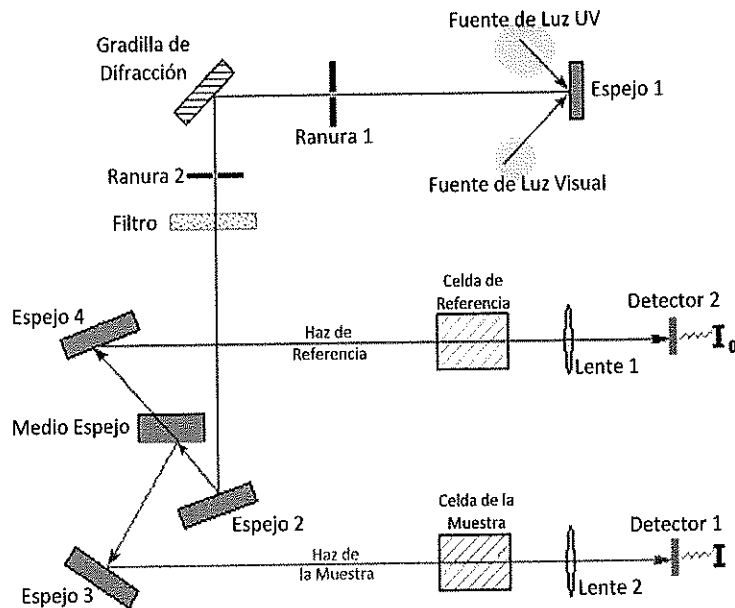


Figura 17. Diagrama de un espectrofotómetro UV-Visible típico.

La absorción ( $A$ ) de un material se define como el cociente entre la intensidad de la luz que incide sobre el mismo  $I_0$  y la luz que absorbe  $I_{abs}$ . La absorción está relacionada con el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ) según la ecuación:

$$A = \frac{I_{abs}}{I_0} = 1 - e^{-\alpha \cdot d}$$

donde  $d$  es el espesor de la muestra. De la anterior ecuación se deduce que el perfil del espectro de absorción de una muestra dependerá de su espesor. Por ello, para caracterizar un material se utiliza habitualmente el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ), cuyo perfil no depende del espesor. De esta forma se pueden comparar curvas de absorción correspondientes a muestras con distinto espesor<sup>17</sup>.

### 3.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectrofotometría de energía dispersa (EDS)

El equipo de SEM con sonda para EDS se utilizó para realizar la investigación de morfología y análisis elemental de las muestras. Estos estudios fueron realizados con el equipo *JEOL Scanning Microscope JSM-5300* con sonda para EDS *Thermo Noran 4473-B* (Figura 18)<sup>18</sup>. Se obtuvo morfología de las muestras, así como el análisis químico de la muestra.

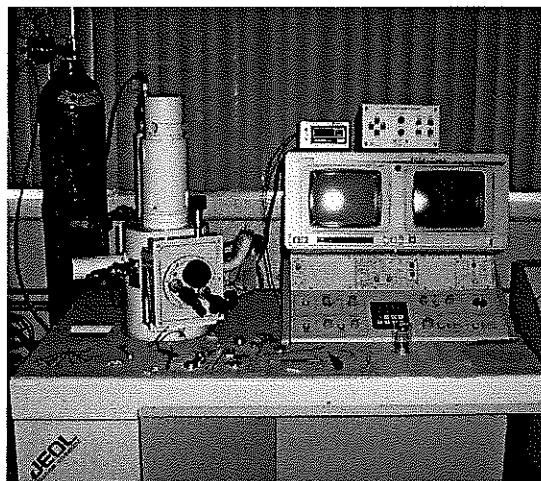


Figura 18. SEM JSM-5300

La preparación de muestras para SEM y EDS se llevo a cabo de la manera siguiente:

1. Se tomó un portamuestras de vidrio, se limpió con agua desionizada y con acetona, se dejó secar.
2. Sobre el portamuestras se adhirió un trozo pequeño  $\sim 1 \text{ cm}^2$  de cinta de grafito.
3. Se colocó una gota de la muestra de oro coloidal sobre la cinta de grafito y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
4. El portamuestras de vidrio se colocó sobre el portamuestras del SEM.

El SEM está diseñado para el estudio de las superficies de objetos sólidos. Por medio de un barrido con un haz de electrones el cual ha sido generado y enfocado por la operación del microscopio<sup>19</sup>. La resolución es del orden de 1 nm, en términos de amplificación se puede decir que amplifica hasta 200,000 veces. Permite una mayor profundidad de campo que el microscopio óptico. Por esta razón el SEM puede producir imágenes que son una buena representación de la topografía tridimensional de la muestra. Cuando un haz de electrones incide en la muestra, se producen muchas interacciones entre los electrones del mismo haz y los electrones de la muestra (rayos x, electrones Auger etc. Figura 19); cuando los electrones del haz incidente pierden energía (dispersión inelástica) provoca que otros electrones salgan despedidos de los átomos de la muestra

y se producen electrones. Estos se mueven tan lentamente y se encuentran cargados negativamente, pueden ser atraídos al detector polarizado con una diferencia de potencial positivo. De este modo, se pueden coleccionar electrones de un área amplia y alrededor de esquinas y bordes. Esta capacidad de los electrones secundarios es lo que permite la obtención de imágenes con aspectos tridimensionales<sup>20</sup> de la muestra. El SEM que se utilizó en este trabajo se encuentra equipado con un detector de rayos X, se puede aprovechar que los rayos X tienen la "firma" del elemento que los produjo y así realizar un análisis químico en el área de resolución del instrumento<sup>21</sup>.

### Interacciones Electrón/Muestra

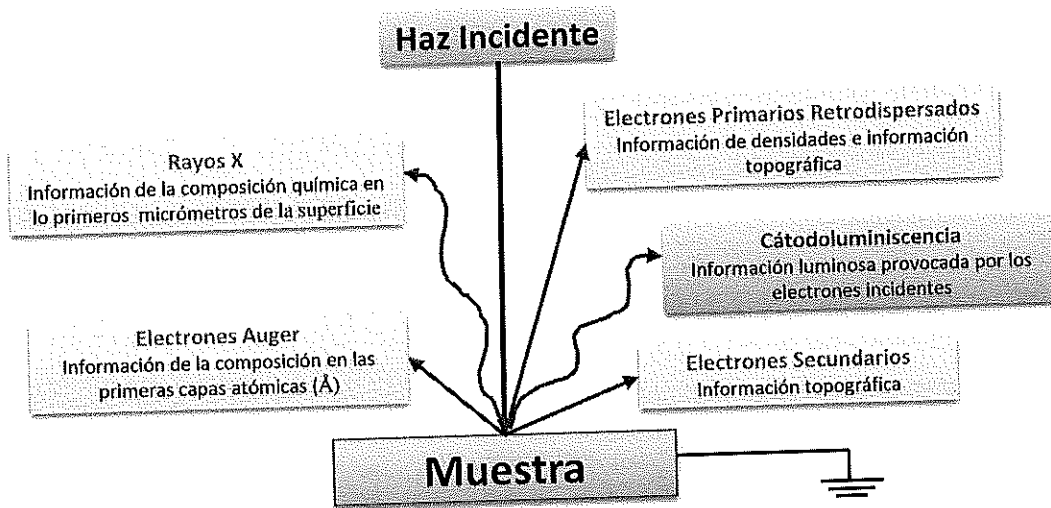


Figura 19. Esquema de tipos de electrones emitidos.

### 3.5.3 Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

El análisis de morfología, tamaño de las nanopartículas e interacción fueron realizadas con el microscopio electrónico de transmisión *JEOL JEM-2010*. Se utilizó una rejilla de cobre de malla 400 recubierta con carbón (LACEY) de *SPI supplies* (Figura 20)<sup>24</sup> para soportar la muestra.

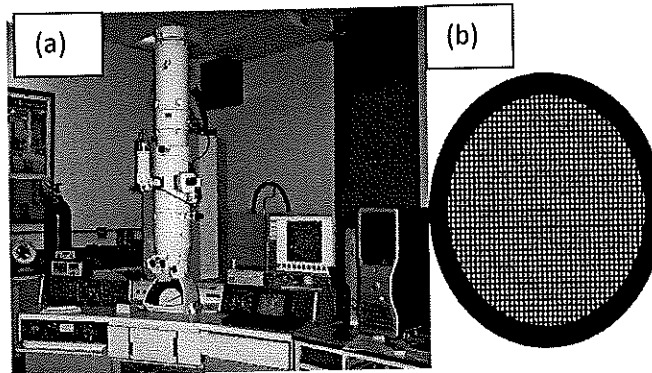


Figura 20. (a) TEM JEM-2010<sup>22</sup> y (b) rejilla de cobre para colocar la muestra<sup>22</sup>.

Para analizar las muestras por TEM se colocó una gota de la solución de la muestra sobre la rejilla, la cual posteriormente se dejó secar en aire.

El TEM permite la observación directa, sobre una superficie fosforescente de la imagen formada por los electrones que atraviesan una fina capa del material objeto de estudio (muestra). Posee una fuente emisora de electrones y una serie de lentes electromagnéticas encargadas de focalizar el haz sobre la muestra<sup>25</sup>. Una vez que el haz ha atravesado el material, pasa por una serie de lentes magnéticas encargadas de ampliar y enfocar la imagen de la muestra sobre una pantalla fosforescente, sensible a los electrones. También dispone de una lente objetivo de apertura variable y otra de difracción (Figura 21). La apertura del objetivo aumenta el contraste de la imagen en la pantalla, al detener los electrones que atraviesan la muestra. La apertura de difracción está situada en un plano focal intermedio de la columna del microscopio y permite seleccionar el área de la muestra sobre la cual se pretende realizar la difracción. Todo el sistema se encuentra en vacío ( $5 \times 10^{-6}$  torr) para evitar la dispersión de los electrones. Es una de las técnicas más poderosas para estudiar cristalografía, defectos, y en general la estructura de prácticamente cualquier material con resolución atómica. En este trabajo se ha utilizado como técnica de caracterización para conocer y estudiar la distribución de tamaños y la morfología de las AuNPs.

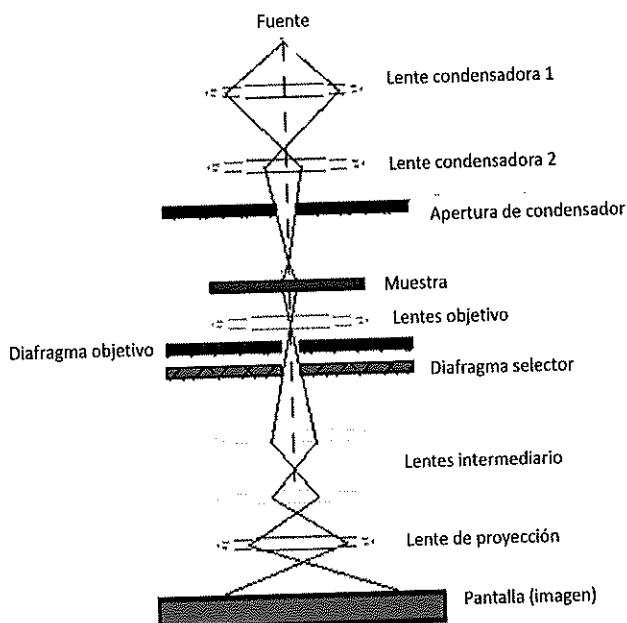


Figura 21. Esquemático de la trayectoria del haz de electrones para TEM.

### 3.5.4 Potencial zeta

Para registrar los cambios de carga de las nanopartículas coloidales antes y después de funcionalizar las NPs se utilizó el equipo de potencial zeta de *Malvern Instruments–Zetasizer, NANO-ZS*. Se utilizaron celdas capilares desechables DTS 1060 (Figura 22)<sup>26</sup> para colocar la muestra.

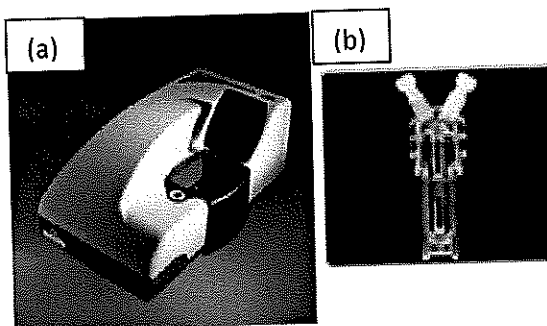


Figura 22. (a) Equipo de medición de potencial zeta, (b) celda utilizada<sup>24</sup>

El potencial zeta es una propiedad física que exhibe cualquier partícula en suspensión. La capa de líquido que rodea la partícula consiste de dos partes: una región interna (capa de Stern), donde los iones están fuertemente ligados y una externa (capa difusa) región en la que están asociados con menos fuerza. Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los

iones y partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), son los iones dentro de los límites que la mueven, mientras que los iones más allá del límite permanecen en el dispersante. El potencial en esta frontera (superficie de corte hidrodinámico) es el potencial zeta (Figura 23). La magnitud del potencial zeta da una indicación del potencial de estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta positivo o negativo grande entonces tenderán a repelerse entre sí y no habrá tendencia a que las partículas se unan. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial zeta bajos entonces no habrá fuerza alguna para evitar que las partículas se unan y floculen<sup>26</sup>.

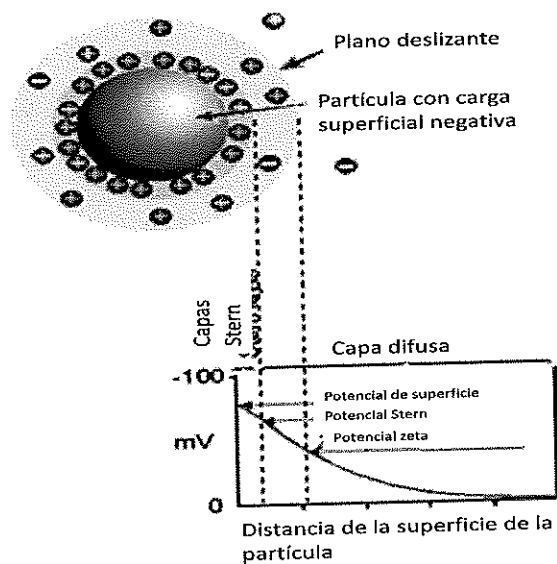


Figura 23. Representación esquemática del potencial zeta.

El sistema de medición de potencial zeta utilizado en este trabajo consiste de seis componentes principales (Figura 24). En primer lugar, se utiliza un láser (1) como fuente de luz para iluminar las partículas dentro de la muestra. Para tomar mediciones de potencial zeta, el haz de luz se divide en un haz incidente y uno de referencia. El haz incidente pasa por el centro de la celda de la muestra, (2) y la luz es dispersada con un ángulo de  $13^\circ$  (3). Cuando se aplica un campo eléctrico a la celda, cualquier partícula que se mueva a través del volumen que se está midiendo causará fluctuaciones en la intensidad de luz detectada con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula. Esta información se analiza en un procesador digital de señales (4) y después pasa a una computadora (5). El espectro de frecuencias así producido, se analiza con el programa de *Zetasizer nano* por medio del cual se calculan la movilidad electroforética y el

potencial zeta alcanzado. . La intensidad de la luz dispersada detectada deberá de encontrarse dentro del rango específico para que el detector lo pueda medir. Esto se logra utilizando un atenuador (6), el cual ajusta la intensidad de la luz. Se utiliza un compensador (7) para corregir cualquier diferencia en el grosor de la pared de la celda y efectos de refracción del dispersante<sup>27</sup>.

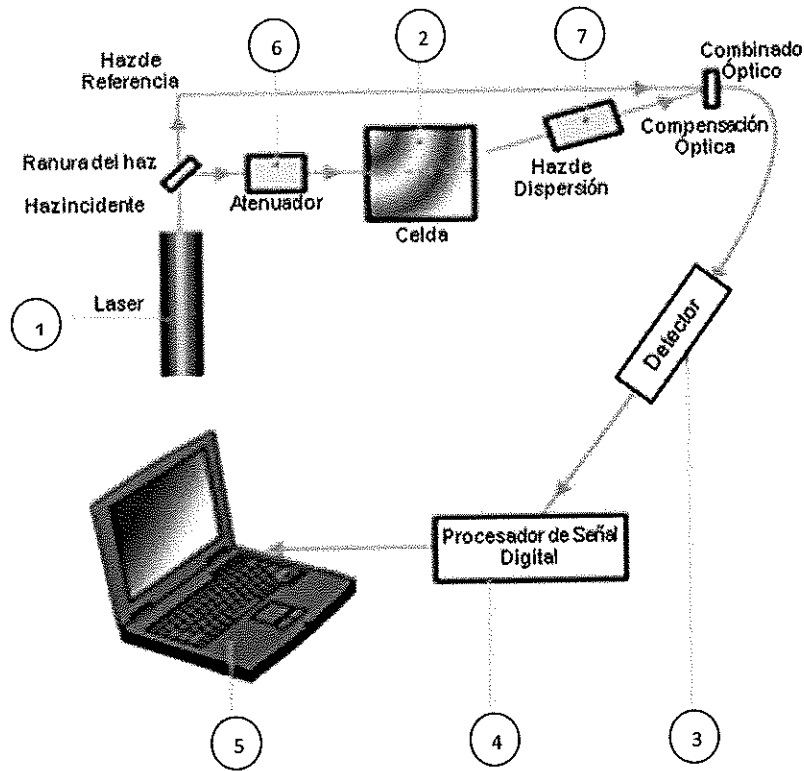


Figura 24. Configuración óptica del equipo de potencial zeta.

Tabla 8. Reactivos utilizados para la síntesis y funcionalización de las AuNPs

Reactivo	Compañía	Especificaciones
1 Ácido cloroáurico $\text{H AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Alfa Aesar	ACS 99.99% (metal basis), Au 49.92%, Stock # 36400, Lot # E13N15, CAS#16961-25-4
2 Citrato de Sodio $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Jalmek	P.M. 294.10 Lote 4-3103-12S22
3 Ácido sulfúrico de hidroxilamina $(\text{H}_2\text{NOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	Sigma-Aldrich	99.99% (metal basis) CAS 10039-54-0 FW 164.14 mp 170°C
4 Grenetina	Fagalab	Lote No. 1008G-20
5 Ácido clorhídrico HCl	Spectrum chemical MFG. Corp	Lote No. 511951 CAS 7647-01-0, f.w 3646
6 Hidróxido de Sodio NaOH	LabChem Inc	Lote No. 7240-21, Cat No. LC23900-1
7 L-Cisteína $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2\text{S} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	C121800 P.M. 175.64 CAS-7048-04-6
8 Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ )	Sigma-Aldrich	CAS-16940-66-2, F.W. 37.83

\*Todos los materiales en grado reactivo.

### Referencias del Capítulo 3

---

- <sup>1</sup> Preparation of Nanosized Gold Particles in Biopolimer Using UV Photoactivation, Anjali Pal et al, *Journal of Colloid and Interface Science*, 288 (2005) 396-401.
- <sup>2</sup> Reversible Generation of Gold Nanoparticles Aggregates with Changeable Interparticle Interaction by UV Photoactivation, A. Pal et al, *Langmuir*, (2004), 575-578.
- <sup>3</sup> A New Organic Compound for the Synthesis of Gold Nanoparticles, P. Roy et al, *Polyhedron* 27, (2008), 3085-3090.
- <sup>4</sup> Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solution 2. Improved Control of Particle Size and Shape, K. R. Brown et al, *Chem. Mater.*, (2000) 12, 306-313.
- <sup>5</sup> Colloidal Gold Prepared by Interphase Reduction, S.A. Vorobyova et al, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 176 (2001), 273-277.
- <sup>6</sup> Facile Synthesis of Gold Nanoplates by Citrate Reduction of AuCl<sub>4</sub> at Room Temperature, L. Huang et al, *Chinese Chemical Letters*, 17 (2006) 10, 1405-1408.
- <sup>7</sup> Photochemical Synthesis of Gold Nanoparticles by the Sunlight Radiation Using a Seeding Approach, S. Dong et al, *Gold Bulletin*, 37 (2004), 3-4.
- <sup>8</sup> Synthesis and Characterization of Hollow Spheres and Nanospheres of Au, M. Yang et al, *Appl. Phys. A*, (2008) 92,367-370.
- <sup>9</sup> Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold, J. Turkevich et al, *Discuss Faraday Soc.*, 11 (1951) 55.
- <sup>10</sup> Controlled Synthesis of Icosahedral Gold Nanoparticles and their Surface-Enhanced Raman Scattering Property, K. Kwon et al, *J. Phys. Chem. C*, 111 (2007), 1161-1165.
- <sup>11</sup> Gold Nanoparticles Synthesis and Characterization, H. Ayhan et al, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 37 (2009)3, 217-226.
- <sup>12</sup> Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodispersed Gold Suspensions, G. Frens et al, *Nature (London), Phys. Sci.* (1973) 241, 20-22.
- <sup>13</sup> Controlled Synthesis of Icosahedral Gold Nanoparticles and their Surface-Enhanced Raman Scattering Property, K. Kwon et al, *J. Phys. Chem. C*, 111 (2007), 1161-1165.
- <sup>14</sup> Synthesis and Characterization of Hollow Spheres and Nanospheres of Au, M. Yang et al, *Appl. Phys. A* (2008) 92,367-370.
- <sup>15</sup> Tesis de Doctorado, Formation of Gold Nanoparticles in Zeolite Matrices, Inga Tuzovskaya, Universidad de Moscú, Moscú, Rusia, 18 de febrero de 2005.
- <sup>16</sup> <http://www.varianinc.com>

<sup>17</sup> Surface Plasmons, H. Raether, Springer-Verlag, Berlin (1988).

<sup>18</sup> <http://www.mse.iastate.edu/microscopy/home.html>

<sup>19</sup> <http://www.mos.org/sln/SEM/tour08.html>

<sup>20</sup> <http://www.mse.iastate.edu/microscopy/home.html>

<sup>21</sup> El Microscopio electrónico de barrido como herramienta en la investigación. M. Avalos, I. Gradilla, ConCiencia, 16-20

<sup>24</sup> [www-em.materials.ox.ac.uk](http://www-em.materials.ox.ac.uk)

<sup>25</sup> Microscopía Electrónica, R. González et al, Eudema, Universidad, Madrid (1991).

<sup>26</sup> <http://www.malvern.com/zetasizernano>

<sup>27</sup> Zetasizer Nano series technical note MRK654-01, [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk)

# Resultados y Discusión



## *Capítulo 4*

### **4.0 Resultados y Discusión**

En este trabajo se eligieron tres métodos de síntesis de AuNPs a partir de diez métodos analizados bibliográficamente. Estos métodos debían cumplir con características óptimas de simplicidad, economía y propiedades de las AuNPs. Los métodos de síntesis se reprodujeron en el laboratorio y se eligió el más económico, reproducible y sencillo que produjera AuNPs esféricas, de diámetro aproximado de 20 nm. A continuación se optimizó el método, variando la concentración del agente reductor. Por último, se funcionalizaron las AuNPs con distintas concentraciones de cisteína. A continuación se describe cada uno de estos pasos.

#### 4.1 Elección de Métodos de Síntesis de AuNPs

Los métodos 8, 9 y 10 los cuales fueron elegidos para ser reproducidos en el laboratorio utilizan citrato de sodio, borohidruro de sodio y sulfato de bis (hidroxiamonio) como reductores, respectivamente, y parten del ácido cloroáurico como precursor. A continuación (Figura 25) se muestra la relación y diferencias que existen entre los tres métodos seleccionados.

Nos referiremos a los métodos según su agente reductor: el método 8 o método de citratos, el método 9 o método de borohidruro se encuentran en medio acuoso y están estabilizados por citrato de sodio, el método 10 o método de hidroxilamina se encuentra en medio de gelatina y está estabilizado por esta misma.

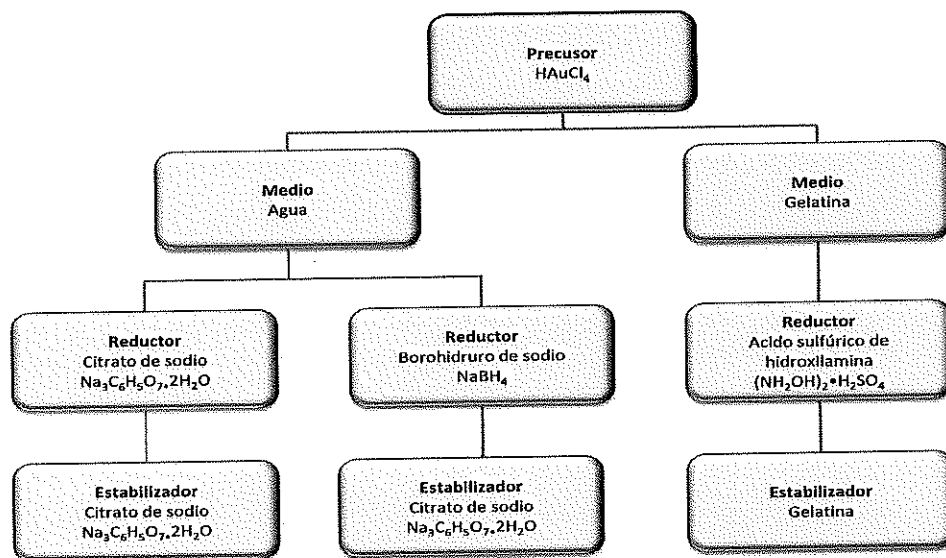


Figura 25. Diferencias principales entre los tres métodos de síntesis elegidos.

En la Figura 26 se muestra la estructura de las moléculas utilizadas como reductores y estabilizadores.

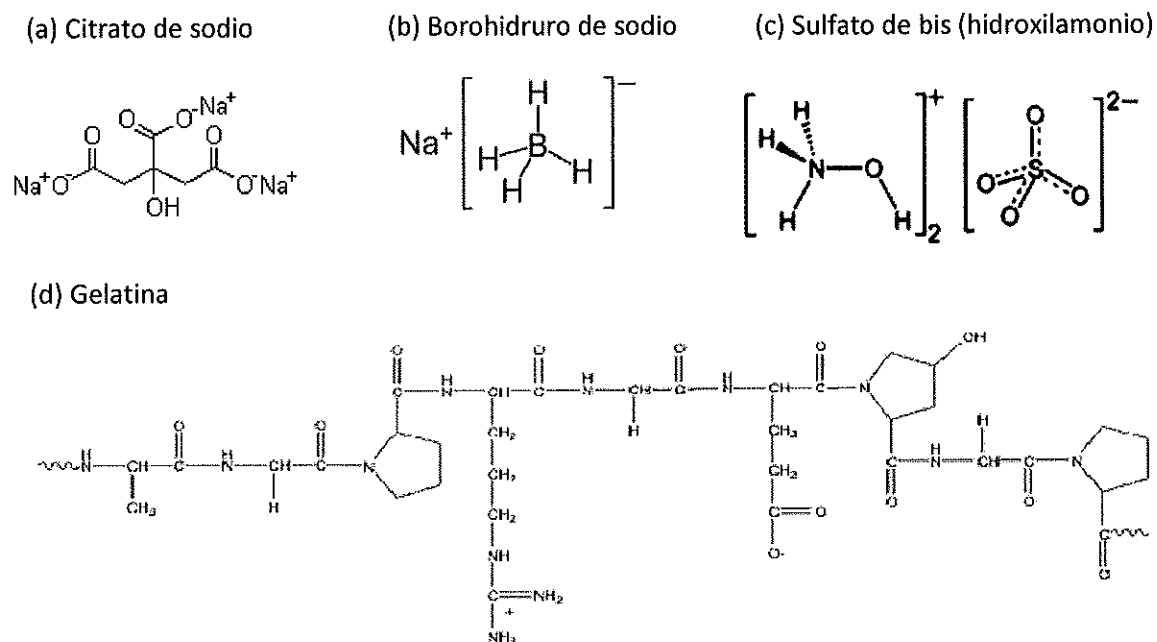


Figura 26. Moléculas reductoras y estabilizadoras de la suspensión coloidal: (a) citrato de sodio; (b) borohidruro de sodio; (c) sulfato de bis (hidroxilamina); (d) gelatina.

## 4.2. Caracterización de AuNPs

En el laboratorio se reprodujeron los tres métodos seleccionados y se realizó su debida caracterización y análisis de los resultados.

### 4.2.1 Muestras obtenidas por el método de citratos

#### 4.2.1.a Caracterización química y morfológica por EDS y SEM

A través de EDS (Figura 27) se realizó el análisis elemental en el cual se identificó la presencia de oxígeno, zinc, carbono, oro, cloro. La presencia de todos estos elementos era esperada ya que las muestras no estaban lavadas. La aparente presencia de zinc se cree es debido a una contaminación de la espátula utilizada al preparar la solución de  $\text{HAuCl}_4$ .

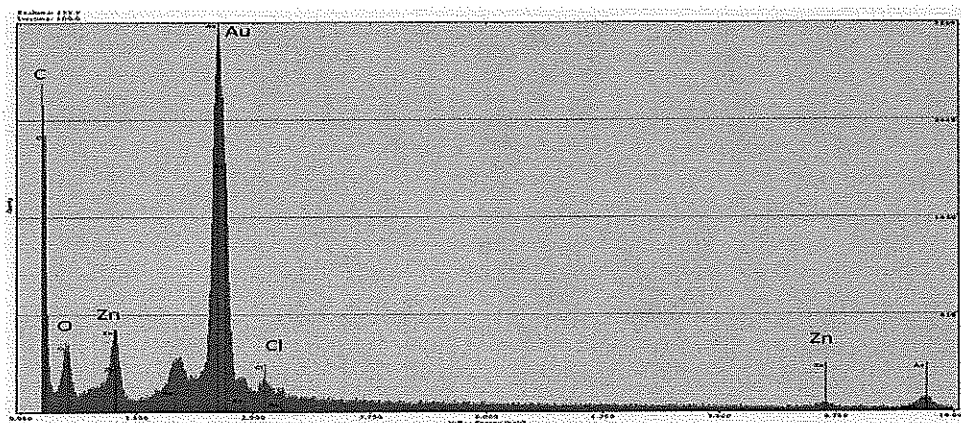


Figura 27. Estudio EDS de partícula típica de la muestra.

La contaminación de Zn no se estudió a mayor profundidad debido a que esta no afecta la producción de AuNPs.

Mediante la técnica SEM se puede observar la muestra secada en aire. Se observa la tendencia a formar agregados a través del portamuestras (Figura 28a). A una ampliificación mayor (Figura 28b) se observan patrones de aproximadamente  $0.33\mu\text{m}$  que se repiten.

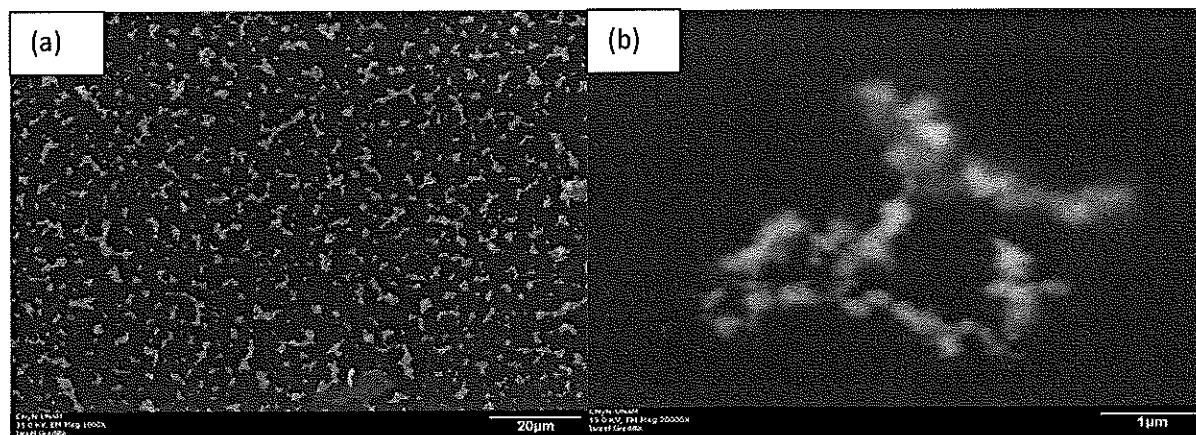


Figura 28. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de citrato de sodio, con (a) menor y (b) mayor ampliificación, imagen del patrón que se observa en toda la muestra.

#### 4.2.1.b Caracterización óptica por UV-Visible

Las propiedades ópticas de las AuNPs son dominadas por el plasmón superficial. Para AuNPs en el rango de 5-20 nm, el plasmón superficial aparece alrededor de los 530 nm<sup>1</sup>. En nuestro caso obtuvimos un máximo de absorbancia en los 527 nm, su ancho de pico fue de 77 nm (Figura 29).

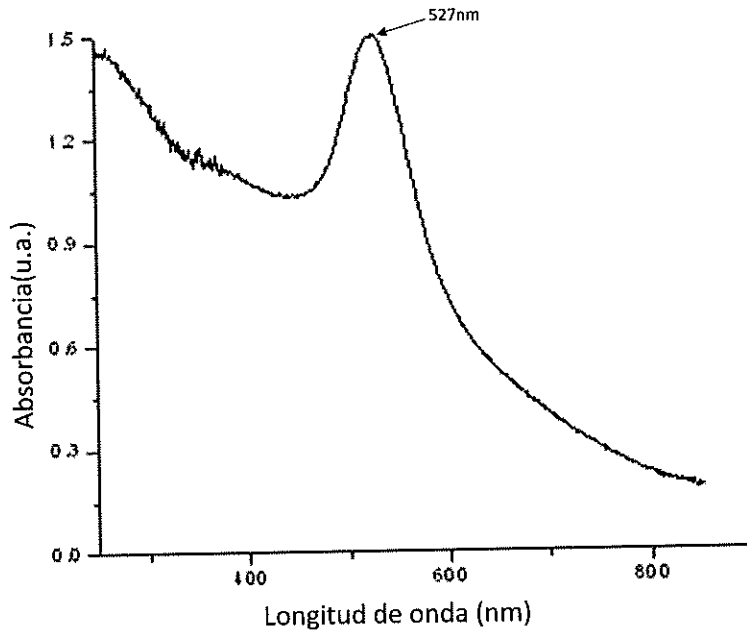


Figura 29. Espectro UV-VIS de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada.

Para realizar la medición del ancho de pico se utilizó el programa *origin*: se sustrajo una línea recta (el fondo) del espectro, como se muestra en la Figura 30 (a) para ajustar el pico al origen, esta recta se definió suponiendo que la pendiente observada en el área del espectro menor a los 400 nm no corresponde a un pico intensivo de otro estado del oro, este estimado se realizó en base a un trabajo realizado previamente por nuestro grupo<sup>2</sup> donde se utilizaron muestras patrones comerciales de AuNPs que mostraron un aumento gradual de línea base en dirección de longitudes de ondas menores<sup>2</sup>; por lo tanto, la sustracción de la recta se tomó considerando de mínimo a mínimo del pico. Después se midió el máximo del pico que para este caso fue 0.762 nm, y a la mitad de esta altura se midió el ancho del pico (Figura 30b) que dio un total de 77 nm. Se realizó el

mismo ajuste para determinar intensidad, posición y ancho de pico de todos los espectros mostrados durante este trabajo.

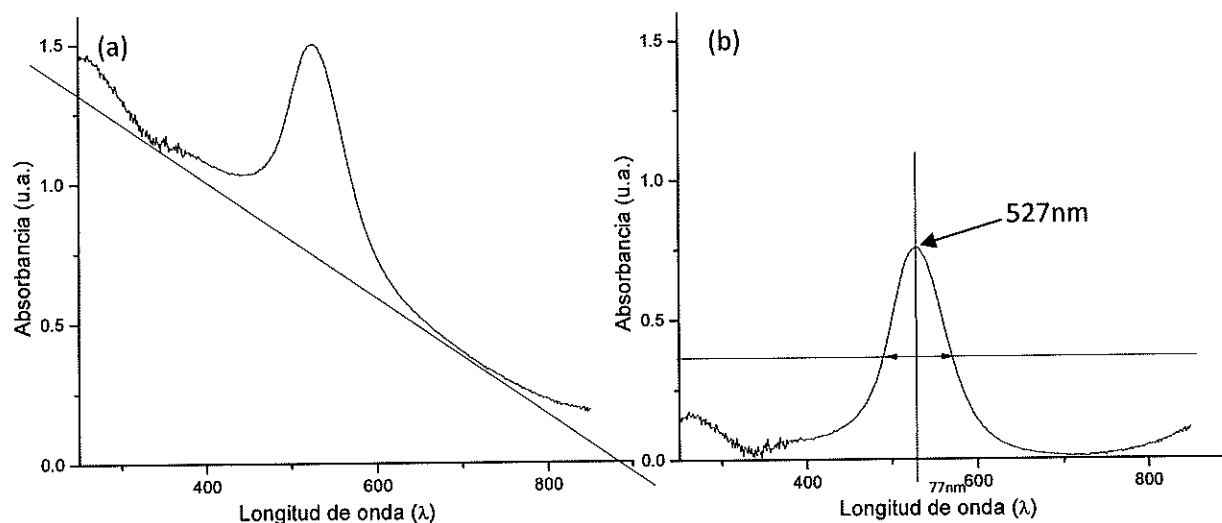


Figura 30. Espectro UV-VIS que muestra la medición del ancho de pico: (a) ajuste del ancho de pico al origen y (b) medición del ancho de pico.

#### 4.2.1.c Caracterización de morfología y tamaño por TEM

Para corroborar la información obtenida por UV-Visible se realizó una serie de micrografías por TEM (Figura 31) en las cuales se observó alta tendencia de las nanopartículas a la morfología esférica, presentando algunas partículas menos comunes con geometría de triángulos y presencia de algunos hexágonos. El tamaño observado es de  $\sim 20$  nm y se advierte la presencia de partículas de menor diámetro. Se cree que son semillas de partículas que no crecieron. Tomando en cuenta su bajo contraste se puede suponer que son parte orgánica de la solución (por ejemplo, citrato de sodio).

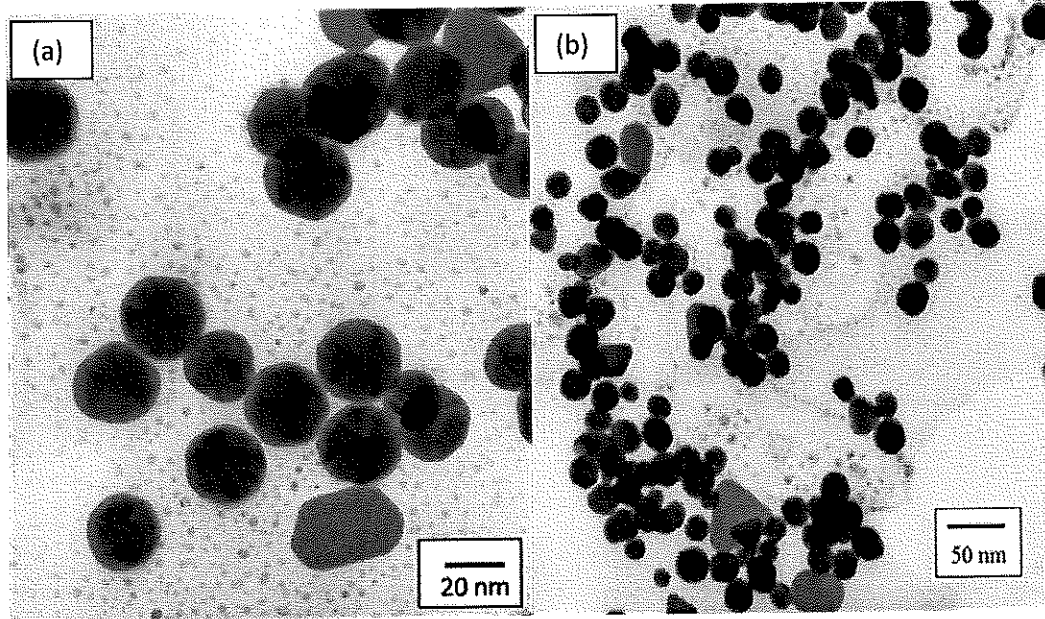


Figura 31. Micrografías TEM de nanopartículas de oro preparadas con el método de citratos con diferentes ampliificaciones.

## 4.2.2 Muestras obtenidas por el método de borohidruro de sodio

### 4.2.2.a Caracterización química y morfológica por EDS y SEM

A través de EDS (Figura 32) se realizó el análisis elemental en el cual se identificó la presencia de oxígeno, zinc, sodio, carbono, oro, cloro, calcio. La presencia de todos estos elementos era esperada ya que las muestras no estaban lavadas. La aparente presencia de zinc y calcio se cree que fue debida a una contaminación. Este método se repitió varias veces y siempre aparecieron contaminaciones, lo que nos indica que este método tiende a presentar contaminaciones. Estas contaminaciones no alteran el producto obtenido.

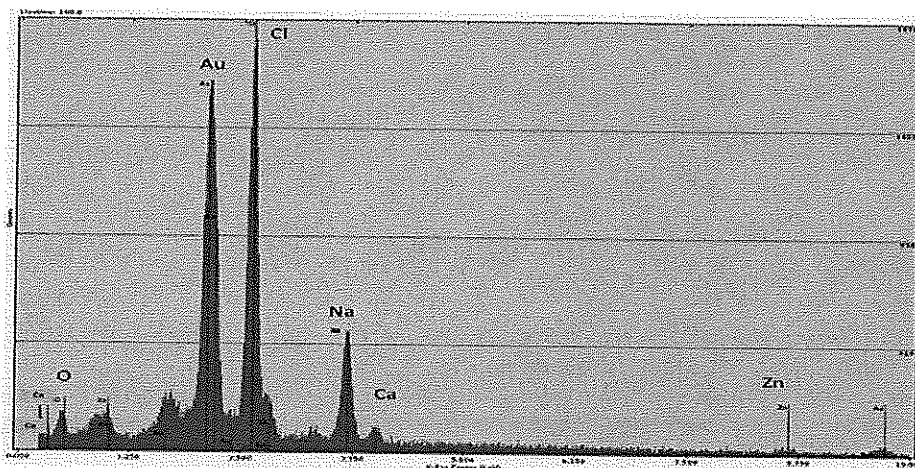


Figura 32. Estudio EDS de partícula típica mostrada en SEM.

Mediante SEM se puede observar la muestra secada en aire. Se observa la tendencia a formar agregados a través del portamuestras (Figura 33a). A una ampliificación mayor (Figura 33b) se observan patrones aglomerados.

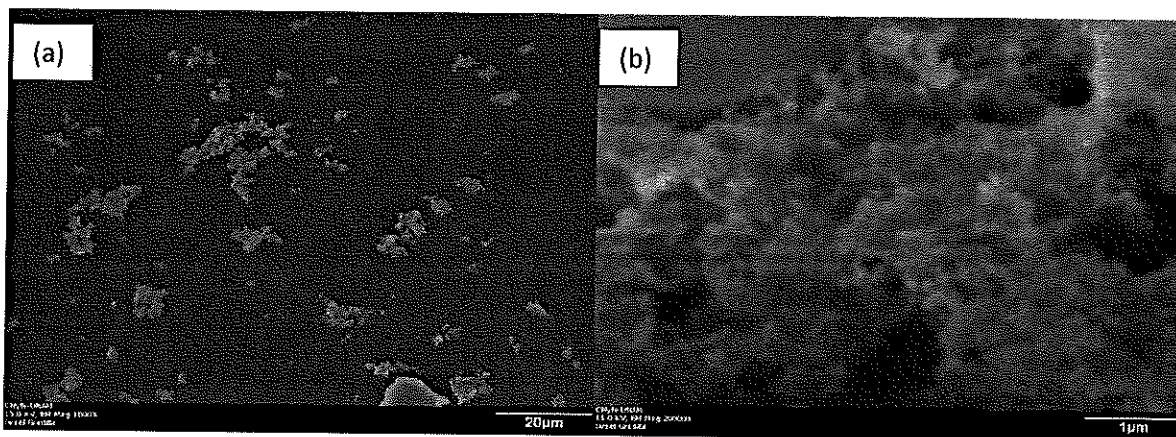


Figura 33. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de borohidruro de sodio con (a) menor y (b) mayor ampliificación.

#### 4.2.2.b Caracterización óptica por UV-Visible

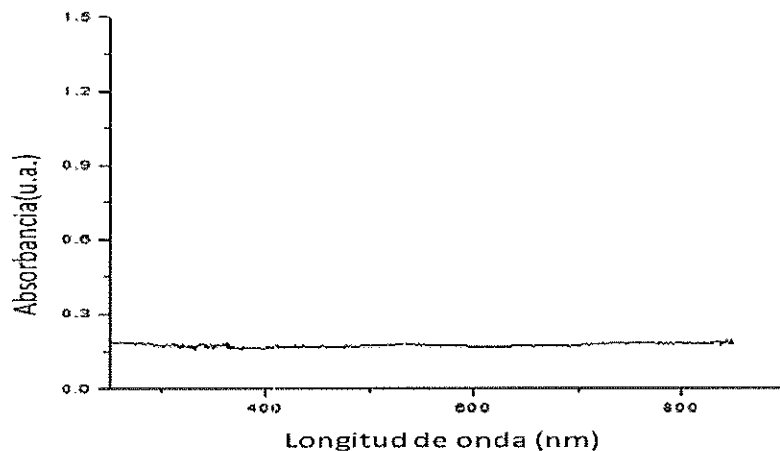


Figura 34. Espectro UV-VIS de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada.

Estas nanopartículas fueron preparadas de acuerdo a la literatura<sup>10</sup>, donde se reportó una estabilidad de semanas. En el presente estudio, al sintetizarlas y repetir la síntesis en 3 ocasiones encontramos que la estabilidad fue de solamente un par de horas. En la Figura 34 se observa el espectro que muestra la inestabilidad de la muestra.

#### 4.3.2.c Caracterización de morfología y tamaño por TEM

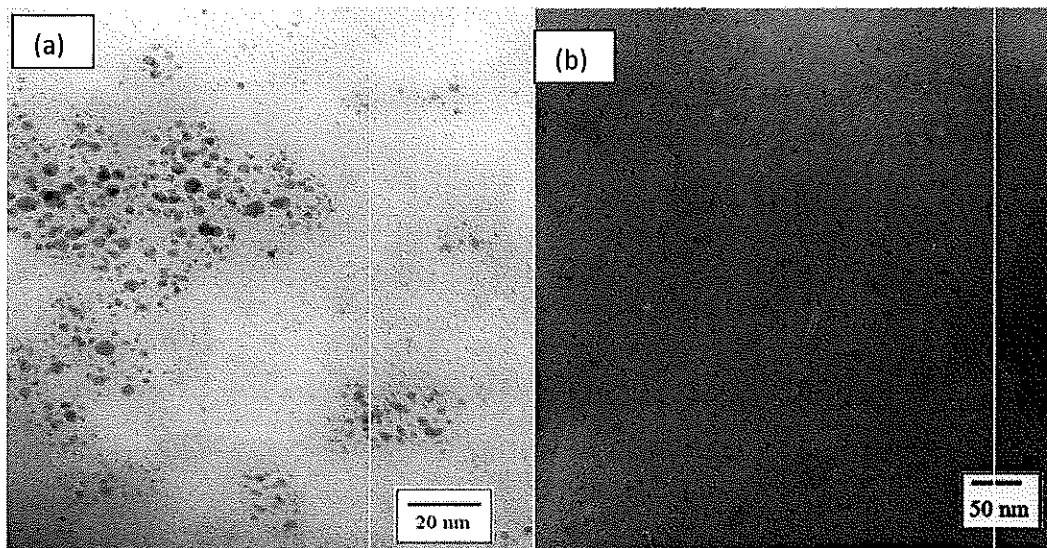


Figura 35. Micrografía TEM de nanopartículas de oro preparadas con el método de borohidruro de sodio (a) mayor y (b) menor magnificación.

La caracterización fue por medio de micrografías por TEM (Figura 35) que presentan partículas de un diámetro aproximado de 3.5 nm, con geometría principalmente esférica. Aunque aún no se puede confirmar la formación de AuNPs, puede ser que estas partículas sean sólo agregados de las sales que se formaron al mezclar ambas soluciones.

### 4.3.3 Muestras obtenidas por el método de hidroxilamina

#### 4.3.3.a. Caracterización química y morfológica por EDS y SEM

Mediante la técnica de EDS (Figura 36) se realizó el análisis elemental en el cual se identificó la presencia únicamente de oro ya que las muestras fueron filtradas y lavadas con agua desionizada antes de ser analizadas.

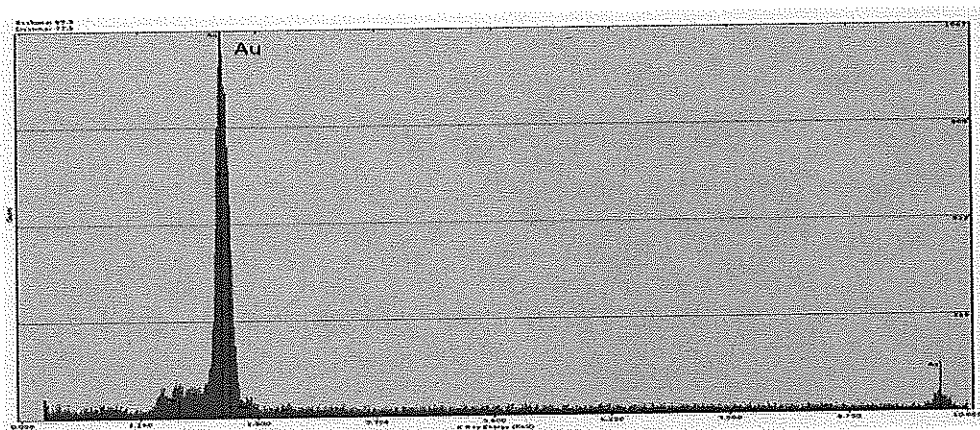


Figura 36. Estudio EDS de partícula típica mostrada en SEM. El análisis elemental denota la presencia de oro una vez que las NPs se lavaron.

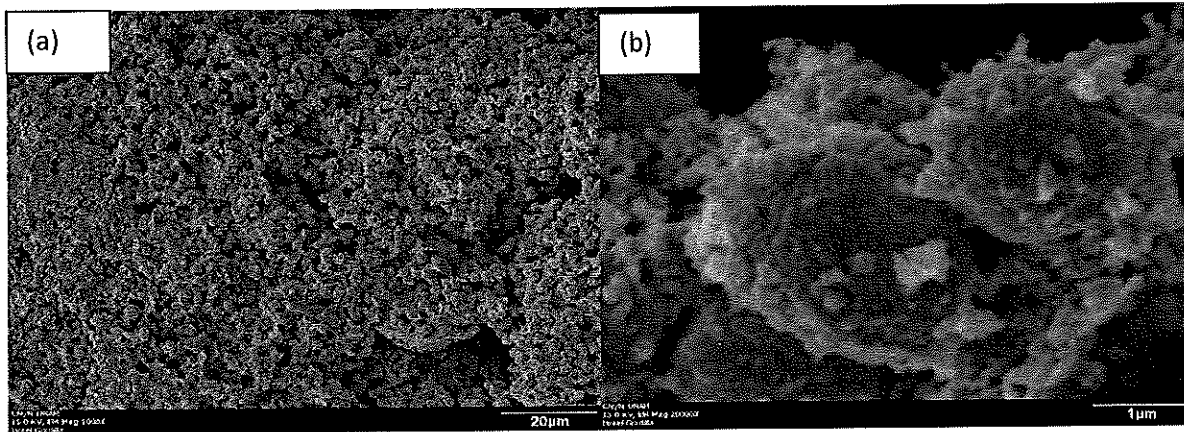


Figura 37. Micrografía de SEM de muestra preparada por el método de hidroxilamina (a) menor y (b) mayor amplificación.

Para realizar análisis de las muestras preparadas por este método se inicio con la caracterización con SEM. En las imágenes obtenidas se puede observar la muestra secada en aire. Se observa la tendencia a formar agregados esféricos a través del portamuestras (Figura 37a). A un mayor amplificación (Figura 37b) se observan patrones aglomerados de aproximadamente  $3\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3.b. Caracterización óptica por UV-Visible

Mediante la técnica de UV-Visible (Figura 38), se obtuvo un espectro donde el máximo del pico se encuentra en  $593\text{ nm}$ , y el ancho de su pico es de  $224\text{ nm}$ .

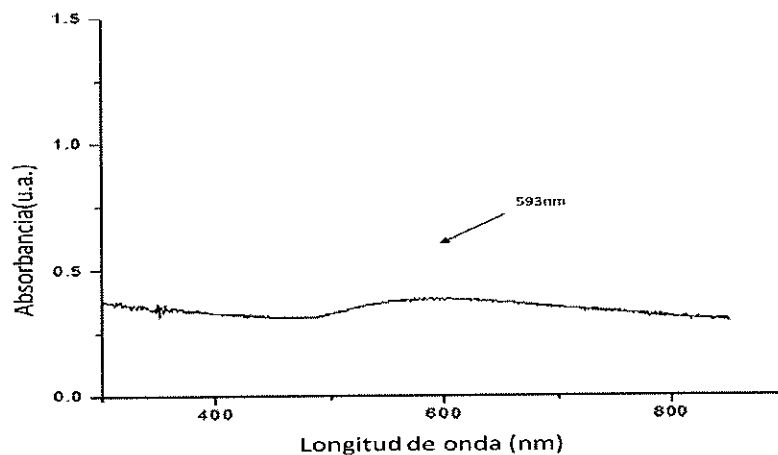
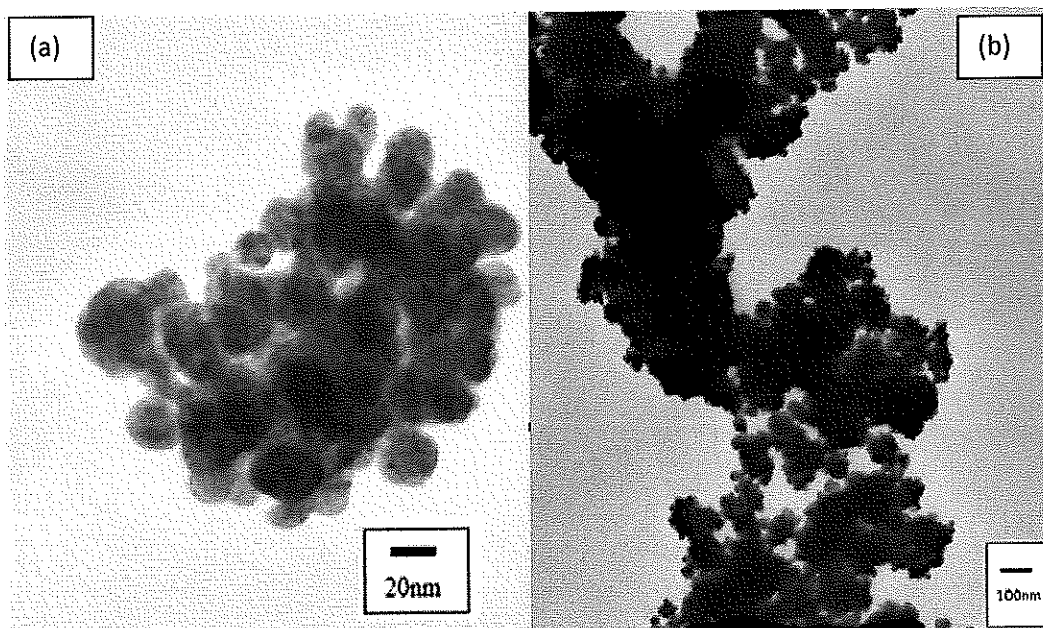


Figura 38. Espectro UV-VIS de muestra de solución coloidal inmediatamente después de ser sintetizada.

Es evidente que las AuNPs que muestran el espectro deseado son las de citrato de sodio.

#### 4.2.3.c. Caracterización de morfología y tamaño por TEM



**Figura 39.** Micrografía de TEM de muestra preparada por el método de ácido sulfúrico de hidroxilamina (a) menor y (b) mayor amplificación.

Para confirmar los datos arrojados por UV-Visible se realizó una serie de micrografías por TEM (Figura 39) en las que se observan partículas con alta tendencia esférica y alta tendencia a aglomerarse. En este caso, las soluciones se encontraban en un medio de gel, por lo que se cree que la gelatina contribuye grandemente a la alta tendencia de aglomeración.

### 4.3 Estabilidad de los coloides de Au

La reducción química de sales de metales de transición en presencia de agentes estabilizadores, se lleva a cabo para generar coloides metálicos en medio acuoso u orgánico. Este tipo de soluciones coloidales requiere de agentes protectores para ser estabilizadas y evitar aglomeraciones. Se distinguen dos modos básicos de estabilización: primero, la estabilización electrostática, basada en la repulsión eléctrica de la doble capa entre las partículas; segundo, la estabilización estérica, lograda por la coordinación de moléculas orgánicas que funcionan como escudo protector de la superficie metálica. De esta manera se separan los núcleos metálicos entre

sí y se evita la aglomeración. Los principales grupos protectores descritos principalmente en la literatura son: polímeros que cuentan con átomos de : P, N y S. En general, se utilizan agentes reductores lipofílicos son utilizados para proteger coloides metálicos que son solubles en medio orgánico u “*organosoles*”, por otra parte, se utilizan agentes hidrófilicos para producir coloides solubles en agua o “*hidrosoles*”. Aunque en un principio los agentes revestidores se utilizaron inicialmente para evitar la agregación de partículas, ahora se utilizan ampliamente para el control de tamaño y forma, y también para controlar las propiedades de la superficie durante la síntesis<sup>3</sup>.

Durante la síntesis por cada uno de los tres métodos, a simple vista se concluyó que los coloides de oro sintetizados por el método de citrato de sodio son altamente estables; hasta el momento tienen una estabilidad de 11 meses. Por otro lado, los coloides sintetizados por el método de borohidruro de sodio se precipitaron a las pocas horas después de haber sido sintetizados. A su vez, las soluciones coloidales de Au preparadas por el método de hidroxilamina tuvieron alta tendencia a acumularse, de tal manera que las partículas fueron juntándose hasta formar grandes cúmulos y perder sus propiedades coloidales (Figura 40).

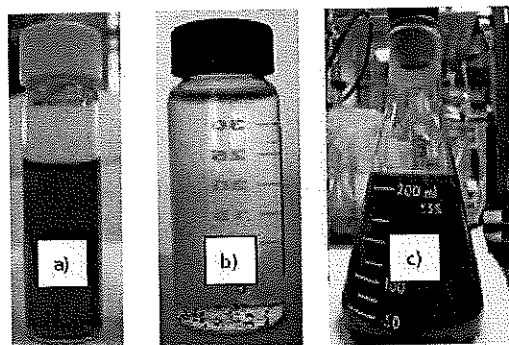


Figura 40. Fotografía de soluciones coloidales después de 2 horas de haber sido sintetizadas, (a) método de citratos, (b) borohidruro de sodio, (c) método de hidroxilamina.

#### 4.4 Reproducibilidad de síntesis de AuNPs

Como siguiente paso de este trabajo se realizó una prueba de reproducibilidad al método de citratos, ya que los métodos de borohidruro e hidroxilamina fueron descartados debido a su baja estabilidad y dificultad de síntesis. El método de citratos se replicó cuatro veces. En la Figura 41 se observan los cuatro coloides obtenidos, los cuales presentan una coloración color rojo oscuro similar. A simple vista se puede inferir su alta reproducibilidad. Para comprobar esto se

realizaron espectros UV-Vis. En la Figura 42 se exhiben los espectros obtenidos para cada una de las cuatro muestras preparadas, donde se observa claramente la concordancia de los picos, lo cual constituye evidencia de su alta reproducibilidad.

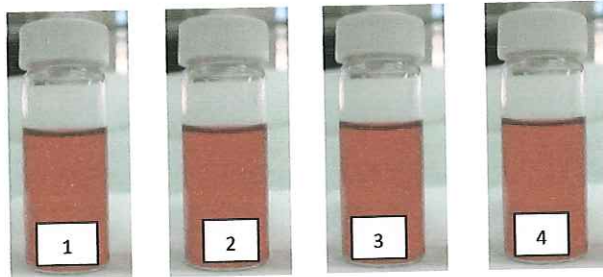


Figura 41. Reproducibilidad de las muestras sintetizadas con el método de citrato de sodio.

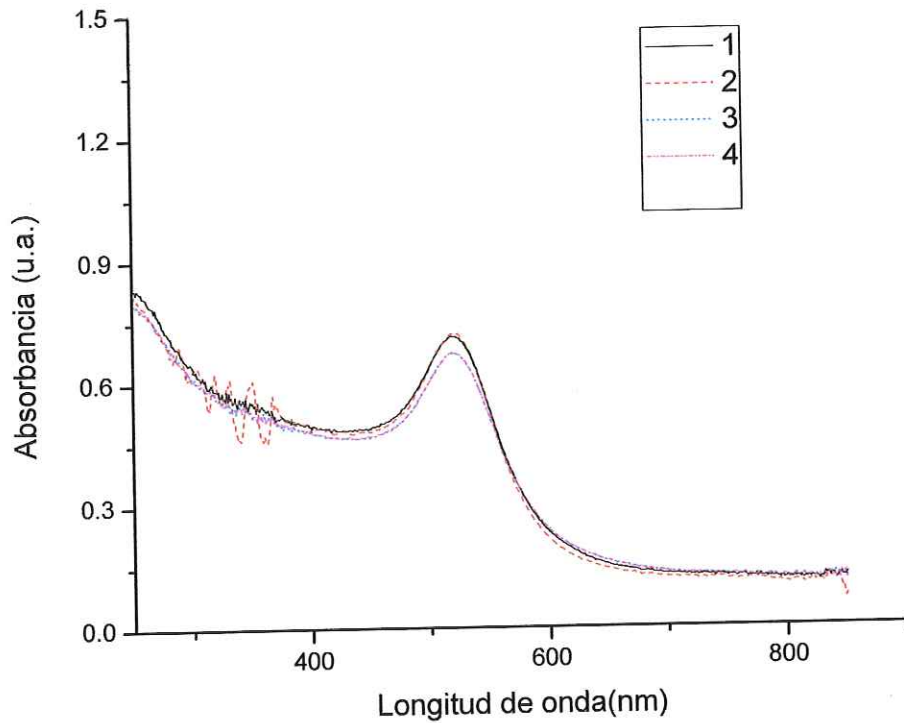


Figura 42. Espectro UV-VIS de la reproducción del método de citrato de sodio.

#### 4.5 Selección del método óptimo: síntesis de AuNPs por citratos

Al realizar la síntesis y caracterización por los tres métodos elegidos, obtuvimos diferencias en los resultados con respecto a los parámetros de las NPs establecidos (véase Tabla 6 del capítulo de método experimental) que nos permitieron discernir entre los métodos y elegir el óptimo. Una variante fundamental fue el diámetro de las NPs (Figura 43) obtenidas.

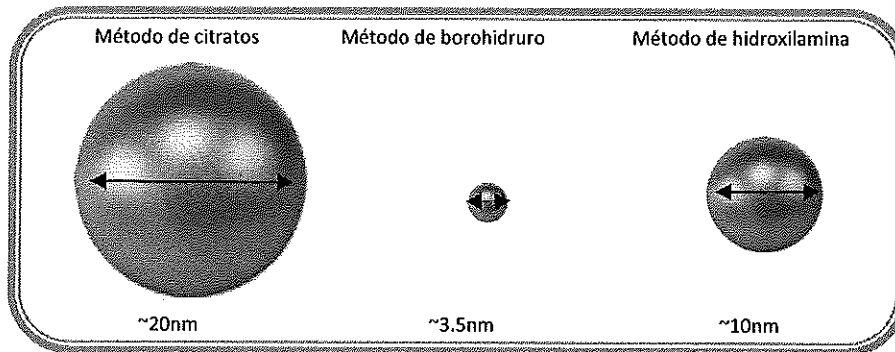


Figura 43. Representación de diámetros de las AuNPs obtenidas por los 3 métodos.

Tabla 9. Comparativo de los métodos utilizados y cumplimiento de condiciones deseadas

Método	Bajo costo	Facilidad de síntesis	Morfología esférica	Estabilidad	Reproducibilidad
Citratos	Si	Si	Si	(> 1 año)	Si
Borohidruro	Si	Si	Si	(horas)	No
Hidroxilamina	Si	No	Si	(2 meses)	No

La Tabla 9 muestra que los tres métodos son económicos. El método de hidroxilamina implica mayor complejidad de síntesis ya que al preparar las AuNPs la temperatura debe estar controlada a 20°C; si no es así, no se lleva a cabo la formación de AuNPs. Las AuNPs producidas por este método tienden a agregarse y a precipitarse, por tal razón presentan baja estabilidad. El método de borohidruro es el más inestable entre estos tres métodos, y al caracterizar la muestra no obtuvimos información de que se hayan formado AuNPs. Por esa misma razón no se le dio seguimiento a este método ya que no cumplía con 2 de los parámetros, estabilidad y facilidad de

síntesis. El método de citratos, a diferencia de los otros dos métodos, es fácilmente reproducible, altamente estable, económico y fácil de realizar. La geometría de las AuNPs es esférica con un diámetro de ~20 nm. Todo lo anterior hace del método de citratos el candidato perfecto para ser utilizado para las siguientes secciones de este trabajo.

Una vez elegido el método más conveniente de síntesis de las AuNPs, realizamos la síntesis variando la concentración del agente reductor (citrato de sodio) para continuar la optimización de este método.

#### **4.6 Optimización del método de síntesis de citrato de sodio**

La síntesis química de nanopartículas metálicas por medio de reducción de su sal metálica es un proceso sencillo que sólo requiere la mezcla de los agentes en condiciones externas bien definidas. Estas condiciones pueden afectar sutilmente la morfología final de las partículas. En este trabajo nos hemos concentrado en los cambios de concentración del agente reductor. Pero es necesario mencionar que otros parámetros, tales como la temperatura o valor del pH, también tienen una gran influencia en la morfología. Reducir la temperatura durante la reacción del citrato, por ejemplo, afecta drásticamente el tamaño y la calidad final de las AuNPs, produciendo diámetros mayores y formas irregulares<sup>4</sup>.

Para optimizar la síntesis de AuNPs (morfología, estabilidad, etc.) del método de síntesis de AuNPs se prepararon diez muestras de AuNPs en dispersión acuosa utilizando el método de reducción de  $\text{HAuCl}_4$  y variando la concentración de citrato de sodio. En la Tabla 10 se muestran las condiciones de preparación de los coloides. En éstos la modificación de la relación de concentraciones de oro: citrato se llevó a cabo en el rango de 1:1 a 1:100 y la proporción de oro=0.5mM ( $\text{Au}^{3+}$ ) se mantuvo constante para el siguiente grupo de muestras.

Tabla 10. Condiciones de preparación de coloides de Au

Muestra	Solución de citrato de sodio en mM	Proporción relación molar $C_{pre}/C_{red}$ *	pH del coloide	Nombre asignado a muestras
1	0.5	1:1	3.48	AuCit 1:1
2	1	1:2	5.21	AuCit 1:2
3	1.5	1:3	5.78	AuCit 1:3
4	2.5	1:5	6.25	AuCit 1:5
5	3	1:6	6.32	AuCit 1:6
6	5	1:10	6.63	AuCit 1:10
7	10	1:20	6.88	AuCit 1:20
8	25	1:50	7.02	AuCit 1:50
9	40	1:80	7.20	AuCit 1:80
10	50	1:100	7.27	AuCit 1:100

\*  $C_{pre}/C_{red}$  Relación molar que existe entre la concentración del precursor y concentración para el reductor

Los espectros de absorbancia de las AuNPs fueron registrados inmediatamente después de que las nanopartículas fueron preparadas y enfriadas a temperatura ambiente (Figura 44a) y muestran claramente la variación de intensidad y anchura de picos. En la Figura 44b se muestran los espectros, con ajuste realizado eliminando el fondo. Es claro que hay una disminución en la intensidad de los picos dependiente de los cambios de concentración de citrato de sodio, también se observa un cambio en el ancho de los picos. Para observar de una manera más clara estos cambios se realizó una comparación de los valores medidos a mayor detalle en la Figura 45.

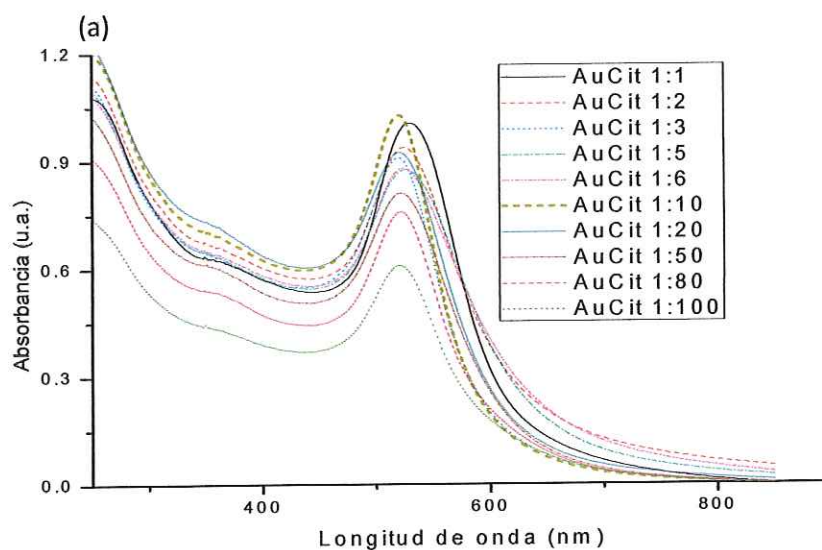


Figura 44. (a) Espectro UV-VIS de las muestras preparadas con diferentes concentraciones de citrato.

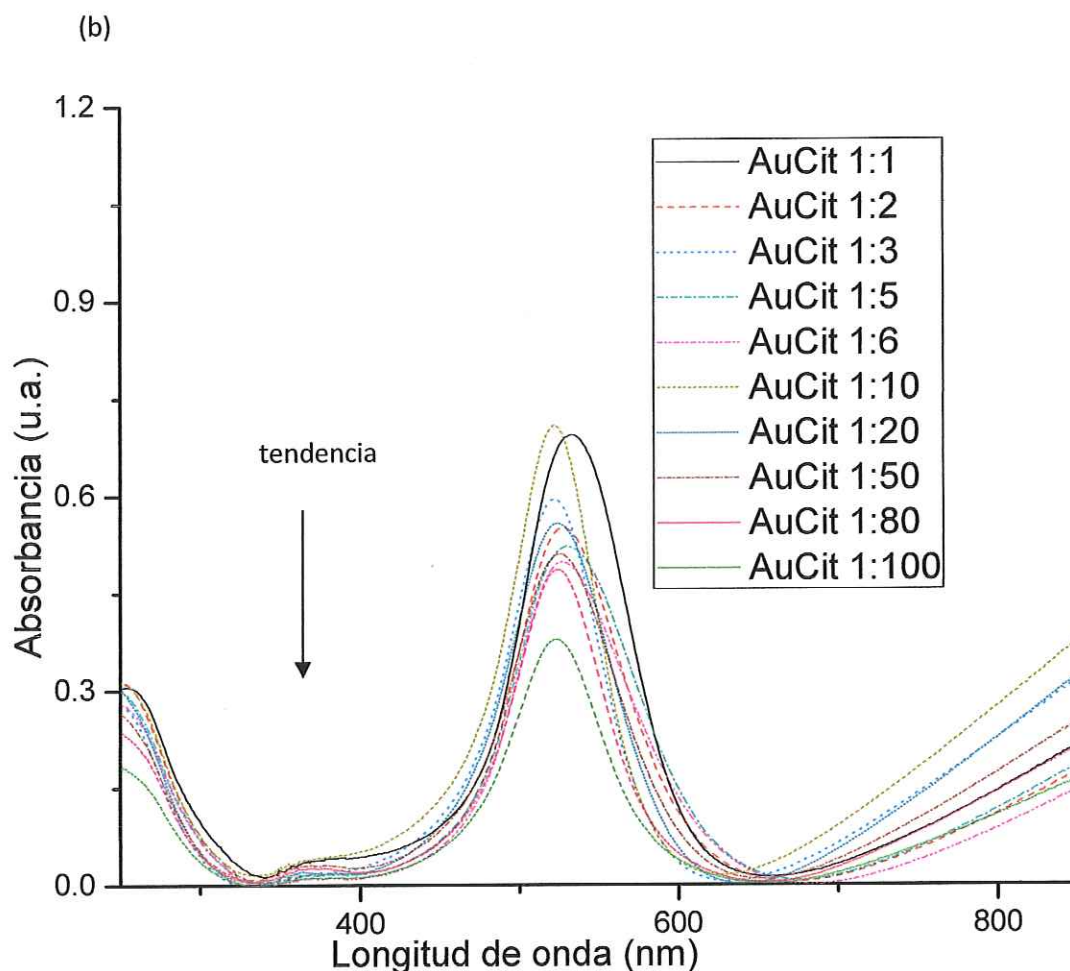


Figura 44. (b) Espectro UV-VIS de las muestras preparadas con diferentes concentraciones de citrato de sodio con ajuste.

La Figura 45b muestra la posición de los máximos de picos de resonancia del plasmón con intensidades desde 0.30 hasta 0.7 u.a. (Figura 45a) Los picos se encuentran posicionados en el rango de longitud de onda de 520-535 nm (Figura 45b y Tabla 11) y son dependientes de la concentración de citrato de sodio. En la Figura 45c, se despliegan las medidas de ancho de los picos de cada una de las muestras. En la Tabla 11 se muestra un resumen de los datos obtenidos de los picos de absorbancia en el espectro. Es claro que las muestra AuCit 1:2, 1:10 y 1:20 tienen los valores máximos de intensidad. Las muestras 1:3 y 1:10 presentan los anchos de pico más estrechos.

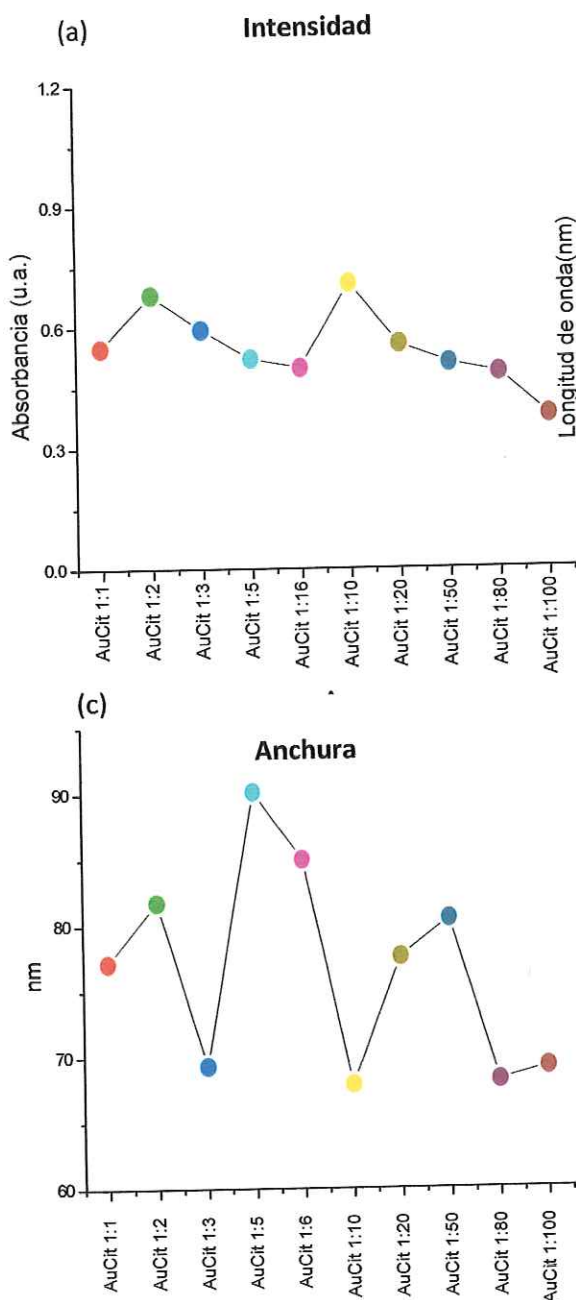
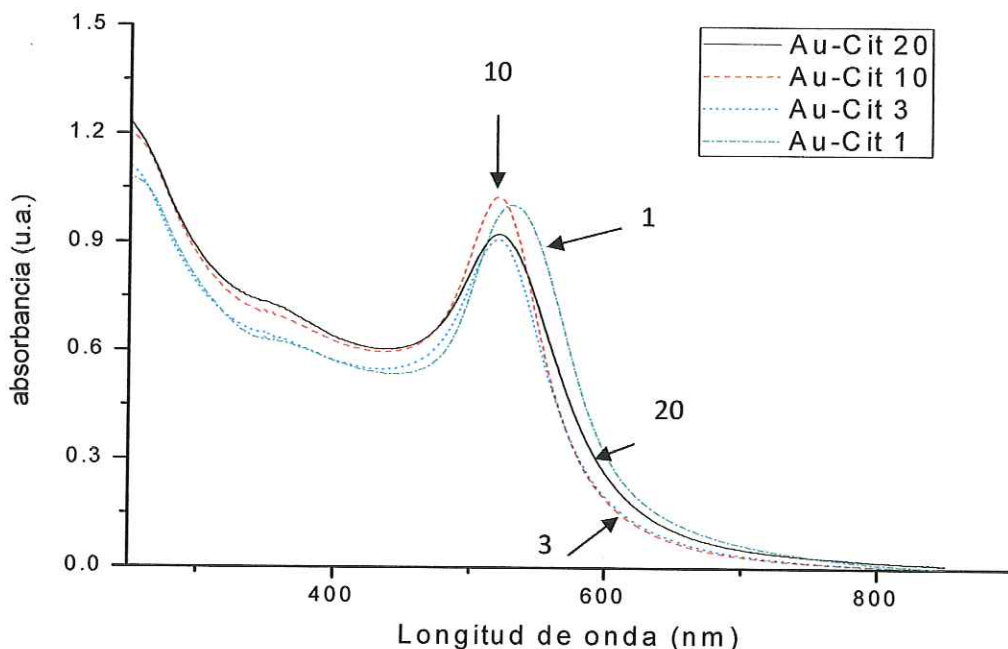


Tabla 11. Información de posición, intensidad y anchura de picos obtenida de los espectros UV-Visible

Muestra	Posición (nm)	Intensidad (u.a.)	Anchura (nm)
AuCit 1:1	534	0.549	77.13
AuCit 1:2	530	0.680	81.75
AuCit 1:3	522	0.594	69.31
AuCit 1:5	531	0.521	90.14
AuCit 1:6	527	0.498	85
AuCit 1:10	522	0.708	67.88
AuCit 1:20	524	0.557	77.58
AuCit 1:50	524	0.509	80.44
AuCit 1:80	524	0.485	68.16
AuCit 1:100	525	0.378	69.16

Figura 45. Máximos de absorbancia de muestras preparadas con diferentes concentraciones de reductor; (a) intensidad de picos; (b) posición de picos; (c) anchura de picos de los datos obtenidos por espectroscopia UV-VIS.

Los datos de Tabla 11 y las Figura 45 corresponden al espectro con ajuste, es decir, sustracción de línea base.



**Figura 46. Espectro UV-VIS de los máximos de absorbanza de las 4 muestras seleccionadas, AuCit 1:1, AuCit 1:3, AuCit 1:10 y AuCit 1:20.**

Se realizó un ajuste con el fin de encontrar la concentración óptima de citrato de sodio. Para obtener nanopartículas de morfología más definida y menor distribución de tamaños se eligieron cuatro muestras con las siguientes proporciones 1:1, 1:3, 1:10 y 1:20 por ser las más representativas ya que sus picos son los más estrechos. En la Figura 46 se presentan los espectros UV-Visible de las muestras. Es necesario mencionar que la anchura del pico nos da información sobre el tamaño y la intensidad nos informa sobre la capacidad de reducción.<sup>5</sup> Para reforzar los datos obtenidos por UV-Visible, se tomaron micrografías por TEM a las 4 muestras elegidas en las que se realizó análisis más detallado.

#### 4.6.1 Análisis de las 4 muestras sintetizadas por el método de citrato

La Figura 47a muestra que con la proporción de Au:Cit 1:1 se forman AuNPs con alta tendencia esférica y con diámetro de  $22\text{nm} \pm 18\text{nm}$ . En la Figura 47b se puede apreciar que con la proporción Au:Cit 1:3, las AuNPs, tuvieron alta tendencia esférica pero con diámetro menor a  $15\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . Por otro lado, la Figura 47c muestra del lado izquierdo una vista panorámica y, del

lado derecho, la morfología esférica de las AuNPs con diámetro de  $20 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ . Y, por último, en la Figura 47d se observa del lado izquierdo una vista panorámica de la muestra, mientras que del lado derecho se muestra la morfología también con tendencia esférica y un diámetro de  $10 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$ . En algunos casos la morfología presentó tendencia a rodillos.

Haciendo un resumen de la información obtenida (Tabla 11) en las caracterizaciones podemos comparar las 4 muestras seleccionadas. Estas 4 muestras presentan máximos de absorbancia en el intervalo entre 520-530 nm previamente reportado para AuNPs<sup>15</sup>. Los coloides de oro de AuCit 1:1 y AuCit 1:10 presentan máximos de absorbancia mayores 1.064 y 1.026 respectivamente. Mientras que las AuCit 1:3 y AuCit 1:10 presentan los picos más angostos. En la Figura 44 se pueden comparar los espectros de las absorbancias. Es muy importante considerar estos parámetros debido a que en este trabajo, se busca obtener soluciones coloidales de AuNPs con menor distribución de tamaño y morfología esférica. Según la literatura<sup>6</sup>, las partículas pequeñas se caracterizan por picos anchos y menos definidos, mientras que en las partículas grandes los picos son más definidos y el máximo de plasmón es más agudo, lo cual fue confirmado por TEM (Figura 47), y posteriormente con los histogramas de distribución de tamaño de NP.

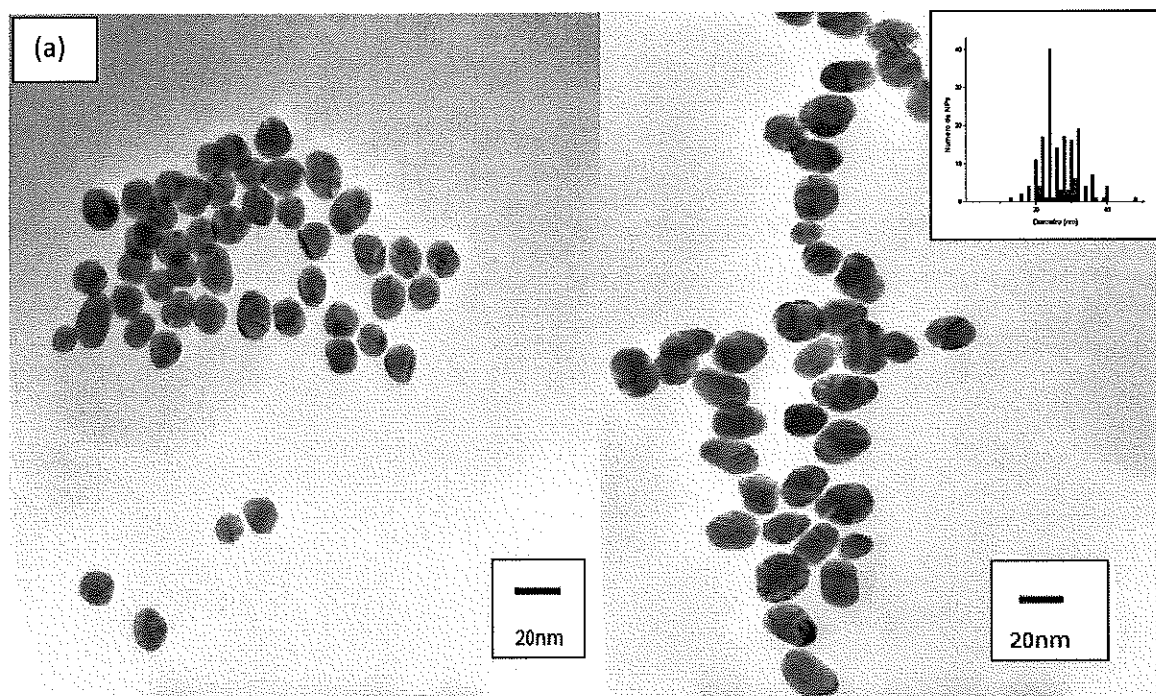


Figura 47(a). Micrografías de TEM con diferentes ampliaciones. El inserto muestra el histograma de distribución de diámetros de nanopartícula. AuCit 1:1.

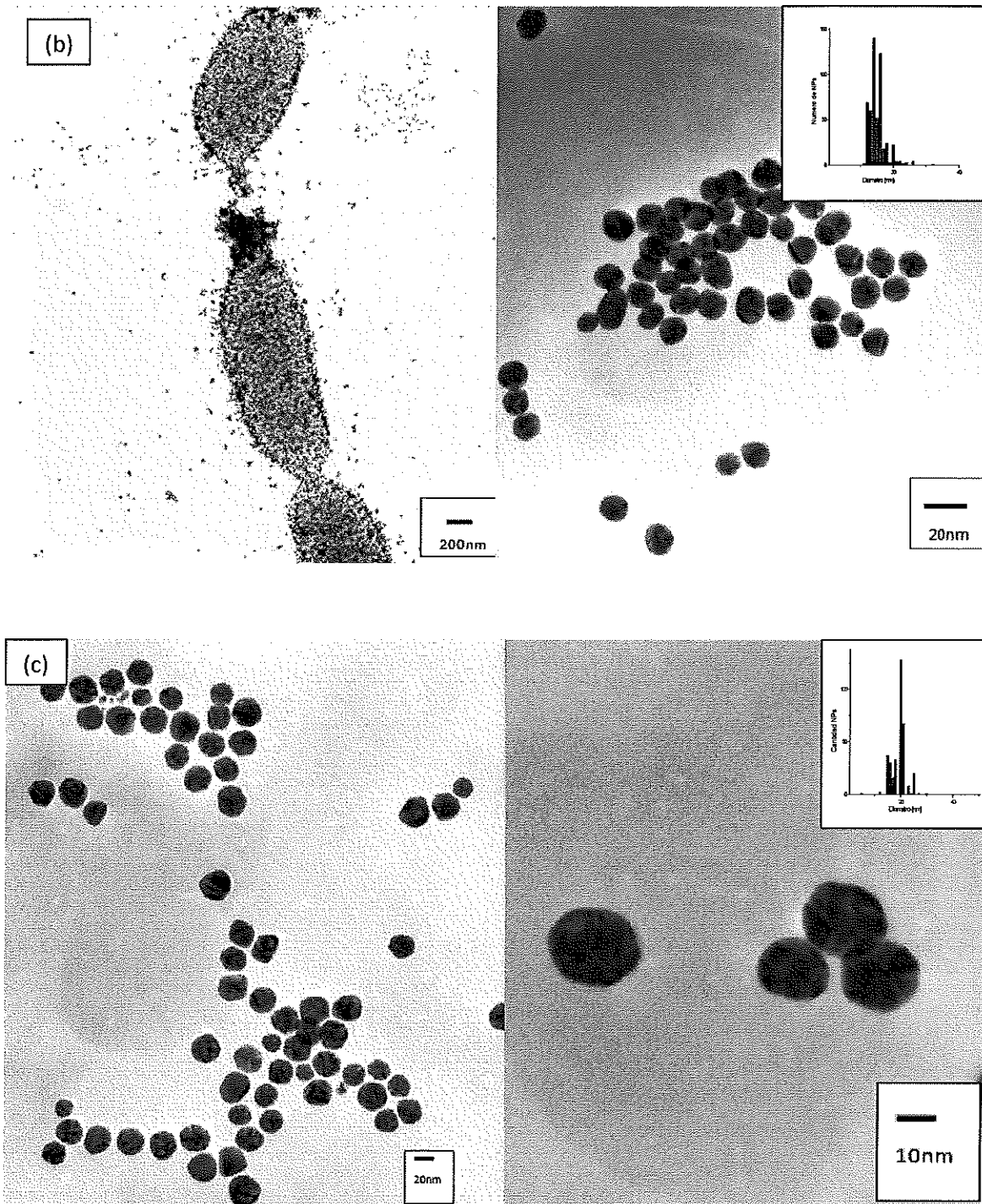


Figura 47. Micrografías de TEM con diferentes ampliaciones. El inserto muestra el histograma de distribución de diámetros de nanopartícula. (b) AuCit 1:3; (c) AuCit 1:10.

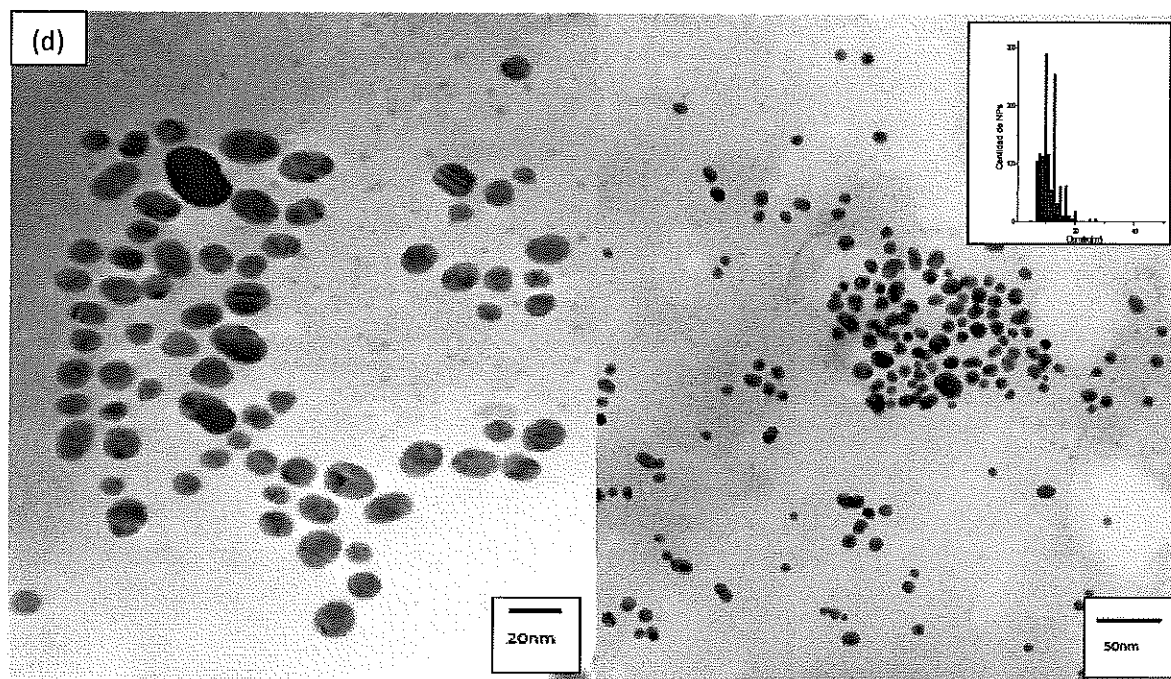


Figura 47 (d). Micrografías de TEM con diferentes ampliaciones. El inserto muestra el histograma de distribución de diámetros de nanopartícula. AuCit 1:20.

#### 4.7 Cinética durante almacenaje de AuNPs preparadas con citrato

Para realizar el estudio de estabilidad de las muestras, éstas fueron almacenadas en un refrigerador convencional a 5°C. Con el fin de determinar la concentración óptima de citrato de sodio en la síntesis de los coloides de Au, se obtuvieron los espectros UV-VIS de cuatro muestras seleccionadas inmediatamente después de la síntesis y se muestran en la Fig. 48a. Es clara la semejanza en la altura y anchura de pico entre las muestras AuCit 1:1- AuCit 1:10, siendo un poco más ancho el pico de la primera, y entre AuCit 1:3 -AuCit 1:20. En el espectro registrado 1 semana después (Figura 48b) se observa una pérdida de intensidad y ligero corrimiento hacia el rojo en todos los picos, siendo la muestra AuCit 1:10 la que presenta mayor resistencia al cambio. En la semana 2, se observa que los máximos de intensidad siguen disminuyendo levemente (Figura 48c). En la semana 4 (Figura 48d). Se observa una dramática caída en el pico de AuCit 1:1 acompañada de la formación de un segundo hombro, mientras que AuCit 1:10 se mantiene constante en su intensidad y anchura de pico con un corrimiento hacia el rojo. AuCit 1:3 y AuCit 1:20 presentan una mayor anchura de pico pero su máximo de absorbancia se encuentra estable.

Debido que una de las características buscadas durante este trabajo fue la obtención de soluciones coloidales altamente estables, la muestra AuCit 1:1 fue descartada ya que se descompuso rápidamente. La aplicación de una cantidad menor de citrato de sodio lleva a un decremento en la estabilidad de la dispersión coloidal, dando como resultado la agregación de AuNPs.

Las muestras AuCit 1:3, AuCit 1:10 y AuCit 1:20 (Figura 48) presentan mayor estabilidad a través del tiempo. Sin embargo, otros factores a considerar son el diámetro y la distribución de tamaño de las AuNPs. Recordando que la distribución de tamaño de las NPs, tenemos que AuCit 1:3 tiene una distribución de diámetros en el intervalo de 10-20 nm, AuCit 1:20 de 5-25 nm y AuCit 1:10 15-25 nm. Considerando estas características se descarta la muestra AuCit 1:20 por tener un rango de distribución de tamaño grande. Otro factor es el tamaño de la partícula; se busca que las partículas no sean muy pequeñas ya que éstas deben de ser capaces de "cargar" la molécula biológica con la cual serán posteriormente funcionalizadas. Por tal razón se descartó el coloide AuCit 1:3.

De acuerdo con lo discutido anteriormente, la muestra AuCit 1:10 presenta alta estabilidad, menor distribución de tamaño de diámetro 15-25 nm, morfología esférica, y, por lo tanto, fue elegida para ser funcionalizada con cisteína como se describe a continuación.

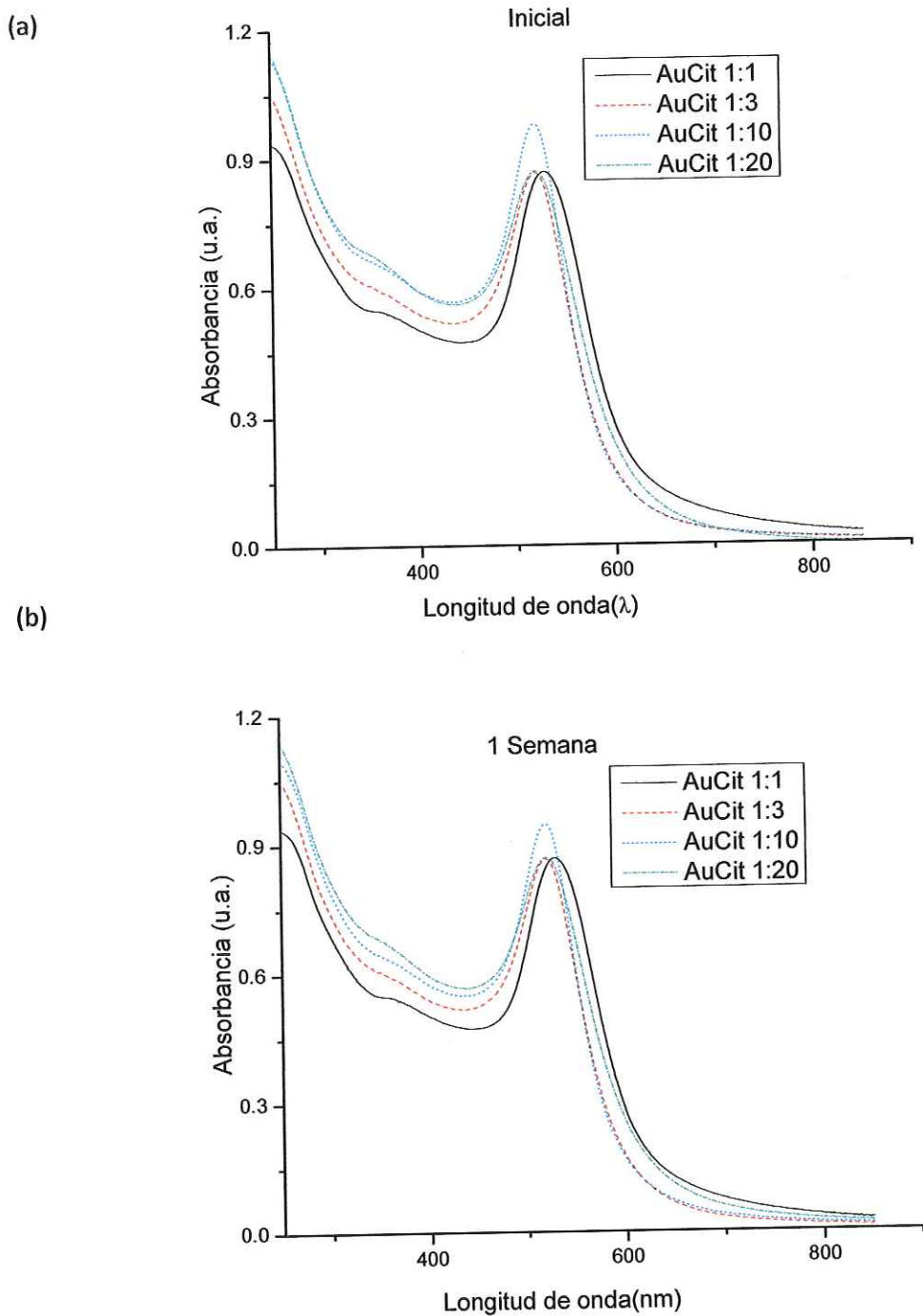


Figura 48. Espectros UV-VIS (a) al momento de síntesis; (b) una semana de haber sido sintetizadas las muestras.

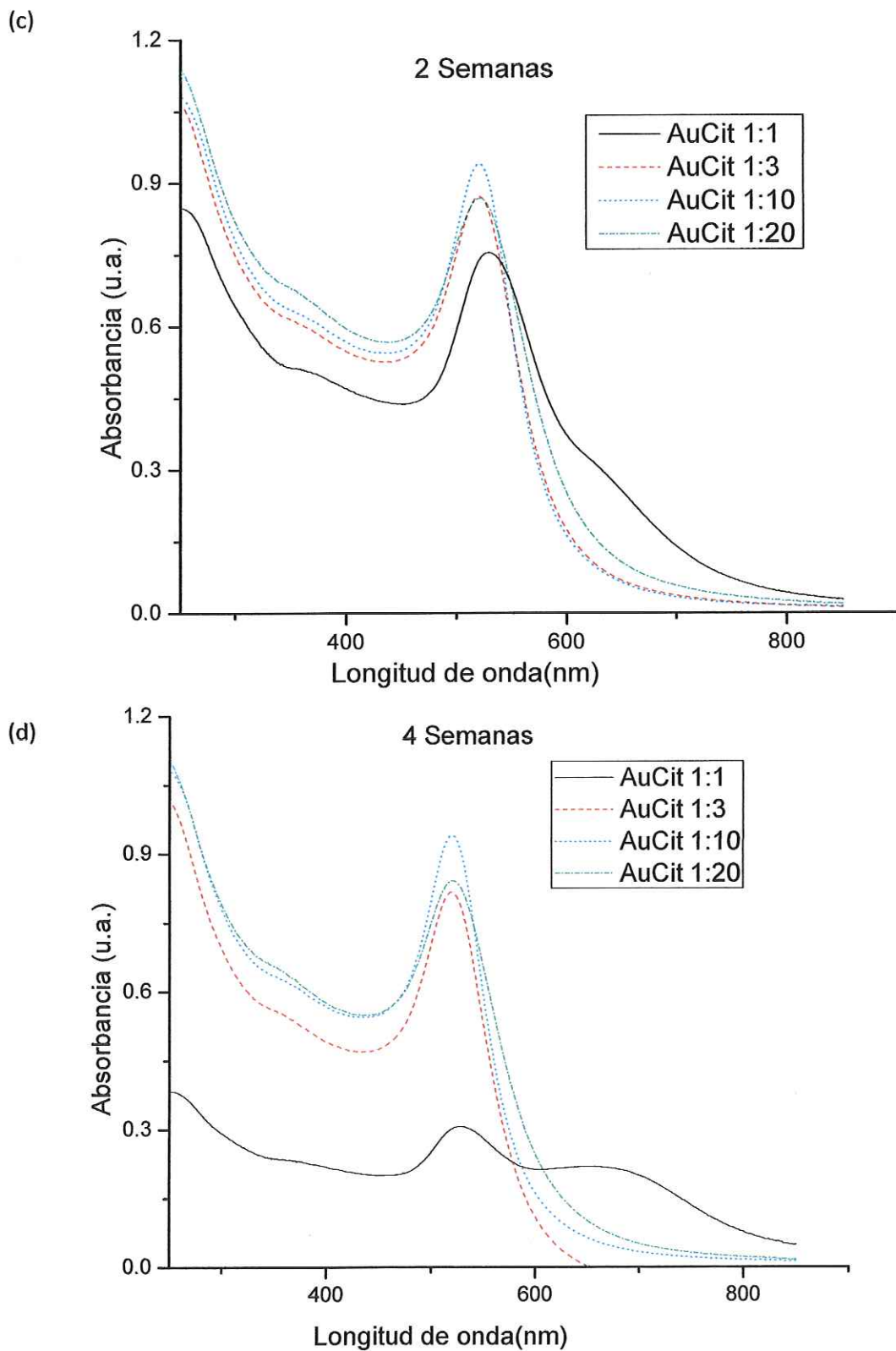


Figura 48. Espectros UV-VIS. (c) dos semanas; (d) cuatro semanas después de haber sido sintetizadas las muestras.

## 4.8 Funcionalización de AuNPs con cisteína

La superficie de las partículas sintetizadas con una proporción de  $C_{Au}/C_{cit}=1:10$  fue modificada siguiendo el método utilizado por Majzik, et al<sup>7</sup> por medio de procesos de quimisorción por cisteína cuya molécula contiene un grupo tiol.

Para todas las soluciones de Au coloidal, se utilizó la proporción de  $C_{Au}=0.5mM/C_{cit}=5mM=1:10$ , modificando las concentraciones de cisteína (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración de cisteína para muestras. pH de la cisteína es 3.39

Muestra	Solución de cisteína en $\mu M$	pH del coloide (sin cisteína 6.63)
1	10	5.74
2	20	6.41
3	30	6.22
4	50	6.33
5	80	6.40
6	100	6.18
7	200	6.19
8	300	6.26

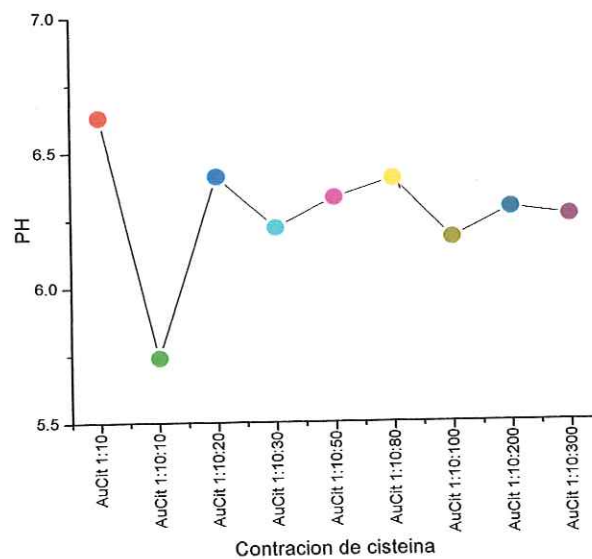


Figura 49. Gráfica de pH contra concentración de cisteína agregada.

Se realizó un monitoreo de pH a los coloides sintetizados y funcionalizados, tomando como pH inicial el del coloide de oro sin cisteína. Se presentó una caída del pH al agregarle la primera concentración de 10 mM de cisteína y tuvo oscilaciones entre 6.4 y 6.2 (Figura 49).

La funcionalización de la superficie de Au con cisteína fue observada (Figura 50a) al ir incrementando las concentraciones de cisteína. El espectro de absorbancia muestra una reducción significativa (~40%) en el máximo de absorbancia entre el coloide de Au sin funcionalizar y el coloide de Au funcionalizado, así como un ensanchamiento en el pico y un decaimiento gradual relacionado con el amplificación de concentración de cisteína aplicada. Es visible que los máximos de absorbancia se encuentran posicionados en un rango entre 523-528 nm (Figura 50b), mientras que el coloide de Au sin funcionalizar está localizado en 521 nm. Existe una variación en la anchura del pico conforme se aumenta la concentración molar de cisteína aplicada, el cual tiende a incrementar (Figura 50c) posiblemente por cambio de tamaño de AuNPs siendo el diámetro menor para la muestra AuCitCys1:10:100. Anchura de picos de plasmón se aumentan cuando diámetro de AuNPs disminuye<sup>8</sup>.

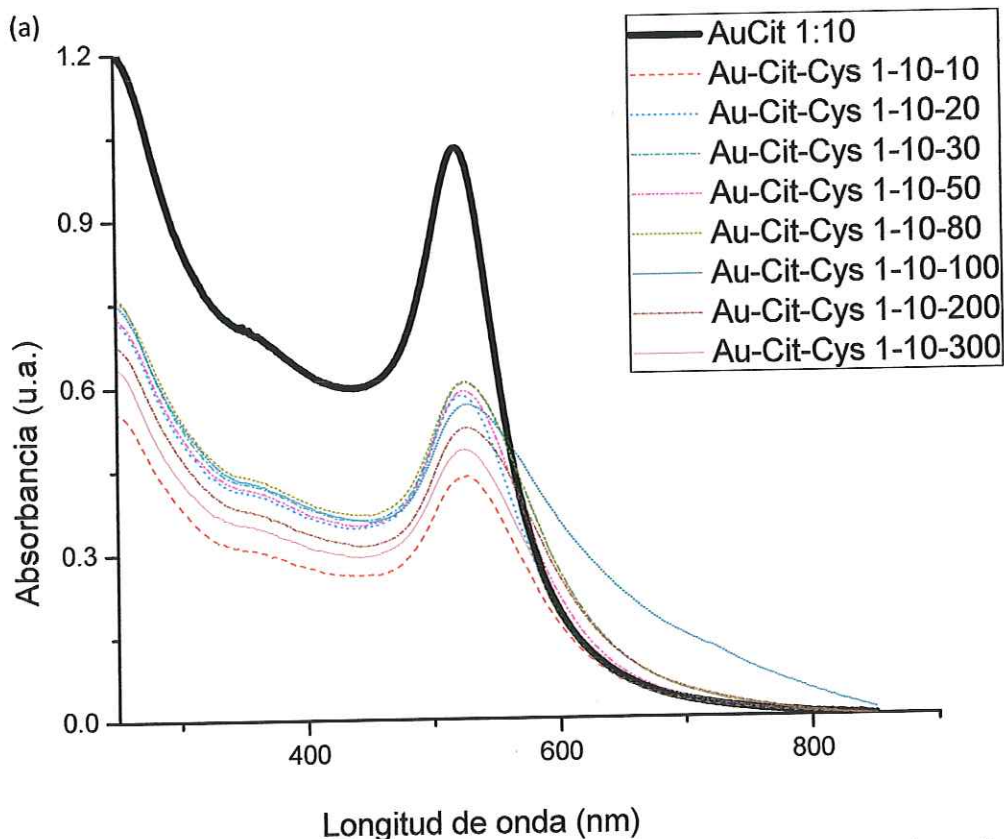


Figura 50. Espectro UV-VIS (a) ocho muestras funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína

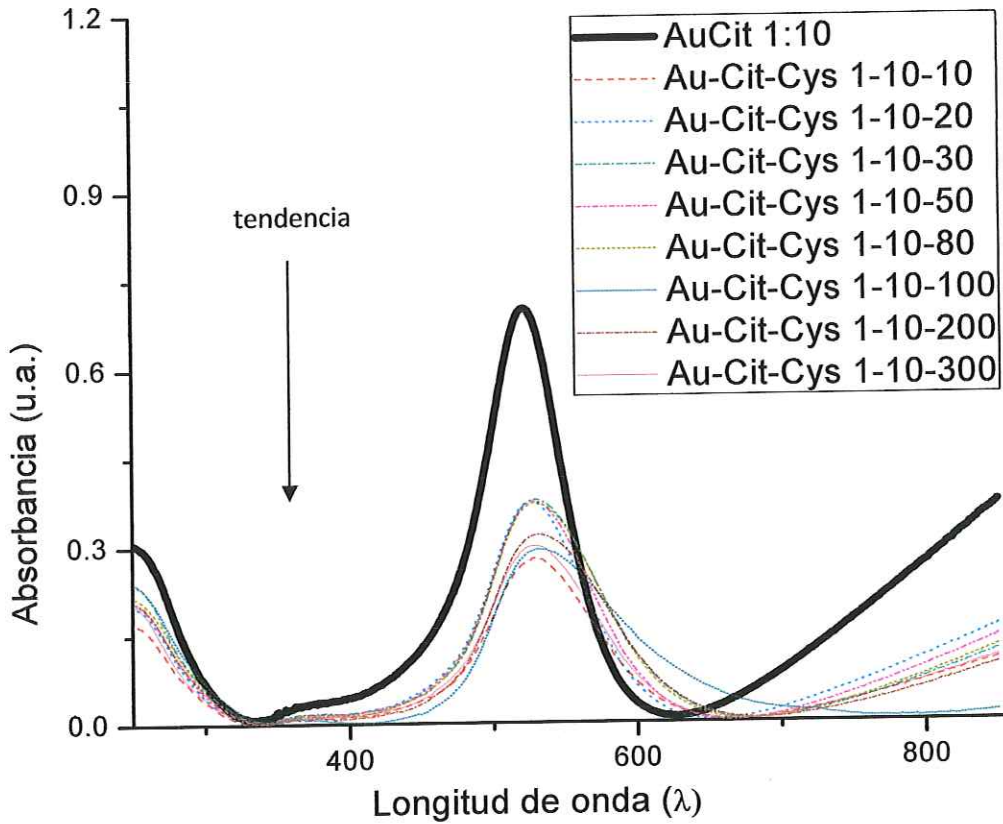
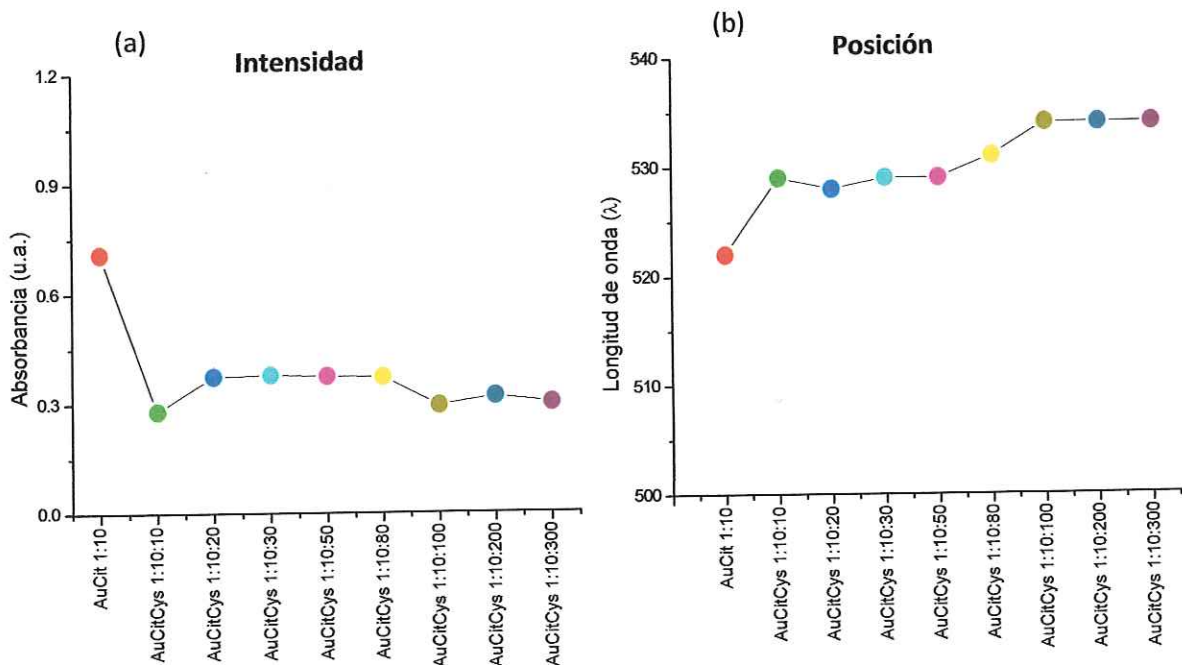


Figura 50. Espectro UV-VIS (b) ocho muestras funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína con ajuste



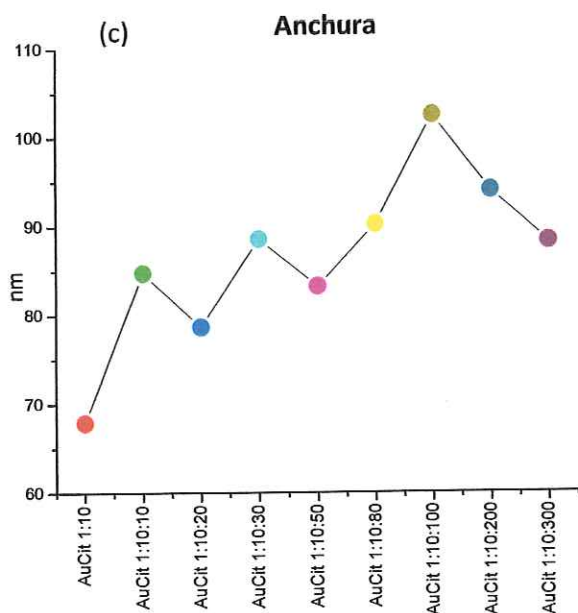


Tabla 13. Información de posición, intensidad y anchura de picos obtenida de los espectros UV-VIS

Muestra	Posición (nm)	Intensidad (u.a.)	Anchura (nm)
AuCit 1:10	522	0.708	67.88
AuCitCys 1:10:10	529	0.278	84.74
AuCitCys 1:10:20	528	0.373	78.68
AuCitCys 1:10:30	529	0.377	88.57
AuCitCys 1:10:50	529	0.373	83.26
AuCitCys 1:10:80	531	0.371	90.20
AuCitCys 1:10:100	534	0.293	102.47
AuCitCys 1:10:200	534	0.317	94.03
AuCitCys 1:10:300	534	0.299	88.28

Figura 51. Gráficos de datos obtenidos de las ocho muestras funcionalizadas con cisteína (a) máximos de absorbancia; (b) posición de picos en el espectro; (c) ancho de pico.

Se observa el amplificación en la intensidad del pico conforme se eleva la concentración de cisteína de 10, 20 y alcanza su máximo en 30 $\mu$ M. Para la muestra de 50  $\mu$ M existe un ligero decremento, volviendo a aumentar en la muestra de 80  $\mu$ M; finalmente, va decreciendo conforme la concentración aumenta de 100  $\mu$ M a 200  $\mu$ M y alcanza su punto más bajo en 300  $\mu$ M (Figura 51a y 51b) esto se cree que se debe a que la SPR depende de la constante dieléctrica del medio, por lo tanto al ir incrementando la concentración de cisteína vamos cambiando el medio<sup>9</sup>. De este lote de muestras (datos Tabla 13) se eligieron las más representativas para realizar un estudio de estabilidad: AuCitCys 1:10:20, AuCitCys 1:10:30, AuCitCys 1:10:200 y AuCitCys 1:10:300, ya que las dos últimas son 1 orden de magnitud más grandes que las dos primeras.

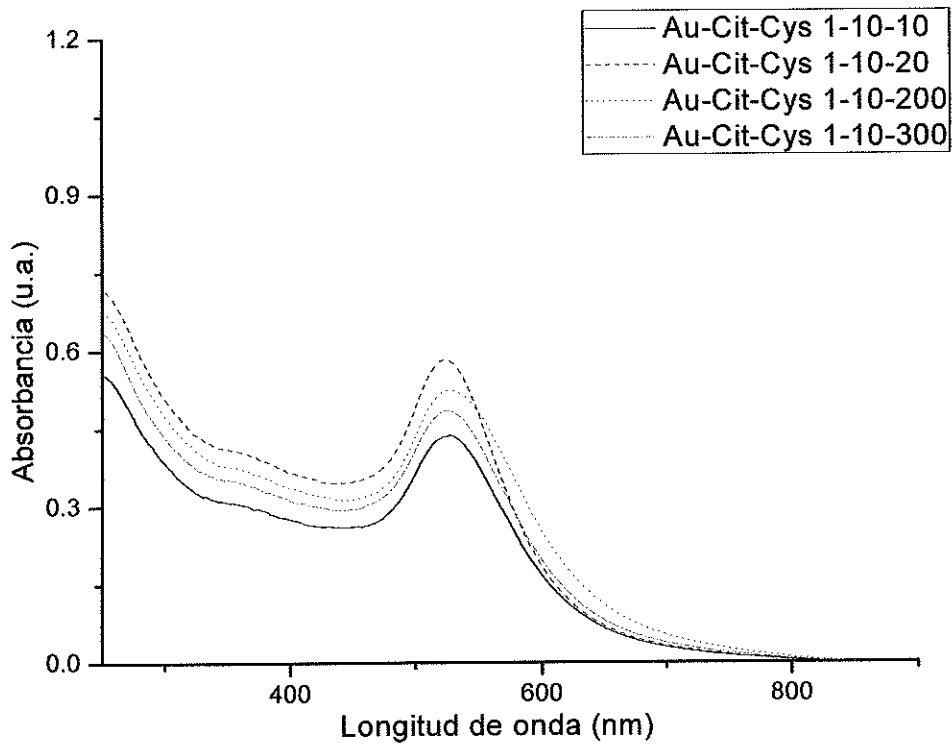


Figura 52. Muestras elegidas para ser estudiadas.

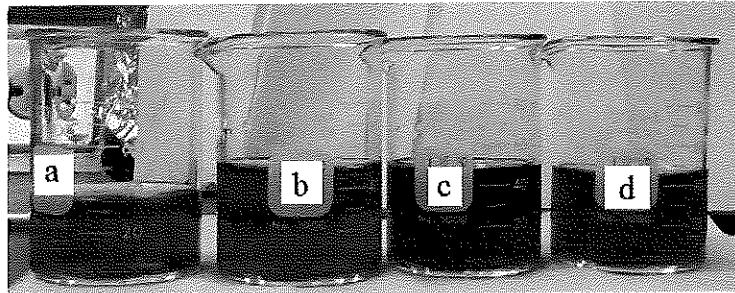


Figura 53. Fotografía de (a) AuCitCys 1:10:20; (b) AuCitCys 1:10:30; (c) AuCitCys 1:10:200; y (d) AuCitCys 1:10:300.

En la Figura 53 se observa que mayor concentración de cisteína se observa un oscurecimiento en la solución coloidal que va desde el rojo vino hasta un rojo vino profundo.

#### 4.8.1. Análisis de las 4 muestras seleccionadas funcionalizadas con diferentes concentraciones de cisteína

Mediante TEM se corroboraron los datos arrojados por espectroscopia UV-VIS. En la Figura 49a se observa la presencia de AuNPs aisladas, pero en su mayoría tienden a acomodarse en aglomerados. Conforme aumenta la concentración de cisteína, en las Figuras 54 a,b,c y d se observa que la mayoría de las AuNPs se encuentran enlazadas con otras y ya no es evidente la presencia de AuNPs aisladas.

Se hace más evidente la formación de redes de AuNPs al agregar mayor concentración de cisteína (Figura 54). Por otro lado, se recordará que las AuNPs estabilizadas con citrato (véase Figura 47c) se encuentran alejadas entre sí. El citrato de sodio actúa como agente reductor y sus aniones son adsorbidos por las nanopartículas y establecen una capa difusora en la superficie que repele a otras partículas y evita su agregación.

En presencia de cisteína bajo condiciones ácidas, los grupos funcionales de la cisteína son protonados (los grupos tiol se enlazan a la superficie del oro) de tal manera que las moléculas de cisteína se forman conexiones (“puentes”) entre las nanopartículas. Por lo consiguiente, se forman largos agregados, los cuales tienden a aglomerarse con el tiempo. En las (Figuras 54a,b,c y d) se observa un traslape aleatorio formado por las AuNPs al momento de ser depositadas en la rejilla de cobre recubierta con carbono. Es clara la presencia de una sustancia que hace que las nanopartículas estén unidas unas a otras. A valores de pH correspondientes al punto isoeléctrico, el grupo carboxilo protonado de la molécula de cisteína se enlaza covalentemente a la AuNP cargada negativamente que se une a los grupos amino protonados de la molécula vecina, formando puentes que unen AuNPs individuales.

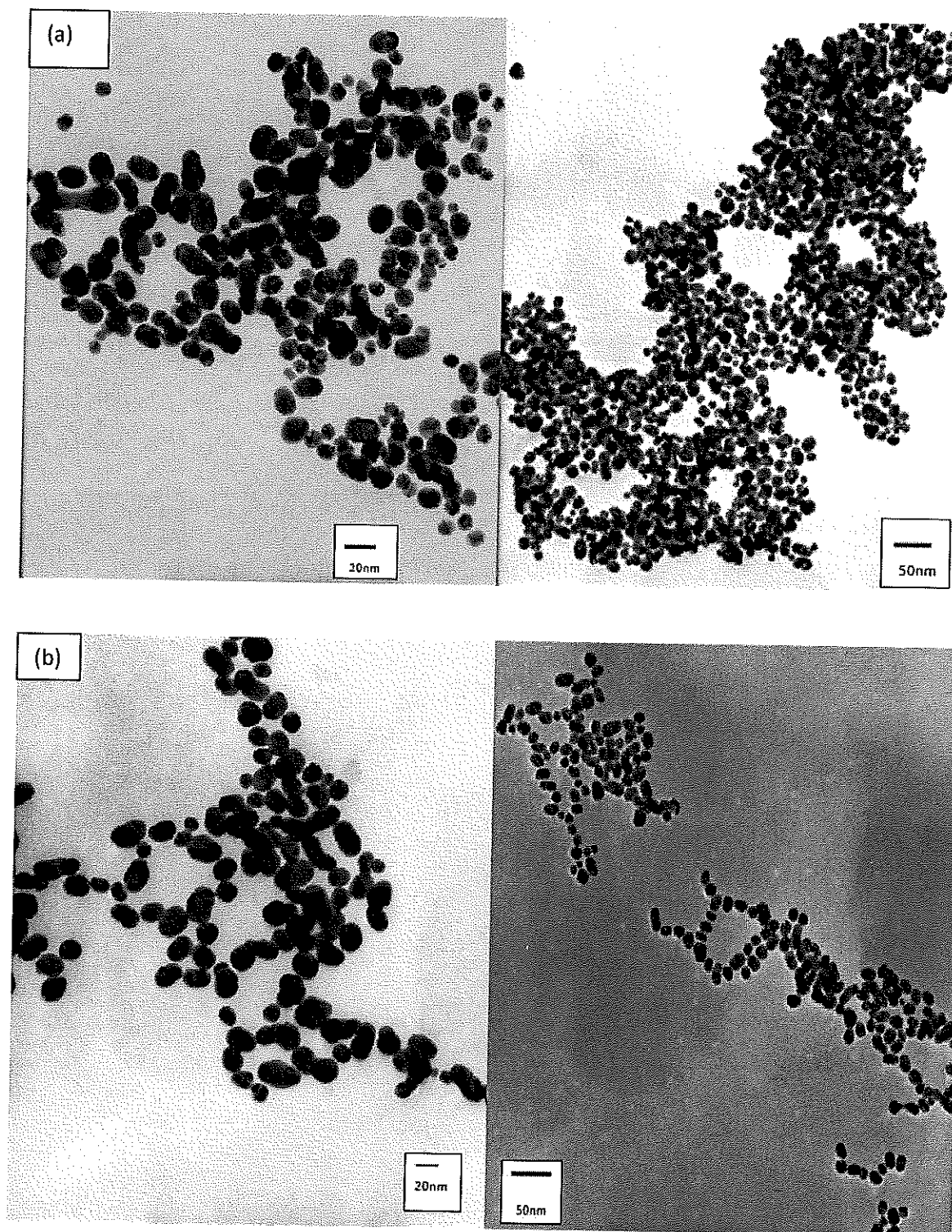


Figura 54. Micrografías de TEM de (a) AuCitCys 1:10:20 y (b) AuCitCys 1:10:30, con diferente amplificación.

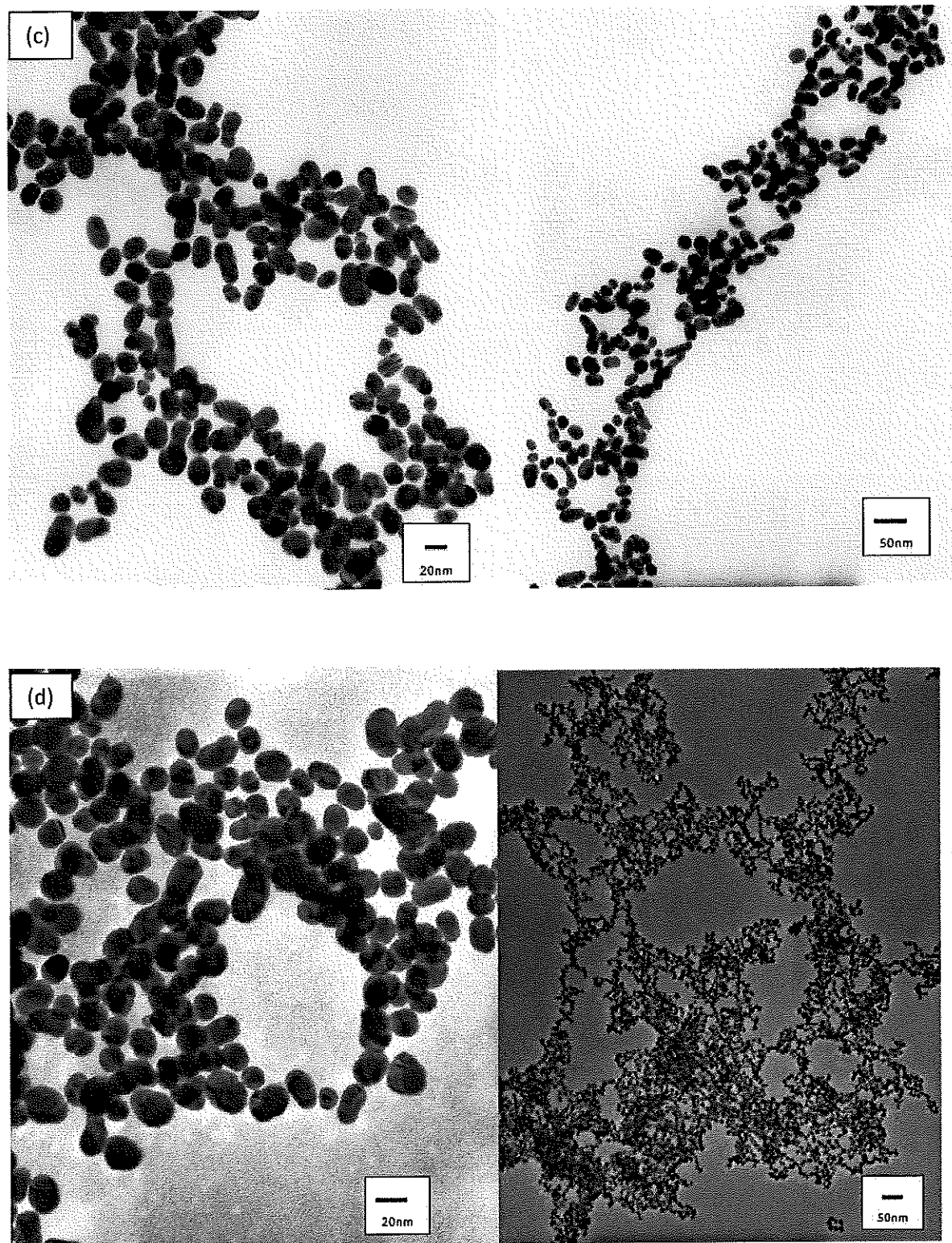


Figura 54. Micrografía de TEM de (c) AuCitCys 1:10:200 y (d) AuCitCys 1:10:300, con diferente amplificación.

## 4.9 Almacenaje en aire y selección de muestras con cinética

Durante cuatro semanas de llevó a cabo un monitoreo con espectroscopia UV-VIS. Se tomaron espectros al momento de síntesis y, después, uno por semana para observar los cambios en el coloide de oro con cisteína. Para la muestra con menor concentración molar que fue de  $20\mu\text{M}$  (Figura 55), se observa alta estabilidad a pasar del tiempo ya que su pico no presenta deformaciones, ni corrimientos a lo largo del tiempo del monitoreo, lo cual hace de este coloide un buen candidato para el suministro de fármacos que requieren almacenamiento prolongado.

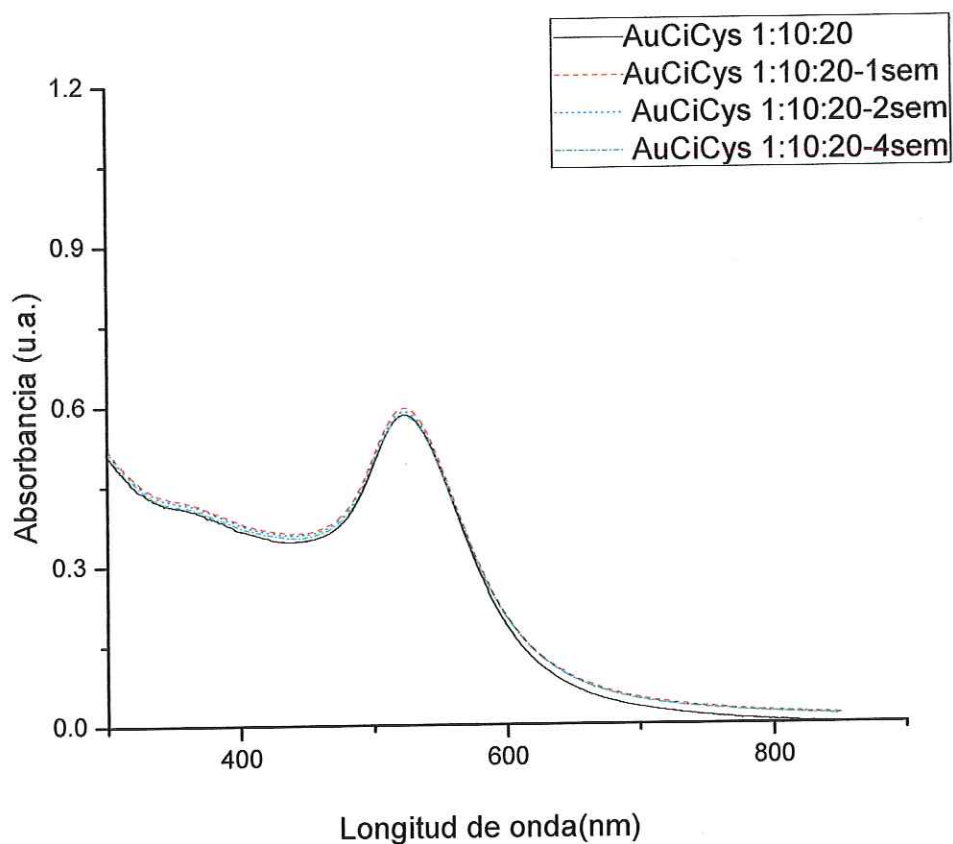


Figura 55. Espectro UV-VIS de muestra AuCiCys 1:10:20.

Al incrementar la cantidad de cisteína a  $30\mu\text{M}$  (Figura 56), durante la primera semana se observa la aparición de un segundo hombro, el cual va tomando forma e intensidad a lo largo de la tercera y cuarta semana de monitoreo. Se cree que esto es debido a que las cisteínas que se

encuentran enlazadas a una NP están estableciendo un puente con las cisteínas de otra NP, formando agregados y, por lo tanto, tenemos la presencia del segundo pico.

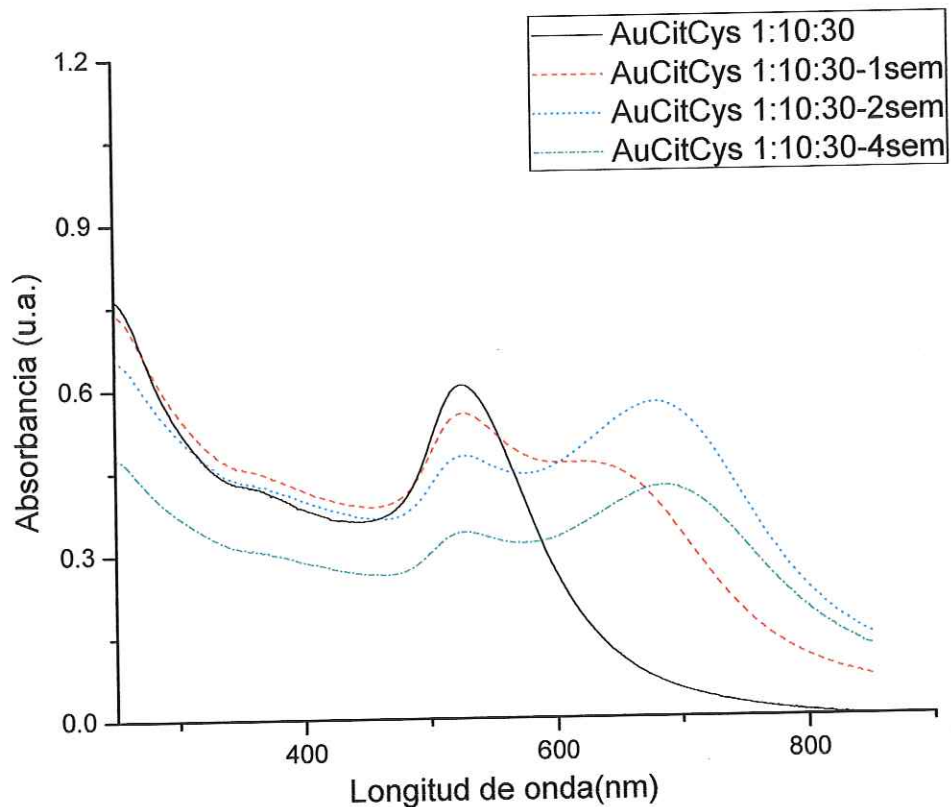


Figura 56. Espectro UV-VIS de muestra 1:10:30.

Continuando con el incremento de concentración de cisteína hasta llegar a los  $200\mu\text{M}$ , se repite la aparición y presencia del segundo hombro a través del monitoreo en el tiempo (Figura 58), acompañado por un decremento en los máximos de absorbancia y ensanchamiento en el pico original. Debido a la interacción de unas partículas influenciada por los enlaces de cisteína (Figura 57). Lo cual significa que este coloide tiene gran capacidad de anexas cualquier molécula que quiera utilizarse en forma de fármaco dirigido debido a su alta fuerza de enlace.

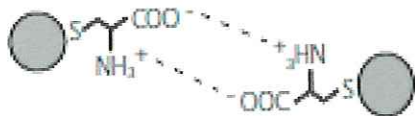


Figura 57. Enlaces nanopartículas debido a las moléculas de cisteínas.

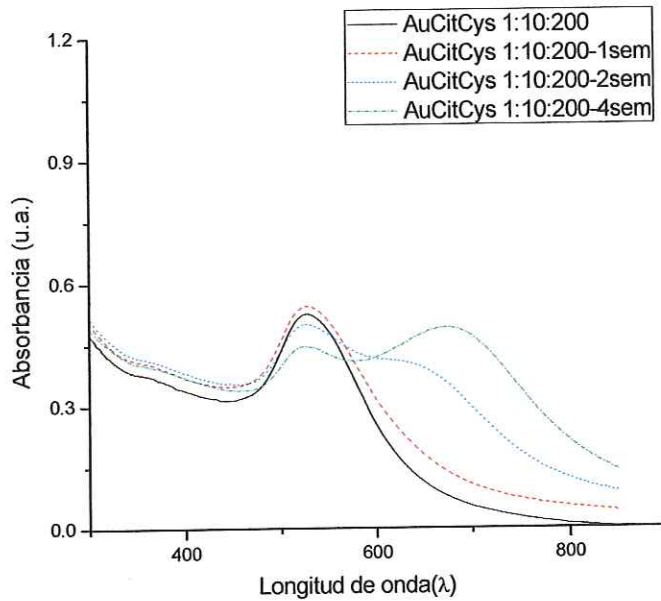


Figura 58. Espectro UV-VIS, de muestra 1:10:200.

Cuando se agregó el máximo de concentración de cisteína 300 $\mu$ M (Figura 59), ocurrió lo mismo con el tiempo. A la quinta semana, esta muestra presentó una desestabilización total observándose a simple ojo la pérdida del color del coloide y la floculación de partículas, lo cual se cree fue debido a una sobrecarga de moléculas de cisteína.

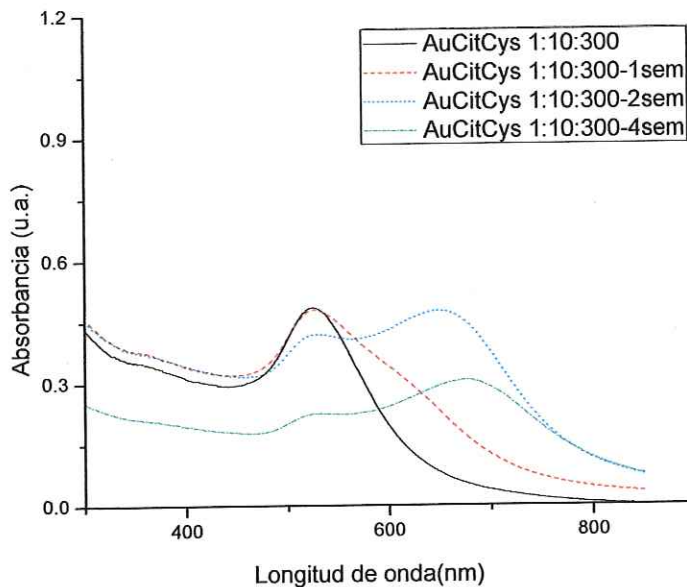


Figura 59. Espectro UV-VIS de muestra 1:10:300.

Durante cuatro semanas se le dio seguimiento a la cinética de las cuatro muestras seleccionadas por espectrofotometría UV-VIS. La muestra AuCitCys 1:10:20 (Figura 53) presentó una gran estabilidad ya que la deformación en los espectros tomados durante ese tiempo fue insignificante. Sin embargo, en el espectro UV-VIS de las muestras AuCitCys 1:10:30 (Figura 54), AuCitCys 1:10:200 (Figura 55) y AuCitCys 1:10:300 (Figura 58) se registró la aparición de nuevos picos en 682, 654 y 661 nm, respectivamente, lo cual puede ser característico de la agregación de las AuNPs como consecuencia de la atracción electrostática entre el grupo  $\text{NH}_4^+$  cargado positivamente y el grupo  $\text{COO}^-$  cargado negativamente a pH menores a 6. Este pico no aparece a pH  $\sim 10$ , ya que a este pH la repulsión de las cargas negativas mantienen a las AuNPs apartadas unas de otras<sup>21</sup>.

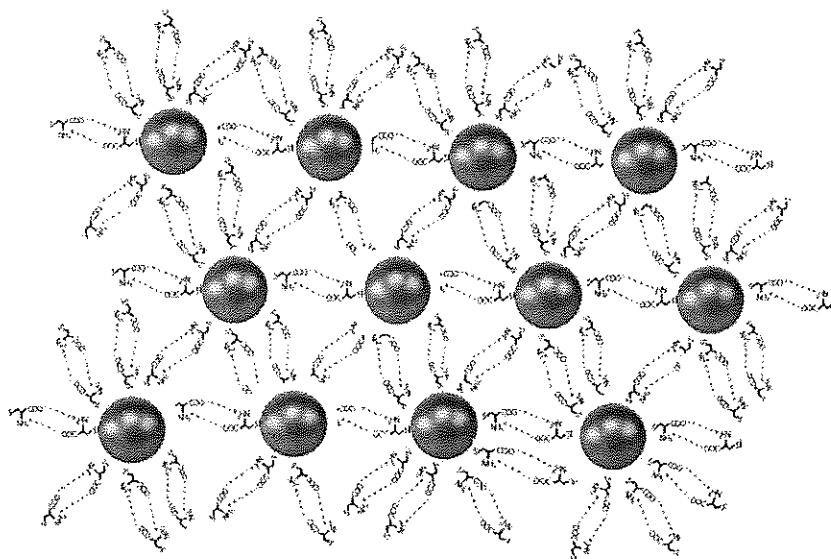


Figura 60. Aglomeración de AuNPs.

Alta tendencia adhesiva (Figura 60), lo cual tiende a formar aglomerados de muchas nanopartículas y lleva a que estas desestabilicen el coloide y sedimenten.

## 4.10 Carga del coloide por potencial Z

Los potenciales Z de las dispersiones de oro que contienen diferentes concentraciones de citrato de sodio y de las soluciones coloidales ya funcionalizadas se muestran en la Tabla 14. Los valores de potencial zeta varían de -27 a -52mV dentro de la serie de dispersiones oro sin funcionalizar y entre los -33 a -45mV en la serie ya funcionalizada. El potencial zeta nos da información de la estabilidad de las NPs; si las partículas tienen valores bajos de potencial zeta entonces no habrá ninguna fuerza para evitar que las partículas se unan y floculen. La línea divisoria entre suspensiones estables e inestables generalmente se toma en +30 ó -30 mV. Las partículas con un potencial zeta más positiva de 30 mV o negativo de más de -30 mV normalmente se consideran estables. Sin embargo, si las partículas tienen una densidad diferente a los dispersantes esta eventualmente se aglomeraran y precipitaran<sup>10</sup>.

**Tabla 14. Diámetro y carga neta del coloide medido por potencial Z**

Coloide de Au	Diámetro (nm)	Carga neta de NP (mV)
AuCit 1:1	29	-27
AuCit 1:3	22	-28
AuCit 1:10	27	-52
AuCit 1:20	28	-31

Coloide de Au Funcionalizado	Diámetro (nm)	Carga neta de NP (mV)
AuCitCys 1:10:20	29	-33
AuCitCys 1:10:30	39	-45
AuCitCys 1:10:200	30	-43
AuCitCys 1:10:300	38	-42

Conforme se aumenta la concentración de citrato de sodio se observa un incremento hacia el negativo en el potencial Z, llega a un máximo a la concentración de 10 mM, y vuelve a reducirse al pasar a la siguiente concentración a 20 mM.

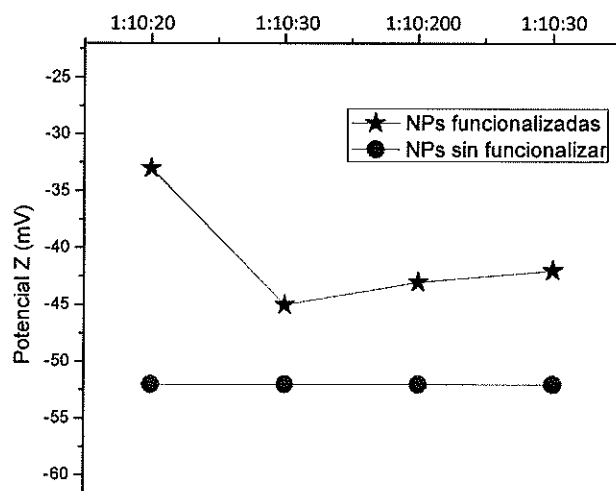


Figura 61. Cambios de potencial zeta al funcionalizar las AuNPs con cisteína.

Se observa que al agregar la cisteína se presenta un cambio de potencial Z. El coloide se hace menos negativo fluctuando desde -33 a -45 mV (Figura 61) cuando el coloide de oro sin funcionalizar tenía un potencial Z de -52mV. A pesar de todo, no se puede afirmar a partir de estas mediciones que la cisteína está funcionalizando las NPs totalmente. No obstante, comparando los resultados de UV-VIS en la formación de estos fractales y en el cambio de carga de las NPs, podemos sugerir que se obtuvo la funcionalización de éstas. Sin embargo, es necesario realizar experimentos variando la razón de pH.

En la literatura se han encontrado algunos estudios similares tanto para la síntesis (con citrato de sodio como reductor y estabilizador) como para la funcionalización de AuNPs (con cisteína)<sup>23</sup>. Sin embargo, las concentraciones del precursor de Au y reductor fueron menores a las utilizadas en este estudio. Dos estudios realizados por separado<sup>23,11</sup> reportaron síntesis de AuNPs con concentraciones de citrato de sodio (0.01 mM – 4 mM) distintas a las que se utilizaron en este estudio (0.5- 50 mM). En ambos estudios reportaron AuNPs esféricas, con diámetros de 6-30 nm<sup>23</sup>, y 25-50 nm<sup>24</sup>, que son comparables a los diámetros obtenidos en este estudio. Es importante mencionar que el estudio de cinética realizado fue sólo de minutos y las muestras presentaron una desestabilización muy rápida<sup>23</sup> a diferencia de nuestro trabajo en que presentaron estabilidad mayor a un 1 año.

En artículos donde se reporta la funcionalización de AuNPs con cisteína utilizan concentraciones de cisteína mayores (1, 10, 100 mM)<sup>25</sup>, (0.5mM)<sup>26</sup>, (0.4 y 150mM)<sup>23</sup> a las que utilizamos aquí (20-300  $\mu$ M). Las AuNPs descritas por estos autores presentan una estabilidad muy baja (< 1 hora)<sup>23,12</sup> y los estudios no toman en cuenta el parámetro de la estabilidad en el tiempo<sup>13,14</sup>. En el presente estudio se tomó en cuenta el parámetro de estabilidad para estudios de mecanismos de síntesis y funcionalización de AuNPs con la intención aplicar las AuNPs funcionalizadas en biomedicina.

## Referencias Capítulo 4

---

- <sup>1</sup> Directed Assembly of Gold Nanoparticles, F. Westerlund et al, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14 (2009) 126-134.
- <sup>2</sup> Tesis de Doctorado, Formation of Gold Nanoparticles in Zeolite Matrices, Inga Tuzovskaya, Universidad de Moscú, Moscú, Rusia, 18 de febrero de 2005.
- <sup>3</sup> Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Structure and Colloid Stability, J. Ralston et al, *Journal of Colloid and Interface* 331 (2009), 251-262.
- <sup>4</sup> Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, A. Plech et al, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 15700-15707.
- <sup>5</sup> Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra, W. Haiss *Anal. Chem.*, 79 (2007)11, 4215-4422.
- <sup>6</sup> Shape-Dependent Plasmon-Resonant Gold Nanoparticles C.J. Murphy et al, *Small* 2 (2006) 5, 636-639.
- <sup>7</sup> Growing and Stability of Gold Nanoparticles and their Functionalization by Cysteine, A. Majzik et al, *Gold Bulletin* 42 (2009)2, 113-123.
- <sup>8</sup> *Optical Properties of Metal Clusters*, U. Kreibitz et al, Springer-Verlag, Berlin (1995).
- <sup>9</sup> Tesis de Doctorado, Propiedades Magnéticas de Nanopartículas de Oro, Jose de la Venta Granda, Universidad Complutense de Madrid, España, (2009).
- <sup>10</sup> Zetasizer Nano series technical note MRK654-01, [www.malvern.co.uk](http://www.malvern.co.uk)
- <sup>11</sup> Gold Nanoparticle Synthesis and Characterization, A. Tabrizi et al, *Biol. & Chem.*, 37 (2009) 3, 217-226.
- <sup>12</sup> Self-Assembly Characterization of Gold Nanoparticles in the Presence of Cysteine, A. Mocanu et al, *Colloids and Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects*, 338 (2009), 93-101.
- <sup>13</sup> One-Step Synthesis of Cysteine-Coated Gold Nanoparticles in Aqueous Solution, Z. Ma et al, *Colloids and Surfaces A Physicochem. Eng. Aspects*, 317 (2008), 229-233.
- <sup>14</sup> Cysteine Mediated Assembly of Gold Nanoparticles, G. Petean et al, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 10 (2008)9, 2289-2292.

# Conclusiones



## 5. Conclusiones

1. En este trabajo se eligieron tres métodos de síntesis de AuNPs a partir de diez métodos analizados bibliográficamente. Estos métodos debían cumplir con características óptimas de simplicidad, economía y propiedades específicas de las AuNPs (morfología esférica, estabilidad a largo plazo y diámetro adecuado). El único método que cumplió con todas las características fue el método de síntesis por citrato.
2. Los resultados experimentales del presente trabajo, en los cuales se determinó la síntesis de AuNPs y su estabilidad por espectroscopia UV-Vis, su morfología esférica y diámetro de ~20 nm por TEM, nos permiten recomendar la preparación de AuNPs con citrato de sodio para la síntesis de nanotransportadores de fármacos.
3. El estudio de la influencia de la concentración de citrato de sodio en un intervalo de 0.5 - 50 mM en la síntesis de AuNPs y de 10-300  $\mu$ M de cisteína en la funcionalización de las AuNPs permitió identificar las regiones donde se observa una mayor estabilidad de las AuNPs preparadas, siendo la concentración óptima de 10 mM para el citrato durante la síntesis y 20  $\mu$ Mol para la cisteína en la funcionalización.
4. La estabilidad de AuNPs durante su almacenaje es un parámetro crítico para nanotransportadores. El análisis de literatura mostró que en la mayoría de los trabajos publicados la estabilidad de AuNPs (formadas por citrato de sodio y funcionalizadas con cisteína) es muy baja (minutos u horas) o simplemente no se menciona. En el presente trabajo se estudio la estabilidad de las AuNPs por UV-vis. Se logró producir AuNPs no funcionalizadas con una estabilidad mayor a 1 año y AuNPs funcionalizadas con estabilidad mayor a 6 meses.
5. Las características de AuNPs preparadas (morfología esférica, estables, fáciles de sintetizar, altamente reproducibles y económicas) en este trabajo son prometedoras para su aplicación como nanotransportadores.

Se propone como trabajo futuro realizar un estudio de la influencia de pH en la estabilidad de las AuNPs funcionalizadas, también se recomienda realizar un estudio a mayor detalle con el equipo potencial zeta

ya que las mediciones realizadas en este trabajo no consideran los cambios de pH y estos cambios pueden influir en el cambio de potencial de las AuNPs. Para ver la interacción del S-Au se recomienda utilizar la técnica de XPS, lo cual ya se hizo pero los resultados están en proceso de discusión. Una segunda etapa de este trabajo sería adjuntarle el fármaco a la AuNP funcionalizada y realizar pruebas en cultivos celulares, como etapa más avanzada para el desarrollo de fármacos se recomienda realizar vectorización de las AuNPs y probar con diferentes receptores biológicos. También es recomendable realizar pruebas de eficiencia comparado con otros nanotransportadores como: liposomas, cascarones de virus, miscelas etc.

