



**DISEÑO DE COMPOSITOS MULTIFUNCIONALES BASADOS EN
NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LANTÁNIDOS PARA APLICACIONES
BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**

Juan Pablo López Neira

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
SAN LUIS POTOSÍ (SLP)
2018**



**DISEÑO DE COMPOSITOS MULTIFUNCIONALES BASADOS EN
NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LANTÁNIDOS PARA APLICACIONES
BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**

Juan Pablo López Neira

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el grado de
Doctor en Ciencias Aplicadas
Nanociencia, Nanotecnología y Energías Alternativas-NNEA

Directores de Tesis:

Dr. José Juan Francisco Castillo Rivera

Instituto de Geología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí-UASLP

Dr. José Elías Pérez López

Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí-UASLP

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
SAN LUIS POTOSÍ (SLP)**

2018

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Polímeros del Instituto de Física,
Laboratorio de Ciencia Básica de la Facultad de Estomatología e Instituto de
Geología

Universidad Autónoma de San Luis Potosí-UASLP

<https://sites.google.com/site/nanogeoap/>



Acta No.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Copia Simple del Acta de Examen Previo de Grado de Doctorado del Posgrado en Nanociencia, Nanotecnología y energías Alternativas

Sustentado por: M.C López Neira Juan Pablo

En la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P el día Siete de Septiembre del Dos Mil Diecisiete

Reunidos en Jurado de Examen los Señores: Dr. Francisco Castillo Rivera, Dr. Elías Pérez López, Dr. Edgar López Luna, Dr. Gerardo Ortega Zarzosa, Dr. Esteban Cruz Hernández, Dr. Alejandro Reyes Coronado. Bajo el acuerdo del Posgrado y el Comité Académico del NNEA de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, donde el día 07/09/2017, se practicó el Examen Previo del Grado de Doctorado en Ciencias Aplicadas a: M.C Juan Pablo López Neira.

Derivado de la presentación, el jurado conviene en que se debe de atender lo siguiente: revisión con el comité de las observaciones antes del 25 de Septiembre 2017.

PRESIDENTE
Dr. Francisco Castillo Rivera

ASESORES
Dr. Francisco Castillo Rivera

Dr. José Elías Pérez López

SINODALES
Dr. Edgar López Luna

Dr. Gerardo Ortega Zarzosa

Dr. Esteban Cruz Hernández

Dr. Alejandro Reyes Coronado

(Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines)

Leída el acta anterior y habiendo hecho las observaciones que consideró oportunas el jurado, el sustentante acepta las responsabilidades de atenderlas y queda sujeta a su cumplimiento o la programación de su Defensas de Examen Final

Sub- Coordinador de Área de NNEA
Dr. Victor Hugo Méndez García



**DISEÑO DE COMPOSITOS MULTIFUNCIONALES BASADOS EN
NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LANTÁNIDOS PARA APLICACIONES
BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS**

Asesores:

Dr. Francisco Castillo Rivera.
Instituto de Geología, UASLP
Asesor

Dr. José Elías Pérez López.
Instituto de Física, UASLP
Co-asesor

Sinodales:

Dr. Edgar López Luna.
(CIACYT), UASLP
Sinodal

Dr. Esteban Cruz Hernández.
(CIACYT), UASLP
Sinodal

Dr. Gerardo Ortega Zarzosa.
Facultad de Ciencias, UASLP
Sinodal

Dr. Alejandro Reyes Coronado.
Facultad de Ciencias, UNAM
Sinodal Externo

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Conacyt

Beca No 322911

Por la orientación, seguimiento, sugerencias y valiosas contribuciones para el desarrollo del presente trabajo:

Dr. Francisco Castillo Rivera.
Instituto de Geología, UASLP
Asesor

Dr. José Elías Pérez López.
Instituto de Física, UASLP
Co-asesor

Dr. Edgar López Luna.
Coordinación para la Innovación y
Aplicaciones de la Ciencia y la
Tecnología (CIACYT), UASLP
Sinodal

Dr. Esteban Cruz Hernández.
Coordinación para la Innovación y
Aplicaciones de la Ciencia y la
Tecnología (CIACYT), UASLP
Sinodal

Dr. Gerardo Ortega Zarzosa.
Facultad de Ciencias, UASLP
Sinodal

Dr. Alejandro Reyes Coronado.
Departamento de Física
Facultad de Ciencias, UNAM
Sinodal Externo

Por el apoyo para llevar a cabo este trabajo:

- Dr. Alejandro Reyes Coronado (FC, UNAM), por su contribución a la aproximación del cálculo numérico del campo eléctrico generado por los nanomateriales.
- Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillén, por el préstamo del espectrofotómetro UV-Vis para las medidas de absorción y las instalaciones del Laboratorio de Ciencias, Facultad de estomatología (UASLP).
- Dr. Héctor Flores, por el apoyo y facilitar el trabajo en el Laboratorio de Ciencias-UASLP.
- Dra. Diana María Escobar García (Lab. Ciencia Básica, UASLP), por el apoyo en las pruebas celulares y facilitar material de laboratorio.
- Dr. Francisco Javier González (CIACYT), por las sesiones de SEM, el préstamo de las cámaras IR y el potenciómetro.
- Dra. Socoro Oros (Dep. Qca., UAM), por el apoyo en las mediciones fotocatalíticas.
- Dr. Ángel Gabriel (CIACYT), por préstamo del láser de 532 nm y adquisición de espectros IR y Raman.
- Dr. Manuel Gutiérrez (CIACYT), por mediciones de microscopía SEM y toma de imágenes IR.
- M.C. José Mario Galicia (FC, UNAM), por su contribución al cálculo numérico del campo eléctrico generado por los materiales.
- M.C. Sebastián Chiwo (CIACYT), colaboración con el uso del diodo laser IR y mediciones de fotografías IR.
- M.C. Rodrigo Cabrera (CIACYT), colaboración en mediciones de imágenes IR.
- M.C. Javier Méndez (CIACYT), por mediciones de microscopía SEM.
- M.C. Yolanda Reboloso (IF-UASLP), por el préstamo de centrífuga y material de laboratorio.
- M.C. Ma. Lourdes González González (IF-UASLP), por facilitar reactivos químicos y material de laboratorio.
- M.C. Claudia Elías Alfaro e Ing. Fernando Rodríguez Juárez del Instituto de Metalurgia-UASLP por las medidas de microscopía electrónica de transmisión (MET).
- M.C. Beatriz A. Rivera Escoto (IPICYT), por la toma de los DRX.
- Dr. Héctor Gabriel Silva Pereyra (IPICYT), por la toma de las imágenes TEM de alta resolución y EDX.
- Dra. Gladis Judith Labrada Delgado (IPICYT), por la toma de micrografías SEM.
- A todos los doctores, administrativos, estudiantes y personal del instituto de Geología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por brindarme un espacio y apoyo para la escritura de esta tesis.

Productos de Divulgación Científica Generados Durante la Realización de la Tesis:

Artículos:

- Surface Enhanced Raman Scattering of Amino Acids Assisted by Gold Nanoparticles and Gd^{3+} Ions; J. P. López-Neira, J. M. Galicia-Hernández, A. Reyes-Coronado, E. Pérez and F. Castillo-Rivera. *J. Phys. Chem. A*, **2015**, 119 (18), pp 4127–4135.
- Multifunctional Composites Based on Gold Nanoparticles and Lanthanides for Therapy Photothermal Applications, J. P. López-Neira, D. M. Escobar-García, H. Flores, J.-M. Gutiérrez-Hernández, E. Pérez and F. Castillo-Rivera. Artículo en borrador y próximo para proceso de envío.

Poster:

- Diseño de Compositos Multifuncionales Basados en NPsM y Lantánidos para Aplicaciones Biológicas y Biomédicas. Concurso de exhibición de carteles proyectos de investigación, 26 Sep/**2016**, UASL-México.
- Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Amino Acids Assisted by Gold Nanoparticles and Gd^{3+} Ions. Concurso de exhibición de carteles proyectos de investigación, 4 Dic/**2015**, UASL-México.

Seminarios:

- Diseño de Compositos Multifuncionales Basados en NPsM y Lantánidos para Aplicaciones Biológicas y Biomédicas. Seminario de estudiantes de Física Estadística, Instituto de Física-UASLP, 5 Mayo/**2014**, México.

□Λα χιενχια σε χομπονε δε ερρορεσ, θυε α συ πεζ στον λοσ πασοσ ηαχια λα περδα
δ□ θυλιο ζερνε

Δεδιχαδο

- ✓ Α μι Φαμιλια πρινχιπαλμεντε, μισ παδρεσ Γρατινιανο Λ (πεζ ψ Αψλεν Νειρ α θυιενεσ φορμαρον χον μυχηο εσφυερζο ψ δεδιχαχι (ν (αυνθυε ψο χολαβορε) λα περσονα θυε σοψ. Γραχιασ πορ λα χονφιανζα ψ ελ αποψο ινχονδιχιο ναλ.
- ✓ Α μισ δοσ ηερμανασ Διανα Μαρ(α ψ Ροχιο θοηαννα πορ χρεερ εν μι ψ απο ψαρ μισ δεχισιονεσ, ψ α μι σοβρινα Μαρ(α Παυλα πορ δαρ λυζ ψ αλεγρια α λα χασα.
- ✓ Α Μαρ(α Ισαβελ πορ σερ υν πιλαρ ιμπορταντε ψ υνα ραζ (ν παρα σεγυιρ α δελαντε, υνα μυφερ θυε με-ρεχε τοδο μι ρεσπετο ψ αδμιραχι (ν.
- ✓ Α Ωιλλιαμ θαιμεσ (Ινγ.), υνα αμισταδ υε περδυρα δεσδε λα νι)εζ ψ σε φορτ αλεχε χον λοσ α)οσ. γραχιασ πορ μαντενερ πιπο μι εσπ(ριτυ εν λασ αχτιπ ιδαδεσ θυε σολ(αμοσ χομπαρτιρ.
- ✓ Α ζιχτορια Γονζ(λεζ, ταρδεσ δε χομιδα ψ χηαρλασ θυε αμενιζαβαν λασ α ρδυασ φορναδασ δε τρα-βαφο.□
- ✓ Α τοδοσ μισ αμιγοσ δε λα ρεχοχηα δε λοσ σ(βαδοσ εν μ(θυεριδα Πιεδεχυεσ τα, ρατοσ δε οχιο θυε σε εξτρα)αν α λα διστανχια.
- ✓ Α εστε ηερμοσο πα(σ ψ τοδασ λασ εξχελεντεσ περσονασ θυε ελ δεστινο με λλεπο α χονοχερ, μυχηοσ αμιγοσ, λυγαρεσ ψ γρατοσ ρεχυερδοσ ιμποσιβλε σ δε ολπιδαρ.

Resumen

Título

DISEÑO DE COMPOSITOS MULTIFUNCIONALES BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE ORO Y LANTÁNIDOS PARA APLICACIONES BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS*.

Estudiante de Doctorado, Posgrado Ciencias Aplicadas

López-Neira, Juan Pablo

Asesores

Castillo-Rivera, Francisco; Pérez-López, Elías

Palabras Clave

NANOPARTÍCULAS DE ORO, LANTÁNIDOS, COMPOSITOS MULTIFUNCIONALES, FOTOTERMIA, SERS.

Descripción

En el presente trabajo, los lectores podrán encontrar la metodología para el diseño y la síntesis de materiales híbridos compuestos por nanopartículas oro (NPsAu) decoradas con iones lantánidos (Ln^{+3} = Eu o Gd) que fueron evaluados en aplicaciones multifuncionales. La fabricación de dichos materiales se basa en el uso de una molécula de anclaje (aminoácido) o un recubrimiento de sílice entre las nanopartículas metálicas (oro) y los iones lantánidos. El núcleo metálico le infiere al sistema propiedades ópticas y electrónicas inusuales y los iones lantánidos le brindan a los materiales propiedades luminiscentes o magnéticas (Eu o Gd). Los materiales que presentan el aminoácido (L-tyr) son usados como sustratos SERS para realce de señales de moléculas biológicas debido a que la conformación del sistema incrementa el campo eléctrico cercano, desafortunadamente su poca estabilidad limita su uso en las demás aplicaciones multifuncionales. Los materiales conformados con el recubrimiento de sílice presentan biocompatibilidad y estabilidad en soluciones acuosas, además dicho recubrimiento no disminuye drásticamente las propiedades de adsorción del oro. La combinación de estos materiales (NPsAu y Ln) los hace potenciales candidatos a ser usados en múltiples aplicaciones que van desde sensado, herramienta de diagnóstico y detección de enfermedades, marcadores en sistemas biológicos, formadores de bio-imágenes, terapias fototérmicas y contraste de imágenes por resonancia magnética y rayos X. En el presente trabajo se proponen compositos de $\text{NPsAu}@SiO_2:\text{Ln}$ como materiales multifuncionales y se evalúan en realce de señales Raman (SERS) de moléculas biológicas, fototermia y fotocatalisis.

*Tesis de Doctorado, doctorado en ciencias aplicadas

Abstract

Title

DESIGN OF MULTIFUNCTIONAL COMPOSITES BASED ON GOLD NANOPARTICLES AND LANTHANIDES FOR BIOLOGICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*.

Ph.D. Student, Postgraduate Applied Science

López Neira, Juan Pablo

Advisers Doctors, UASLP

Castillo-Rivera, Francisco; Pérez-López, Elías

Key Words

GOLD NANOPARTICLES, LANTHANIDES, MULTIFUNCTIONAL COMPOSITES, PHOTOTHERMAL, SERS.

Description

In this work, readers will be able to find the methodology for design and synthesis of hybrid materials based on gold nanoparticles coated decorated with lanthanide ions that were evaluated in multifunctional applications. The manufacture of these materials is based on the use of an anchor molecule (amino acid) or a silica coating between the metal nanoparticles (gold) and the lanthanide ions. A metallic core infers to the system unusual optical and electronic properties and lanthanide ions provide materials with luminescent or magnetic properties (Eu or Gd). The materials that present the amino acid (L-tyr) are used as substrates SERS for signal enhancement of biological molecules because the conformation of the system increases the near electric field, unfortunately, its low stability limits its use in the other multifunctional applications. The materials formed with the silicon oxide coating exhibit biocompatibility and stability in aqueous solutions, furthermore said coating does not drastically decrease the gold adsorption properties. The combination of these materials makes them potential candidates for use in many applications ranging from sensing, diagnostic tool and detection of disease markers in biological systems, forming bioimaging, photothermal therapy and contrast MRI and X-ray. We propose the $NpM@SiO_2:Ln$ systems as multifunctional materials and evaluate them in surface enhancement Raman scattering (SERS) signal of biological molecules, photothermia, and photocatalysis.

*Graduate Work, Doctor of applied sciences

<u>Índice</u>	<u>Página</u>
Abreviaturas	1
Listado de Figuras	3
Listado de Tablas	7
1. Capítulo 0: Introducción y Antecedentes	VIII
Introducción	VIII
Antecedentes	X
2. Capítulo I: Primer Sistema Multifuncional Propuesto	18
1.1. Síntesis de Nanopartículas de Oro	18
1.2. Funcionalización de NpsAu con L-Tirosina	19
1.3. Formación de Híbridos de Au-AA-Ln	20
1.4. Cálculo numérico para nanopartículas de oro y sistemas híbridos	20
1.5. Caracterización de los híbridos	21
1.6. Análisis y discusión de resultados	21
3. Capítulo II: Hipótesis, Justificación y Objetivos	33
2.1. Hipótesis	33
2.2. Justificación	34
2.3. Objetivo General	35
2.4. Objetivos Específicos	35
2.5. Esquema General y Alcance del Proyecto	36
4. Capítulo III: Metodología	37
3.1. Materiales y Reactivos	37
3.2. Metodología	38
3.3. Síntesis de los Nanomateriales	39
3.3.1. Síntesis de nanopartículas esféricas de oro	39
3.3.2. Recubrimiento de nanopartículas metálicas con SiO ₂ (NPsM@SiO ₂)	39
3.3.3. Síntesis de compositos de NPsM@SiO ₂ decorados con lantánidos	42
3.4. Caracterización de los Materiales	43
3.5. Evaluación y Aplicaciones de los Nanocompositos	44

Índice

3.5.1. Ensayo de biocompatibilidad in vitro	44
3.5.2. Prueba de fototerapia en células	44
3.5.3. Evaluación de sustratos SERS en L-Cisteína como molécula modelo	45
3.5.4. Evaluación Fotocatalítica de los materiales para la reducción de metano	46
5. Capítulo IV: Análisis y Discusión de Resultados	48
4.1. Espectroscopia de Absorción UV-Vis y Plasmón de Resonancia de los Sistemas	48
4.2. Morfología y Tamaño de los Nanomateriales por DLS, TEM y SEM	52
4.3. Estructura de los Sistemas de NPsAu@SiO ₂ :Eu	62
4.3.1. FT-IR de los nanocompositos	62
4.3.2. Patrones de difracción de rayos X de los sistemas	63
4.4. Biocompatibilidad de Nanocompositos en Osteoblastos, Ensayos In Vitro	67
5. Capítulo V: Aplicaciones	74
5.1. Realce de Señales Raman de L-Cisteína Usando Nanocompositos Como Sustratos SERS	74
5.2. Prueba de Fototerapia de Nanocompositos Sobre Osteoblastos, Pruebas In Vitro	80
5.3. Fotocatálisis para la Descomposición de Metanol y Producción de Hidrógeno	87
6. Conclusiones	93

Listado de Abreviaturas

(3-AminoPropil) TriEtoxiSilano	APTES
Boundary Element Method	BEM
Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	CTAB
Coefficiente de Absortividad Molar	ϵ
Compositos de Nanopartículas metálicas y SiO ₂ decorados con Iones Lantánidos	NPsM@SiO ₂ :Ln
Densidad	ρ
Diámetro	D
Dynamic Light Scattering	DLS
Eficiencia	Q
Electrón banda de valencia semiconductor	e_{bc}^-
Elementos Lantánidos	Ln
Energy Dispersive X-Ray	EDX
Escala Logarítmica de Concentración de Iones hidronio	pH
Etanol	EtOH
Etilo	CH ₃ CH ₂
Flexión	d
Fourier Transform Infrared	FT-IR
Grupo amino	NH ₂
Hidroxilo	OH
Hueco banda de valencia semiconductor	h_{bv}^+
Imágenes por Rayos X	iRX
Imágenes por Resonancia Magnética Nuclear	iRMN
Índice de refracción	n
InfrarRojo	IR
Ion Carboxilo	COO ⁻
Joint Committee on Powder Diffraction Standards	JCPDS
L-Cisteína	L-Cys
Localized Surface Plasmon Resonance	LSPR

L-tirosina	L-Tyr
Molaridad	M
Nanopartículas de Oro	NPsAu
Nanopartículas de Plata	NPsAg
Nanopartículas Metálicas	NPsM
Numero de Avogadro	N_A
Peso Atómico	P_A
Phosphate Buffer Solution	PBS
Polivinil Alcohol	PVA
Polivinil pirrolidona	PVP
Porcentaje peso a peso	% p/p
Radical Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Radical libre o radical	\cdot
Radical Superóxido	$\text{O}_2^- \cdot$
Rayos X	RX
Revoluciones Por Minuto	RPM
Scanning Electron Microscope	SEM
Sección Transversal de Dispersión	C_{scatt}
Silicato	$(\text{SiO}_3)^{2-}$
Sistemas Núcleo-Recubrimiento Nanopartículas Metálicas con SiO_2	$\text{NPsM}@ \text{SiO}_2$
Surface Enhancent Raman Scattering	SERS
Temperatura	Δ
Tensión Asimétrica	u_a
Tensión Simétrica	u_s
TetraEtil OrtoSilicato	TEOS
Tiol	SH
Transmission Electron Microscope	TEM
Ultravioleta	UV
UltraVioleta Visible	UV-Vis

Listado de Figuras

Figura	Pie de Figura	Página
1	Esquema de la formación del dipolo inducido en nanopartículas de oro y origen de la resonancia plasmónica	X
2	Realce de señales Raman de L-tirosina por inclusión de Ion Gadolinio en sistemas multifuncionales NPsAu-Tyr-Gd	XI
1.1	Reacción química para la síntesis de NPsAu por reducción con borohidruro de sodio	18
1.2	Interacciones electrostáticas y estabilidad coloidal de NPsAu con AA y NPAu-AA entre sí	19
1.3	Metodología para formación de los sistemas híbridos Au-Tyr-Gd	20
1.4	Espectro de absorción experimental de NPsAu con plasmón de resonancia en 525 nm (a) y eficiencia de absorción calculada para una partícula de oro embebida en agua de radio 3.75 nm (b)	22
1.5	Imagen TEM de NPsAu con radio 3.75 ± 0.8 nm (a) y distribución de tamaños de NPsAu sintetizadas (b)	23
1.6	Espectros de absorción de NPsAu (a) y potencial zeta (b) en un rango de pH de 4-9	23
1.7	Eficiencia de dispersión (CScat) en función de la λ calculada para una NPsAu de radio 3.75 nm dispersa en agua y gráfica de la magnitud del cuadrado del campo eléctrico cercano para la misma NPAu	24
1.8	Espectro de absorción UV-Vis de sistemas Au-Tyr-Gd a pH 5.6 (a) y distribución de tamaño de partícula (b)	26
1.9	Espectros de RMN para ^1H NMR de L-tyr pura en agua deuterada (a) y sistema híbrido Au-Tyr-Gd en agua deuterada (b)	26
1.10	Espectro SERS de L-tirosina adsorbida sobre nanopartículas de oro (a) y SERS de L-tirosina asistido por NPsAu e iones Gd (b)	28
1.11	Espectro de la sección transversal de dispersión calculado para 3 sistemas (a Au-Gd, b Au-Au y c Au Gd Au), inmersos en agua. El radio de las partículas de	

	oro es 3.75 nm, el diámetro de los iones Gd 0.22 nm y la distancia de separación es 0.5 nm	29
2.1	Esquema general del proyecto y su alcance	36
3.1	Esquema general de la metodología en 3 etapas para la síntesis de NPsM@SiO ₂ :Ln	38
3.2	Reducción del ácido tetracloroaurico en presencia de citrato de sodio para la formación de NPsAu	39
3.3	Generación del recubrimiento de SiO ₂ sobre nanopartículas de oro e imagen del montaje utilizado	40
3.4	Imágenes de los sistemas usados para realizar las evaluaciones fototérmicas	45
3.5	Preparación de sustratos SERS para realce de señales en espectroscopia Raman	46
4.1	Espectros de absorción UV-Vis de NPsAu, Au@SiO ₂ y Au@SiO ₂ :Eu	48
4.2	Representación del medio de refracción de los sistemas dispersos en solución acuosa	49
4.3	Espectros de absorción UV-Vis de NPsAu a diferentes concentraciones (Der.) y curva de calibración en función de la absorbancia (Izq)	51
4.4	Micrografías TEM y distribución de tamaños de los sistemas NPsAu, sílice y NPsAu@SiO ₂	53
4.5	Micrografías TEM de los sistemas de NPsAu recubiertas con sílice de forma directa o mediante funcionalización de la superficie	55
4.6	Estructura química de moléculas usadas para funcionalizar las NPsAu	56
4.7	Esquema de conformación para NPsAu funcionalizadas con APTES y recubiertas con sílice	57
4.8	Disminución del diámetro de NPsAu@SiO ₂ en función de la concentración de TEOS	57
4.9	Micrografías de sílice libre separada de los sistemas NPsAu@SiO ₂ por centrifugación	58
4.10	Micrografías de los sistemas de NPsAu@SiO ₂ separadas por centrifugación	59
4.11	Micrografías para el sistema de NPsAu@SiO ₂ :Eu sin tratamiento térmico (Izq) y después de calcinar a 600 °C (Cent. y Der.)	60

4.12	EDX y micrografía de transmisión de alta resolución para el sistema NPsAu@SiO ₂ :Eu	61
4.13	Espectros de Absorción FT-IR de sílice y NPsAu recubiertas con sílice	62
4.14	Patrones de difracción de Rayos X de sílice tratada térmicamente a 110 y 600 °C, y de NPsAu secadas a 110 °C	64
4.15	Patrones de difracción de los sistemas NPsAu@SiO ₂ y NPsAu@SiO ₂ :Eu secados a 110 °C	65
4.16	Patrón de difracción de rayos X para la muestra de NPsAu@SiO ₂ :Eu tratada térmicamente a 600 °C	66
4.17	Imágenes de osteoblastos en presencia de NPAu y NPAu@SiO ₂ tomadas en un microscopio óptico	68
4.18	Micrografías SEM de osteoblastos incubados 24 H con NPsAu, NPsAu@SiO ₂ y NPsAu@SiO ₂ :Eu	69
4.19	Viabilidad de osteoblastos en sistemas de NPsAu@SiO ₂ :Eu	70
5.1	Espectro Raman de la L-cisteína en polvo	75
5.2	Esquema del sustrato SERS de nanocompositos de NPsAu@SiO ₂ :Eu	76
5.3	Espectros Raman de L-Cys (10 ⁻⁵ M) en ausencia y presencia de NPAu@SiO ₂ :Eu	77
5.4	Magnitud del cuadrado del campo eléctrico dispersado alrededor de una NPsAu y de una NPsAu recubierta con sílice con un espesor de 0.5 y 1.25 nm	78
5.5	Sección transversal (C_{scatt}) y magnitud del campo eléctrico (E_{scatt}) para dímeros de NPsAu con un espesor de 0.5 nm y una distancia de separación entre partículas de 0.25-0.75 nm	79
5.6	Evaluación fototérmica de nanomateriales irradiados con luz verde (20mW) en presencia de osteoblastos	81
5.7	Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un láser verde (532 nm) de potencia 20 mW	83
5.8	Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un láser verde (532 nm) de potencia 400 mW	85
5.9	Incrementos de temperatura en función del tiempo de sistemas de NPsAu dispersas en medio de cultivo irradiadas con láser verde de 20 y 400 mW	85

5.10	Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un diodo láser IR (785 nm) de potencia 135 mW	86
5.11	Moles de hidrogeno gaseoso en función del tiempo de reacción para la degradación fotocatalítica de metanol usando NPsAu@SiO ₂ :Eu	88
5.12	Mecanismo de acción fotocatalítica de sistemas de NPsAu@SiO ₂	89

Listado de Tablas

Tabla	Pie de Tabla	Pagina
1.1	Porcentajes de L-Tyr adsorbida sobre la superficie de las NPsAu a diferentes valores de pH	25
3.1	Distribución del contenido de las cajas de crecimiento celular	44
4.1	Comparación entre los diferentes tamaños de partícula obtenidos por DLS, SEM o TEM	52
4.2	Citotoxicidad de nanomateriales en osteoblastos porcentaje de mortandad	71
5.1	Porcentaje de osteoblastos muertos por hipertermia para los sistemas de NPsAu, NPsAuSiO ₂ :Eu	82

CAPÍTULO 0: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Introducción

En el presente trabajo, proponemos el diseño de sistemas multifuncionales conformados de un núcleo metálico de nanopartículas de oro, de morfología esférica, en el cual incorporamos iones lantánidos (Eu o Gd) ya sea mediante el uso de un aminoácido como molécula de anclaje (tirosina) o mediante una delgada capa de sílice como matriz que soporte los iones.

Sistemas similares a los composites de nanopartículas de oro-lantánidos (NPsAu-Ln) usando macromoléculas como mecanismos de anclaje han sido reportados y usados en diversas aplicaciones de tipo biológico. Tales sistemas usan moléculas orgánicas complejas que se coordinan a los metales (Tipo DTPA¹, EDTA¹, etc.), polímeros (Poliectrolitos) o aminoácidos (Trabajo Maestría) como intermediarios entre las partículas metálicas y los lantánidos. En estos trabajos se aprovecha la naturaleza eléctrica de la superficie de las NPsAu¹ y las propiedades ácido-base de sus intermediarios para generar los sistemas NPsAu-Ln¹.

Inicialmente nanocompositos con L-tirosina como molécula de anclaje fueron propuestos como sistemas multifuncionales y se aplicaron al realce de señales Raman² tal como se presentará en el capítulo 1, el principal inconveniente de dichos sistemas es que limita la detección a otras moléculas debido al ruido que genera las señales propias de la L-tirosina. Además, el ion lantánido está coordinado al grupo carboxilo del aminoácido por lo cual la estabilidad coloidal disminuye y puede ser susceptible de ser desplazado por otros iones más afines, por lo cual la estabilidad del material está sujeta a las especies presentes en el medio.

¹Ver abreviaturas pp 1-2

²*J. Phys. Chem. A* **2015**, 119, 4127

Capítulo 0

Un segundo grupo de materiales son los que presentan una estructura tipo núcleo-recubrimiento, donde las nanopartículas de oro que conforman el núcleo son sintetizadas por el método de reducción con citrato de sodio y el recubrimiento de SiO_2 se realiza mediante una modificación del proceso de Stöber, teniendo control de algunos de los parámetros de reacción como concentración de precursor y velocidad de adición, para regular la formación y dimensiones del recubrimiento. Mientras que la incorporación de los iones lantánidos (europio o gadolinio) se realizó en forma simultánea a la formación de la sílice, considerando así la inclusión de los iones a toda la matriz del óxido de silicio.

El uso de nanopartículas metálicas tiene gran interés debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas, etc. Estas propiedades dependen del tamaño, forma y medio de dispersión donde se encuentren, que pueden ser controladas a partir del método de síntesis. Dentro de los parámetros que influyen en la morfología de las nanopartículas se encuentran la elección del agente reductor, cantidades relativas y concentraciones de reactivos, temperatura y tiempo de reacción. Principalmente, nanopartículas esféricas son ampliamente usadas en realce de señales Raman de biomoléculas y para tratamientos en terapias fototérmicas.

Uno de los principales inconvenientes en el uso de sistemas conformados por nanopartículas metálicas (NPsM), es su baja estabilidad coloidal en medios acuosos que se encuentran a pH fisiológicos y que dificultan su uso en ciertas aplicaciones de tipo biológico. Un recubrimiento de óxido de silicio en las nanopartículas metálicas puede brindarle al sistema mayor estabilidad no sólo en medios acuosos, además su superficie nos permite funcionalizar, decorar e incluso dopar con iones lantánidos, brindándole al material propiedades adicionales.

Actualmente los iones lantánidos son ampliamente usados e incorporados en numerosos compuestos por sus propiedades magnéticas y luminiscentes. Como ya mencionamos, la superficie de la matriz de SiO_2 puede ser fácilmente modificable. Es por esto que la incorporación de iones lantánidos puede proporcionarle al sistema una propiedad adicional.

Por todo lo anterior, el intermediario entre la nanopartícula metálica y los iones lantánidos fue cambiado por un recubrimiento de sílice que cumpla con la misma función del aminoácido pero que no interfiera en las posibles aplicaciones y que le brinde mayor estabilidad. Dentro de las muchas áreas en las que en principio se podrían aplicar los nanomateriales propuestos, en este trabajo se presentó el diseño de compositos multifuncionales y se evaluó los sistemas como sustratos para realizar realce de señales Raman de un aminoácido (pero se puede extender a otras moléculas biológicas: péptidos, oligómeros, proteínas, etc), agentes para el tratamiento en terapia fototérmica y como fotocatalizadores en una reacción para la producción de hidrógeno.

Antecedentes

El uso de nanopartículas metálicas principalmente de oro y plata para aplicaciones en terapia fototérmica, así como realce de señales Raman (SERS) de moléculas biológicas y detección de células, contraste de imágenes por resonancia magnética y rayos X, marcadores biológicos y liberación de fármacos, se basa principalmente en las propiedades ópticas y electrónicas de las nanopartículas metálicas. La oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción de las nanopartículas metálicas inducida por el campo electromagnético se conoce como plasmónes de superficie, y es una consecuencia de la densidad electrónica y su confinamiento, ya que están ausentes tanto en un átomo como en los materiales en bulto [1-2, Ver Figura 1].

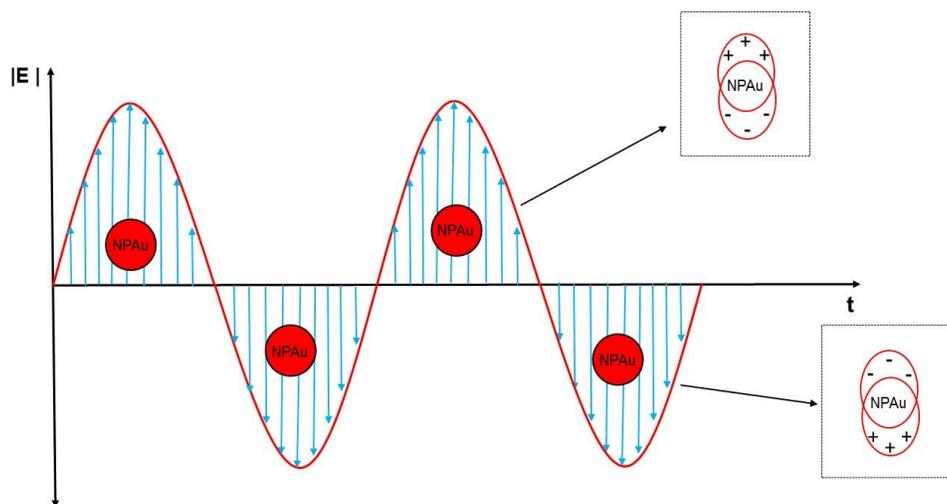


Figura 1. Esquema de la formación del dipolo inducido en nanopartículas de oro y origen de las resonancias plasmónicas.

La **Figura 1** muestra una NPAu en presencia de un campo eléctrico. La orientación del campo eléctrico distorsiona la nube electrónica de la superficie del metal formando el dipolo, tal y como se observa en los recuadros de la derecha, que a su vez estarán oscilando en función del campo eléctrico.

Es bien sabido que las resonancias plasmónicas de las nanopartículas metálicas es fuertemente sensible al tamaño, morfología, y a las propiedades dieléctricas del medio circundante. Como resultado directo de los fenómenos de resonancia, las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro pueden ajustarse fácilmente para absorber y dispersar luz en longitudes de onda específicas, en un amplio rango del espectro visible e infrarrojo cercano (NIR) variando su tamaño y forma, lo que los hacen muy adecuados para ser utilizados en múltiples aplicaciones biomédicas.

Además, los plasmónes de superficie son especialmente útiles a los químicos puesto que su campo eléctrico oscilante amplifica fenómenos ópticos como la dispersión Raman, que se conoce como efecto SERS (Surface Enhancement Raman Spectroscopy) [2-6].

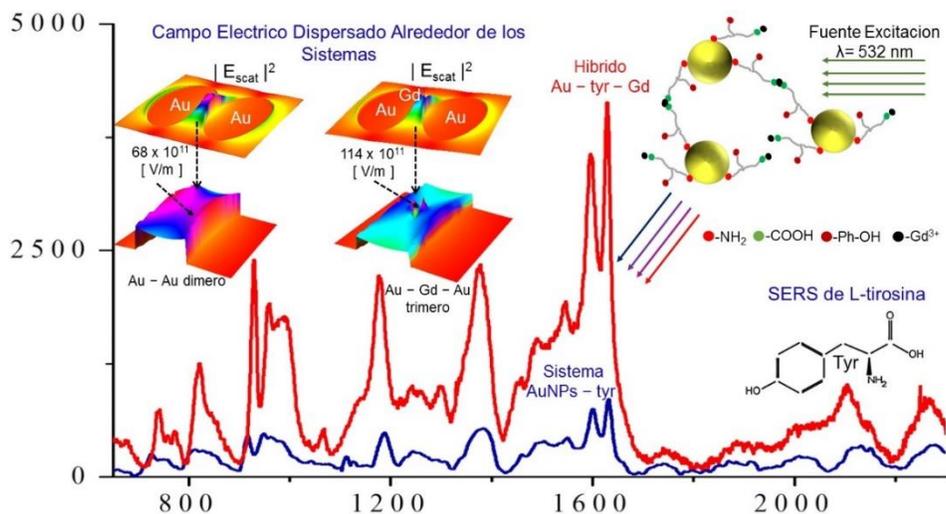


Figura 2. Realce de señales Raman de L-tirosina por inclusión de Ion Gadolinio en sistemas multifuncionales NPsAu-Tyr-Gd³⁺.

Este es el caso de los sistemas conformados por NPsAu con L-Tirosina absorbida en la superficie que propusimos inicialmente como materiales multifuncionales y cuya primera aplicación fue el realce de señales Raman a bajas concentraciones. La combinación de estos sistemas con el ion gadolinio que

³ Imagen tomada de *J. Phys. Chem. A* **2015**, 119, 4127

presenta un número de coordinación alto, permite rodear el aminoácido de nanopartículas que equidistan por aproximadamente dos moléculas de L-Tyr.

Esta conformación especial en la que el metal (Gd^{+3}) es coordinado por los grupos carboxilos libres (COO^-) de la L-tyr, genera un gran número de hot-spots (puntos calientes) y por consiguiente un aumento en el campo eléctrico alrededor de los sistemas comparado al que se tiene únicamente con NpsAu, este fenómeno apenas reportado está pendiente de estudios en función del papel que juega la naturaleza del ion usado.

La **Figura 2** muestra una representación de la conformación de los sistemas y los espectros Raman de la L-tyr en ausencia y presencia del ion gadolinio [6]. Comparando las intensidades de los espectros se aprecia un aumento en las señales de al menos 5 veces la intensidad presentada por los sistemas sin el ion lantánido. En la **Figura 2** también se aprecia la magnitud del campo eléctrico alrededor de los dos sistemas que justifica el incremento de las señales Raman en los sistemas NPsAu-Tyr-Gd. Cabe destacar que el sistema anteriormente propuesto es muy útil para estudiar diversas moléculas que se fijen inicialmente, pero resulta más complejo hacer el estudio de una segunda molécula, esta razón junto con la competencia que pueda presentar el ion Gd acomplejado en presencia de otros iones nos llevó a cambiar la especie química de anclaje entre el oro y el lantánido.

Los sistemas de $NPsM@SiO_2$ consisten en un núcleo de nanopartículas metálicas y un recubrimiento delgado de sílice, y por lo tanto la absorción óptica del sistema núcleo-recubrimiento puede ser convenientemente modulada a la región del infrarrojo cercano (NIR) conocida como "ventana de tejido", donde la penetración de la radiación en el tejido es óptima, controlando el tamaño, la forma de NPsM, y el grosor de la capa de sílice [7-9]. Las propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas se pueden preservar con el control del espesor del recubrimiento y la tendencia natural de agregación de las nanopartículas es estrictamente suprimida por una encapsulación fuerte y hermética del SiO_2 , como describe Mulvaney et al. [10]. La capa superficial de sílice de las NPs no sólo puede proteger la nanopartícula de oro del medio externo para hacerla mucho menos susceptible a la desnaturalización química-térmica y los efectos de fotoblanqueo que sufren los fluoróforos convencionales, sino también

hace al material altamente biocompatible, más estable, menos tóxico y su superficie puede ser fácilmente funcionalizable con aminas, tioles y grupos carboxilo entre otros, que permite la modificación covalente de la nanopartícula con moléculas biológicas [7, 11-13].

Las propiedades ópticas de la sección transversal (cross-sections) de NPsM@SiO₂ con espesores delgados de sílice son similares a las de las nanopartículas metálicas desnudas, y su coeficiente de absorción molar ($3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para partículas de radio $\sim 12.5 \text{ nm}$) comparado con los fluoróforos convencionales se encuentra que es mayor a la absorción que presenta el colorante verde de indocianina ($1.08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) especie química muy utilizada en tratamientos fotodinámicos [1, 3-4].

Además, la sección transversal de extinción óptica es incluso varias veces mayor que la de una molécula verde indocianina ($4.13 \cdot 10^{-21} \text{ m}^2$). En general, la magnitud del coeficiente de absorción molar es varios órdenes de magnitud mayor que los colorantes orgánicos más utilizados (10^5 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) incluso para las nanopartículas más pequeñas [1-3, 14-16]. La fuerte intensificación de la absorción y dispersión de las nanopartículas metálicas en comparación con los colorantes, como se mencionó anteriormente, también es atribuible a la oscilación de los plasmónes de superficie de los electrones de las nanopartículas metálicas.

Una de las múltiples ventajas de las propiedades expuestas anteriormente, es que la luz es usada en el calentamiento de colorantes que funcionan como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica o térmica para tratar enfermedades como el cáncer. Estos tratamientos son ampliamente utilizados debido a su naturaleza mínimamente invasiva. Los procedimientos terapéuticos térmicos son relativamente fáciles de realizar y por lo tanto tienen el potencial de mejorar los tiempos de recuperación, la reducción de las tasas de complicaciones y hospitalización [4, 9]. En particular, para las nanopartículas de metales nobles, su resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR), los lleva a absorber la luz y convertirla en energía vibracional (calor), que puede ser usada para destruir las células cancerosas e inhibir el crecimiento tumoral.

Los nanocompuestos optimizados para absorber la radiación son particularmente útiles como mediadores de la terapia fototérmica del cáncer porque convierten eficientemente la radiación absorbida en calor y son térmicamente estables a temperaturas terapéuticas [19]. Sin embargo, la profundidad de penetración de la luz en los tejidos, la gran potencia utilizada en los láseres y el largo tiempo de exposición siguen siendo un problema crítico para las aplicaciones clínicas. Además, la potencial fototoxicidad en el microambiente también debe ser investigada a detalle [17]. El objetivo de un tratamiento de ablación térmica mínimamente invasivo es conformar una dosis letal de calor a las células malignas o volumen de tejido con el menor daño posible a los tejidos normales intervinientes y circundantes [9-18].

Es bien sabido de las inusuales propiedades que presentan los elementos de transición interna o lantánidos, dentro de las que destacan la luminiscencia y el magnetismo [14, 20-23]. La resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) puede modificar la respuesta óptica lineal de los iones situados en su entorno. En particular, la luminiscencia de los iones lantánidos puede ser potenciada por un núcleo metálico de oro o plata [14, 21, 24]. Nanocompuestos Au@SiO₂ decorados con iones lantánidos le infieren una propiedad adicional (luminiscente o magnética) a los materiales y los hacen multifuncionales, donde las propiedades que aporta el lantánido incluso podrían ser potenciadas.

Otro de los múltiples usos de los sistemas propuestos es para la degradación de contaminantes orgánicos en agua y producción de energía (Hidrógeno) en el área de la fotocatalisis [25-26]. Dentro de un sin número de semiconductores utilizados, la sílice en particular es bastante usada por su selectividad y estabilidad. La principal desventaja de los fotocatalizadores es la rápida recombinación del par electrón-hueco que limita la eficiencia del catalizador [27]. Para eliminar este comportamiento, los semiconductores son dopados con poca concentración de metal o iones metálicos. Un centro metálico (Au o Ag) en un sistema núcleo-recubrimiento incide favorablemente en los procesos de recombinación de cargas de los pares electrón-hueco ($e_{bc}^- - h_{bv}^+$), el rol principal es el consumo de electrones y la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ [28]. Además, un decorado con iones lantánidos en la matriz de sílice como los materiales propuestos puede también influir positivamente en la disminución de la recombinación.

Capítulo 0

Finalmente, existen muchos más campos de potenciales aplicaciones de los materiales como biosensores [28-29], marcadores biológicos [30-31], liberadores de fármacos [32-33], agentes de contraste en imagenología (iRX o iRMN) [34, 21-22], celdas solares [35], entre otros. En este trabajo nos enfocamos principalmente a evaluar los materiales obtenidos en: el realce de señales Raman de moléculas de interés biológico (SERS), fototermia y en fotocatalisis en la descomposición de metanol para la generación de hidrogeno.

Antes de abarcar la hipótesis, justificación y los objetivos propuestos para este trabajo, en el siguiente capítulo describiremos brevemente: la metodología para la elaboración de los materiales conformados por NPsAu-Tyr-Gd que fueron propuestos inicialmente y que son el preámbulo de los sistemas finales que se presentan en capítulos posteriores, su gran respuesta como sustratos SERS para el realce de señales Raman de moléculas biológicas y las razones por las cuales se modificaron para cumplir con los objetivos propuestos en esta tesis.

Referencias

- [1] Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103 (40), 8410-8426.
- [2] Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 27, 241-250.
- [3] Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (14), 7238-7248.
- [4] Gold Nanoshells in Biomedical Applications. *Nanotechnologies for the Life Sciences*, **2010**, 1-5.
- [5] The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 668-677.
- [6] Surface Enhanced Raman Scattering of Amino Acids Assisted by Gold Nanoparticles and Gd^{3+} Ions, *J. Phys. Chem. A* **2015**, 119, 4127-4135.
- [7] $Fe_3O_4@SiO_2$ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses, *Chem. Mater.* **2012**, 24, 4572-4580.
- [8] Macrophage Cell Membrane Camouflaged Au Nanoshells for in Vivo Prolonged Circulation Life and Enhanced Cancer Photothermal Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (15), 9610-9618.
- [9] Nanoshell-Mediated Near-infrared Thermal Therapy of Tumors Under Magnetic Resonance Guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 13549-13554.
- [10] Synthesis of Nanosized Gold-Silica Core-Shell Particles, *Langmuir*, **1996**, 12, 4329-4335.
- [11] Multifunctional Gadolinium-labeled Silica-coated Fe_3O_4 and $CuInS_2$ Nanoparticles as a Platform for in Vivo Tri-modality Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging, *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3, 2873-2882.
- [12] Sonochemical Approach to the Synthesis of $Fe_3O_4@SiO_2$ Core-Shell Nanoparticles with Tunable Properties, *ACS Nano*, **2008**, 2, 847-856.
- [13] Light-absorbing Properties, Stability, and Spectral Stabilization of Indocyanine Green, *J. Appl. Physiol.* **1976**, 40, 575-583.
- [14] Experimental Evidence of Luminescence Quenching at Long Coupling Distances in Europium (III) Doped Core-shell Gold Silica Nanoparticles, *Gold Bull.*, **2013**, 46, 349-355.
- [15] Turro, N. *J. Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books: Mill Valley, CA, **1991**.
- [16] Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids Surf. B*, **2007**, 58, 3-7.
- [17] Nanoparticles for Photothermal Therapies, *Nanoscale*, **2014**, 6, 9494-9530.
- [18] Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 4691-4716.
- [19] Biomedical Nanomaterials for Imaging-Guided Cancer Therapy, *Nanoscale*, **2012**, 4, 6135-6149.
- [20] Study on Preparation and Optic Properties of Nano Europium Oxide-ethanol Sol by Pulsed Laser Ablation, *Thin Solid Films*, **2002**, 417, 43-46.
- [21] The Biodistribution of Gold Nanoparticles Designed for Renal Clearance, *Nanoscale*, **2013**, 5, 5930-5939.

- [22] A Brain Tumor Molecular Imaging Strategy Using A New Triple Modality MRI-Photoacoustic-Raman Nanoparticle, *Nat Med.*, **2012**, 18 (5), 829–834.
- [23] Europio: Naturaleza, Luminiscencia y Aplicaciones, *An. Quím.* **2006**, 102(4), 40–45.
- [24] Ag-SiO₂-Er₂O₃ Nanocomposites: Highly Effective Upconversion Luminescence at High Power Excitation and High Temperature, *Scientific Reports*, **2014**, 4 (5087), 1-9.
- [25] Photodegradation of Dye Pollutants on TiO₂ Nanoparticles Dispersed in Silicate Under UV–VIS Irradiation, *J. Appl. Catal.: B Environ.*, **2002**, 37, 331-338.
- [26] Ag-Nanoparticle-Decorated SiO₂ Nanospheres Exhibiting Remarkable Plasmon-Mediated Photocatalytic Properties, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 19039–19045.
- [27] Photocatalytic Degradation of Methyl Orange by Gold Silver Nano-core/Silica nano-shell, *J. Phys. Chem. Solids*, **2007**, 68, 413-419.
- [28] A Transition Metal Carbonyl Probe for Use in a Highly Specific and Sensitive SERS-Based Assay for Glucose, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 18028-18031.
- [29] Rapid, Sensitive, and Reusable Detection of Glucose by a Robust Radiofrequency Integrated Passive Device Biosensor Chip, *Scientific Reports*, **2015**, 7807 (5), 1-9.
- [30] Applications of Nanoparticles in Biology, *Adv. Mater.*, **2008**, 20, 4225-4241.
- [31] Synthesis, Characterization, and in Vitro Testing of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Targeted Using Folic Acid-Conjugated Dendrimers, *ACS Nano*, **2008**, 2, 773-783.
- [32] Preparation and Characterization of Thermosensitive Polymers Grafted Onto Silica-coated Iron Oxide Nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, **2008**, 326, 517-521.
- [33] Synthesis and Characterization of Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Microemulsion: The Effect of Nonionic Surfactants, *Langmuir*, **2001**, 17, 2900-2906.
- [34] Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, **2006**, 16, 2330-2339.
- [35] Panchromatic Enhancement of Light-Harvesting Efficiency in DyeSensitized Solar Cells Using Thermally Annealed Au@SiO₂ Triangular Nanoprisms, *Langmuir*, **2014**, 30, 14352–14359.

CAPÍTULO I: PRIMER SISTEMA MULTIFUNCIONAL PROPUESTO

En este capítulo se expone la metodología y los resultados obtenidos de un primer material propuesto como sistema multifuncional que está conformado de nanopartículas de oro (NPsAu) funcionalizadas con tirosina (L-Tyr) como sistema de anclaje entre la superficie de las NPsAu y los iones gadolinio. Estos sistemas reúnen las características de los materiales propuestos, que son, la conformación por un núcleo metálico de oro y la inclusión de un lantánido para darle mayor versatilidad a los materiales respecto a sus aplicaciones, este sistema en particular fue usado como sustrato SERS en el realce de la molécula de anclaje (aminoácido).

1.1. Síntesis de Nps Au

La síntesis de NpsAu se realizó por reducción del ácido cloroaurico [$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] con borohidruro de sodio [NaBH_4] a temperatura ambiente. La dispersión resultante se calienta a reflujo a temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora y se dializa con agua desionizada con el fin de eliminar el exceso de iones borohidruro presentes en el medio [1-3].

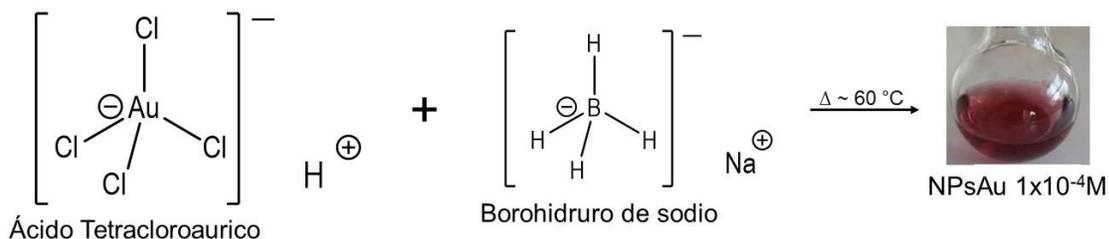


Figura 1.1. Reacción química para la síntesis de NPsAu por reducción con borohidruro de sodio.

La **Figura 1.1** muestra la reacción química llevada a cabo para la formación de nanopartículas de oro por reducción con borohidruro de sodio, una solución coloidal vino tinto de nanopartículas de oro de concentración $1 \times 10^{-4}\text{M}$ se obtuvieron siguiendo esta metodología. Finalmente, la dispersión se pasa por un filtro de $0.2\text{ }\mu\text{m}$ para eliminar algún aglomerado indeseado que se formara durante la síntesis.

1.2. Funcionalización de NpsAu con L-Tirosina

En cuanto a la formación de las especies de NPsAu-AA, se probaron 3 valores de pH (~2.5, 5.6 y 8), para determinar en qué condiciones hay una mejor adsorción e interacción con el aminoácido y la superficie del oro. La **Figura 1.2** muestra las posibles interacciones electrostáticas entre las NPs metálicas y el aminoácido a los distintos valores en la escala de pH, se resaltan los valores de los pK_a del aminoácido que es donde ocurren las protonaciones y desprotonaciones. Un volumen de solución ($1 \cdot 10^{-3}M$) de tirosina fue adicionado a una dispersión de NPsAu en continua agitación por 24 H, la dispersión final es centrifugada y lavada, y el sobrenadante es usado de forma indirecta para medir la absorción del aminoácido en la partícula metálica.

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{RCOO^-}{RCOOH}$$

La variación del pH modifica la proporción de especies químicas del AA presentes en el medio, que para el caso de la Tyr a los diferentes pH (2.5, 5.6 y 8) se tiene (Tyr⁺(70%), Tyr[±](99%) y Tyr⁻(75%), respectivamente) obtenidos de la ecuación de Henderson-Hasselbach, teniendo en cuenta la superficie eléctrica negativa de las NpsAu se hace un estudio de adsorción promovido por las interacciones electrostáticas que se generan y este a su vez puede ser comparado con el obtenido experimentalmente por espectroscopia UV-Vis [4-5].

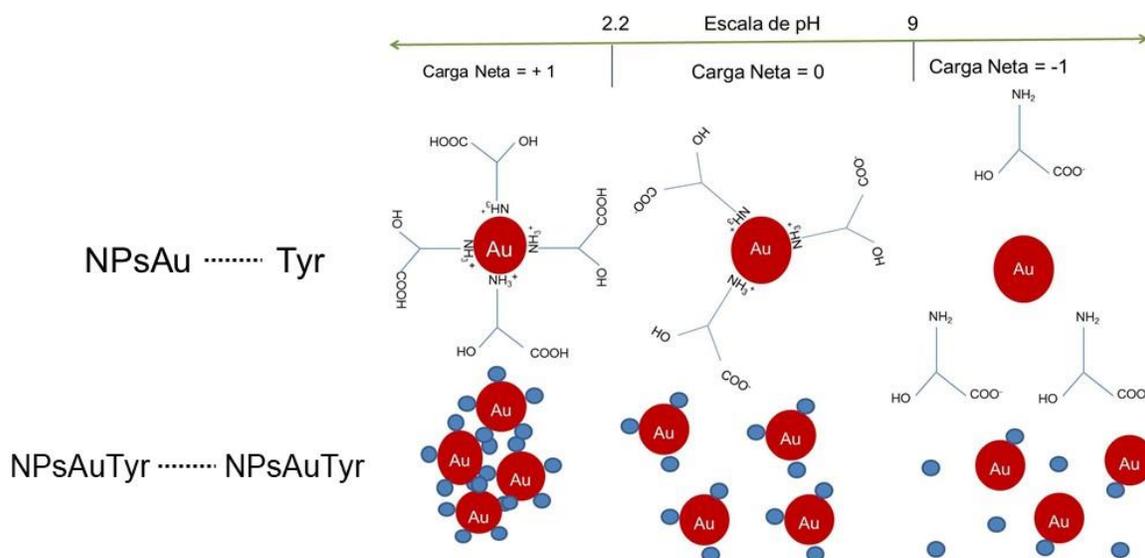


Figura 1.2. Interacciones electrostáticas y estabilidad coloidal de NPsAu con AA y NPsAu-AA entre sí.

1.3. Formación de Híbridos de Au-AA-Ln.

Para la tercera etapa se toman las NPsAu funcionalizadas con los aminoácidos a dos pH diferentes (6 y 8 debido a que presentan buena absorción y además el sistema conserva su estabilidad coloidal) y se adiciona al medio una sal de lantánido (nitrato de Gadolinio), bajo estas condiciones el grupo carboxilo de la tirosina estará desprotonado y podrá interaccionar mejor con el lantánido.

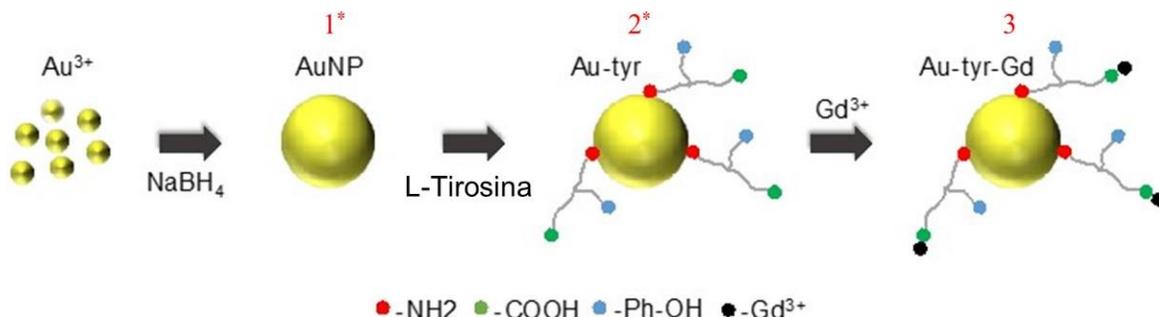


Figura 1.3. Metodología para formación de los sistemas híbridos Au-Tyr-Gd.

La **Figura 1.3** presenta un esquema general del procedimiento que se siguió en tres etapas para la formación de los híbridos, desde la formación de las NPsAu hasta la incorporación del ion gadolinio. La interacción de las partículas de Au-AA con los iones lantánidos produce un precipitado que es purificado eliminando el sobrenadante y redispersado nuevamente en agua desionizada, así los híbridos obtenidos de Au-AA-Ln pueden conservarse de tres formas: 1) Polvos, evaporando el solvente mediante calentamiento a 110 °C en una estufa, 2) Polvos, se estabiliza térmicamente calcinando las muestras a 600 °C en donde se eliminan los aminoácidos y 3) Solución, redispersando el precipitado en otros solventes.

1.4. Cálculo numérico para nanopartículas de oro y sistemas híbridos

La caracterización óptica de una sola nanopartícula de oro y del sistema híbrido Au-tyr-Gd fue realizada calculando numéricamente la sección transversal de extinción y dispersión (y, en consecuencia, la sección transversal de absorción), así como el campo eléctrico disperso alrededor de las partículas metálicas, usando la teoría de Mie [6-7] y el método numérico de elementos de frontera (BEM) [8-9]. El índice de refracción complejo del oro se tomó de Johnson y Christy [10], mientras que para el ion gadolinio de Dakhel [11]. Los datos experimentales fueron tomados en el

rango de interés (300-700 nm), tanto para la nanopartícula de oro como Au-tyr-Gd. Los sistemas híbridos de Gd se consideraron inmersos en agua y caracterizado por un índice de refracción fijo de 1.33. Para los cálculos numéricos, no se tiene en cuenta el índice de refracción del aminoácido, pero se considera la distancia de separación entre la nanopartícula de oro y el ion Gd^{3+} teniendo en cuenta la longitud de los enlaces entre los grupos amino y carboxilo de la molécula de L-tirosina [12]. El radio de la nanopartícula de oro es el obtenido del diámetro promedio medido desde micrografías TEM, mientras que el radio para el ión Gd^{3+} se estableció en 0.11 nm [11].

1.5. Caracterización de los híbridos

Espectroscopia UV-Vis se utilizó para medir la banda de absorción (LSPR) de los sistemas híbridos Au-tyr y Au-tyr-Gd. Usando la ley Beer-Lambert, la información UV-Vis es también usada para determinar la concentración de aminoácidos adsorbidos. La morfología y el tamaño de las nanopartículas de oro en cada paso del proceso para obtener los sistemas Au-tyr-Gd se determinó utilizando un microscopio de transmisión electrónica (TEM, JEOL, JEM modelo 1230). Las mediciones electroforéticas del potencial zeta se utilizó para evaluar la carga superficial de la muestra y para determinar la estabilidad coloidal exhibida por los sistemas en función del pH. La señal Raman de L-tirosina se tomó con un sistema micro-Raman Horiba Jobin Yvon iHR320 (100X, Olympus, N.A.), a una longitud de onda de excitación de 532 nm. La intensidad del incidente fue de 15 mW en la muestra, y el tiempo de integración se estableció en 10 s. La región investigada tenía un área de $\sim 1 \mu m^2$. La señal Raman de aminoácido sin oro nanopartículas e iones Gd^{3+} se midieron a $2 \cdot 10^{-4}$ M y utilizado como referencia, mientras que la señal SERS fue producida por $1 \cdot 10^7$ moléculas de L-tirosina ($4 \cdot 10^{-5}$ M).

1.6. Análisis y discusión de resultados

Las nanopartículas de oro sintetizadas por reducción con borohidruro de sodio presentan una banda de absorción UV-Vis a 525 nm, la **Figura 1.4** muestra el espectro de absorción UV-Vis de las NPsAu la banda de absorción que se presenta corresponde a la oscilación colectiva de la nube electrónica del plasmón de resonancia de superficie localizado (LSPR) alrededor de $\lambda_{max} = 525$ nm.

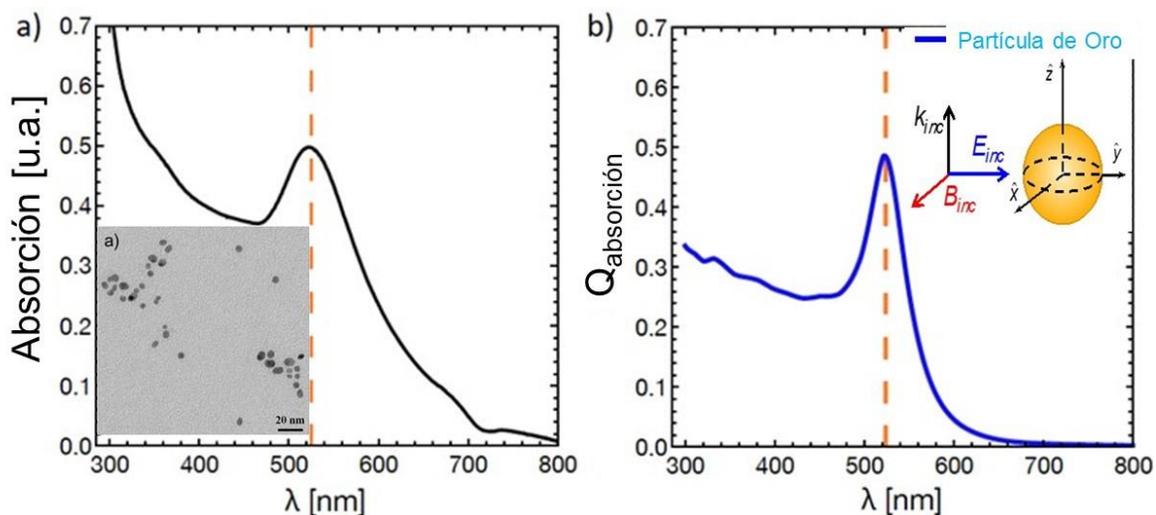


Figura 1.4. Espectro de absorción experimental de NPsAu con plasmón de resonancia en 525 nm (a) y eficiencia de absorción calculada para una partícula de oro embebida en agua de radio 3.75 nm (b).

Esta banda de absorción se observa típicamente para las nanopartículas de oro con morfología esférica, tal y como se encuentra reportado [12]. Usando la teoría de Mie, se calculó la eficiencia de absorción para una única nanopartícula esférica de oro de radio 3.75 nm inmersa en agua ($n = 1.33$) que es equivalente al sistema experimental y se obtiene el espectro que se muestra en la **Figura 1.4 (b)**⁴.

La morfología esférica que presentan las nanopartículas de oro fue determinada usando un microscopio de transmisión electrónica (TEM). La **Figura 1.5** muestra una Micrografía TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas (a) y la distribución de tamaños de las nanopartículas de oro (b). Los resultados de distribución de tamaño fueron obtenidos del conteo de ~ 90 partículas polidispersas presentes en varias micrografías⁵, se estimó usando un software para el conteo que el radio promedio para estas partículas es 3.75 ± 0.8 nm, que concuerdan con los resultados obtenidos por espectroscopia UV-Vis.

⁴ Cálculo realizado por el Dr. Alejandro Reyes-Coronado y M.C. J.M. Galicia, Departamento de Física de la Facultad de Ciencias, UNAM.

⁵ Conteo usando el software ImageJ.

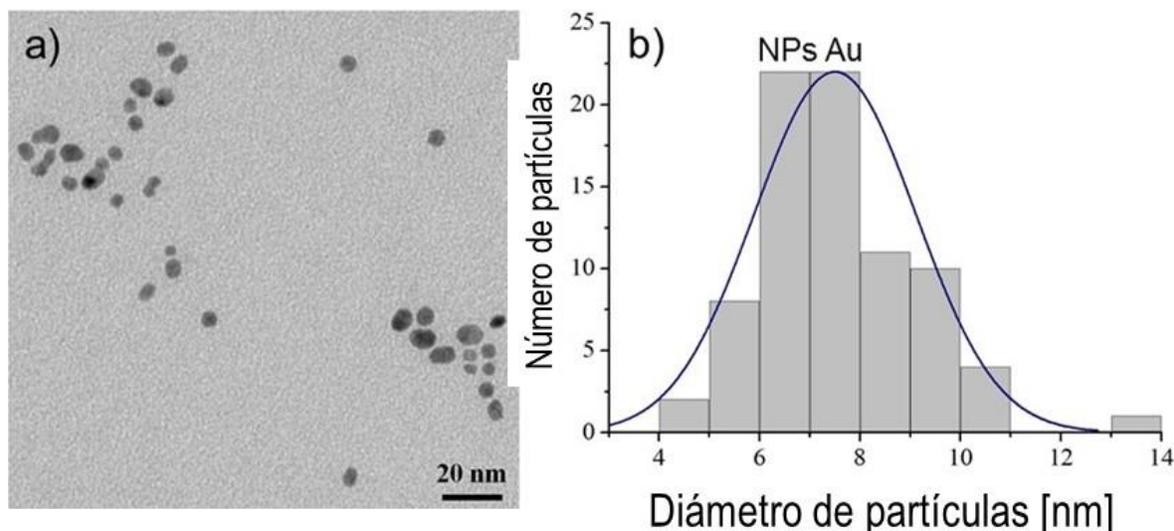


Figura 1.5. Imagen TEM de NPsAu con radio 3.75 ± 0.8 nm (a) y distribución de tamaños de NPsAu sintetizadas (b).

La estabilidad de las nanopartículas de oro se determinó de la medida electroforética del potencial zeta en función del pH, donde se obtuvieron valores en el rango de: -70.6 ± 2.2 y -24.4 ± 3.9 mV entre pHs de 9-4 respectivamente (Ver Figura 1.6), donde -25 mV es el parámetro base mínimo establecido de potencial zeta para coloides que conservan su estabilidad en medio acuoso [13].

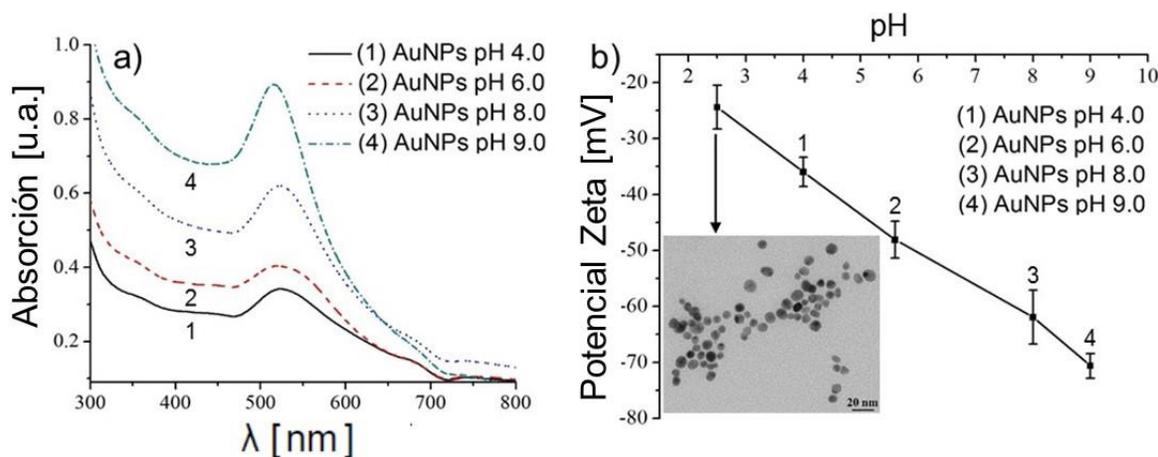


Figura 1.6. Espectros de absorción de NPsAu (a) y potencial zeta (b) en un rango de pH de 4-9.

La Figura 1.6 (a) muestra los espectros de absorción UV-Vis de NPsAu en función del pH (rango 4-9), en estos se puede ver que el plasmon de resonancia correspondiente al oro no se ve modificado por la variación del pH del medio, un leve ensanchamiento de la banda si se aprecia a pH de 4 posiblemente debido a una disminución de la estabilidad de la dispersión y tendencia a aglomeración

de las partículas coloidales. La disminución en la intensidad de los espectros se debe a un efecto de disminución en la concentración de las nanopartículas, la dispersión inicial fue tomada a pH 9 y posteriormente esta fue titulada con ácido clorhídrico para los demás pH. La parte (b) de la **Figura 1.6** presenta los potenciales zeta de las NPsAu a los mismos pH tomados para los espectros de absorción UV-Vis donde se aprecia el carácter negativo de la superficie de las partículas y además el amplio rango de estabilidad coloidal, se incluye un punto a pH (2.5) cercano al límite de estabilidad coloidal del sistema (PZ = - 24 mV).

El cálculo de la eficiencia de absorción muestra la resonancia localizada a 524 nm, lo que concuerda bastante bien con la posición del plasmón de resonancia obtenido experimentalmente y corresponde al plasmón de superficie localizado con un comportamiento dipolar (Ver, **Figura 1.7**). Además, la diferencia en la intensidad, así como el ancho del espectro medido se puede explicar considerando tanto la distribución del tamaño como las correcciones del tamaño en la función de respuesta dieléctrica para el oro.

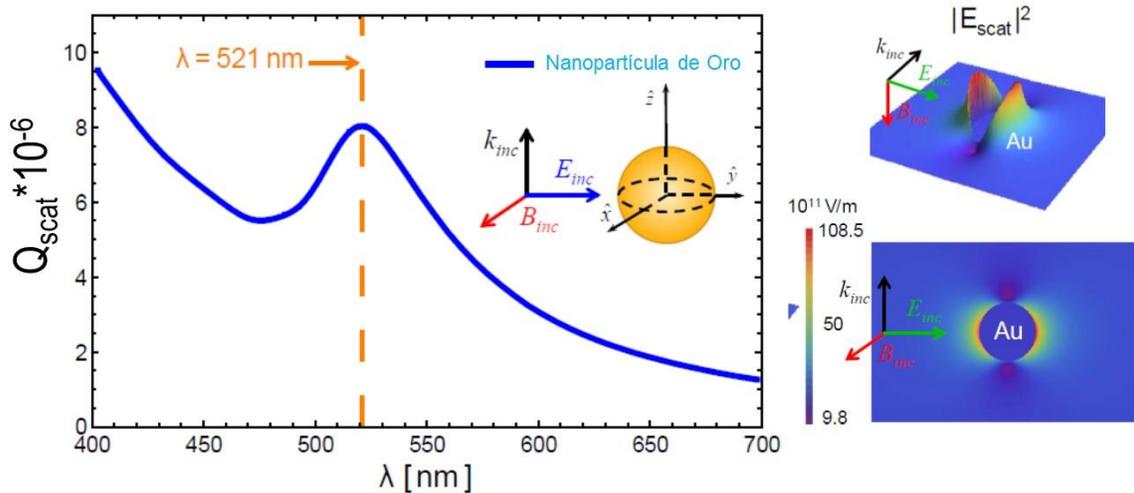


Figura 1.7. Eficiencia de dispersión (C_{scat}) en función de la λ calculada para una NPsAu de radio 3.75 nm dispersa en agua y gráfica de la magnitud del cuadrado del campo eléctrico cercano para la misma NPAu.

Para nanopartículas de oro muy pequeñas en relación con la longitud de onda de la radiación incidente (532 nm, laser verde de potencia 15 mW), la eficiencia de dispersión es muy baja en comparación con la eficiencia de absorción (5 órdenes de magnitud, **Figura 1.4**); por lo tanto, la eficiencia de absorción básicamente coincide con la eficiencia de extinción (Q_{ext}). En este caso, el plasmón dipolar es el modo más eficientemente excitado y está localizado a 524 nm.

La L-tirosina es un aminoácido anfóterico, su adsorción en la superficie del oro depende del estado de protonación del grupo amino (carácter básico). Una medición indirecta del espectro de absorción UV-Vis del sobrenadante obtenido de la separación de las nanopartículas de oro funcionalizadas con el aminoácido nos permite obtener mediante la relación de Beer-Lambert, los porcentajes de L-Tyr adsorbidos sobre la superficie de las NPsAu a distintos pH (Ver **Tabla 1.1**).

NPsAu a diferentes pH	(%) L-Tyr adsorbida
2.6	32
5.6	21
8.0	19

Tabla 1.1. Porcentajes de L-Tyr adsorbida sobre la superficie de las NPsAu a diferentes valores de pH.

Claramente las mejores condiciones de adsorción se dan a pH bajos (32% de L-tyr inicial), pero teniendo en cuenta también la poca estabilidad del sistema bajo estas condiciones (**Figura 1.2**) que se ve reflejado en la pequeña magnitud del potencial zeta (**Figura 1.6** (b)) optamos por trabajar a pH de 5.6 donde se mantiene una buena adsorción y se conserva la estabilidad de las partículas. A este pH, la concentración de L-tirosina adsorbida fue $\sim 4 \cdot 10^{-5}$ M (aproximadamente el 21% de la concentración inicial).

En la siguiente etapa para la incorporación de los iones Gd^{3+} , las nanopartículas de oro funcionalizadas con L-tyr se mantuvieron a pH 5.6. A este pH, la carga negativa presente en el grupo carboxilo ($-COO^-$) y los pares de electrones libres del oxígeno estabilizan los iones de gadolinio. A valores de pH más bajos, los sistemas híbridos se precipitan antes que los iones Gd^{3+} se adhiera a su superficie y a valores de pH arriba de 9 los iones precipitan en forma de óxido. La **Figura 1.8** (a) muestra el espectro de absorción UV-Vis obtenido para el sistema híbrido Au-tyr-Gd. Una fuerte absorción y una amplia banda se observa para longitudes de onda de 625 nm. Tanto el ensanchamiento como corrimiento al rojo de la banda del LSPR son evidencia de un proceso agregación por la presencia de los iones gadolinio. Un recuadro en la **Figura 1.8** (a) muestra un tipo de agregado formado después de adicionar iones Gd^{3+} en nanopartículas de oro modificadas con L-tirosina. La distribución de tamaño del sistema híbrido Au-tyr- Gd^{3+} con un radio promedio estimado en 5.25 ± 1.15 nm (Au-tyr- Gd^{3+}), tal como se muestra en la **Figura 1.8** (b).

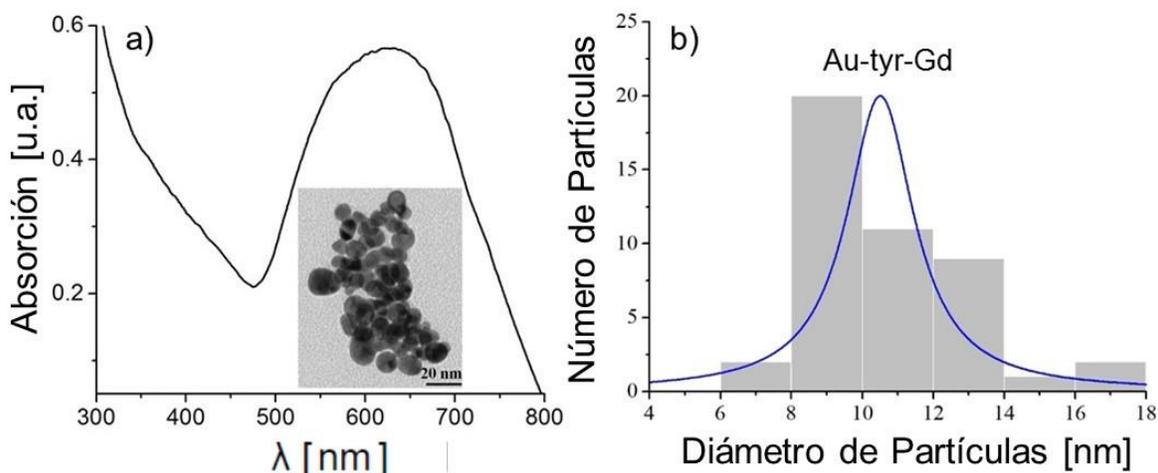


Figura 1.8. Espectro de absorción UV-Vis de sistemas Au-Tyr-Gd a pH 5.6 (a) y distribución de tamaño de partícula (b).

La tirosina libre y la presencia de esta adsorbida en la superficie de las NPsAu fue determinada por resonancia magnética nuclear (RMN), la **Figura 1.9** (a) muestra el espectro de RMN de la L-Tyr en una solución de agua deuterada en el que se pueden apreciar dos dobletes ($\delta = 7.2$ y 6.9 ppm, donde δ representa el desplazamiento químico) correspondiente a los protones en el anillo aromático (representados con el color rojo en el zoom de la gráfica y los número 1 sobre la molécula de L-Tyr) del amino ácido.

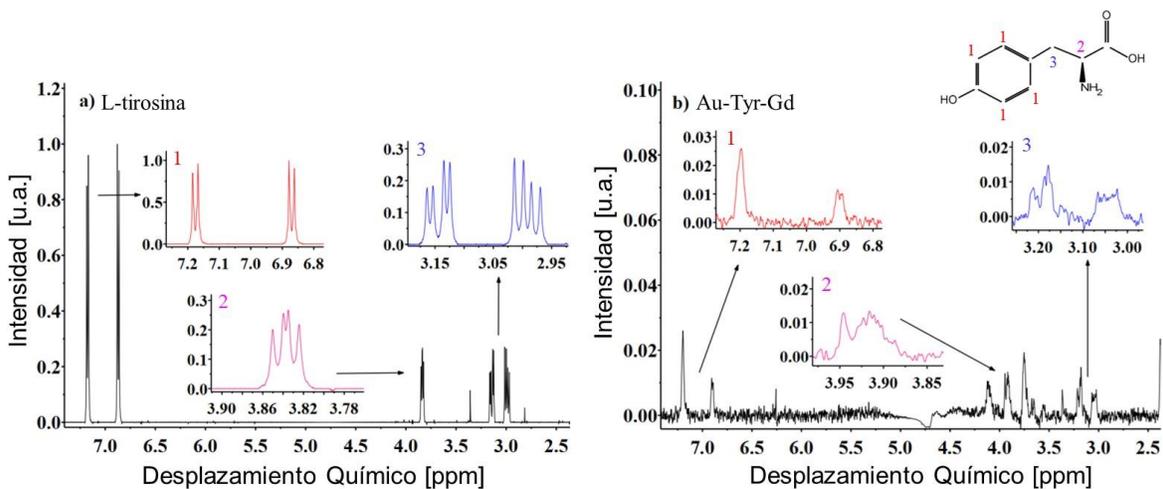


Figura 1.9. Espectros de RMN para ^1H NMR de L-tyr pura en agua deuterada (a) y sistema híbrido Au-Tyr-Gd en agua deuterada (b).

El único protón del carbono α (zoom fucsia en la gráfica y número 2 en la L-Tyr) tiene una señal que corresponde a un triplete ($\delta = 3.84$ ppm), y finalmente, la última señal es un multiplete correspondiente a protones del carbono β ($\delta = 2.9$ - 3.2 ppm, zoom azul en la gráfica y número 3 en la L-Tyr). Las señales

obtenidas de los espectros de RMN para la L-tyr y sus desplazamientos químicos concuerdan bastante bien con los reportados en las bases de datos de compuestos orgánicos⁶.

Comparando el espectro RMN de la L-tyr libre con el que presenta el sistema híbrido Au-Tyr-Gd (Ver **Figura 1.9** (b)), se puede observar una disminución drástica en la intensidad, cambio en la multiplicidad y un ligero desplazamiento químico (δ) de las señales (las señales generadas por los mismos protones están representadas con un zoom y número del mismo color). Las señales correspondientes al carbono α (zoom fucsia y número 2) y al carbono β (zoom azul y número 3) de la L-tirosina en el híbrido son los más afectados debido a su proximidad con la nanopartícula de oro y el ión Gd^{3+} .

La presencia de centros metálicos con iones paramagnéticos es responsable de modificar en gran medida el entorno químico de los protones que se encuentran en el aminoácido, por lo que se dificulta identificar la L-tirosina presente en el sistema híbrido [14-15]. A pesar de que la resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica sensible e infalible a la hora de caracterizar sistemas biológicos, la preparación de muestras es normalmente difícil, ya que estas deben ser transferidas a solventes deuterados. Además de lo anterior, la técnica es más costosa y menos accesible razón por la cual se propone la espectroscopia Raman para el análisis e identificación de este tipo de sistemas.

Los materiales híbridos propuestos nos permiten usar la espectroscopia Raman y superficie de dispersión Raman mejorada para detectar L-tirosina en concentraciones tan bajas como en este trabajo de $4 \cdot 10^{-5}$ M. La contribución en el diseño de sustratos SERS es el uso de una combinación de NPsAu con iones Gd^{3+} para mejorar la señal de Raman. En este sistema híbrido, suponemos que la molécula modelo se coloca entre la nanopartícula de oro y los iones Gd^{3+} . Sin embargo, por las técnicas descritas anteriormente, no podemos asegurar completamente que la molécula de L-tirosina se encuentra en medio entre la nanopartícula de oro y los iones Gd^{3+} .

⁶ Spectral data base for organic compounds, SDBS http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

La presencia de los iones Gd^{3+} en el sistema tiene dos roles principales en el sistema: por un lado, funcionan como un auxiliar para proporcionar una mejora adicional de la señal Raman de L-tirosina (molécula de prueba), y por el otro, funcionan como un espaciador entre nanopartículas de oro contiguas, fijando la distancia entre ellos y permitir la agregación de nanopartículas de oro. De esta forma, promueven la formación de puntos de calientes (hotspots) dentro del sistema.

Los espectros Raman para L-tirosina en presencia de NPsAu o del sistema híbrido a $2 \cdot 10^{-4}$ M se muestran en la **Figura 1.10**. Debido a la baja concentración de la L-Tyr, solo algunos modos de vibración Raman son visibles. La identificación de las bandas de Raman se basó en trabajos reportados [16-17]. La región de 1200 a 1550 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de flexión N-H y estiramiento C-N, mientras que la región entre 1550 y 1750 cm^{-1} corresponde al modo de estiramiento C=O. La banda observó cerca de 836 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del anillo aromático.

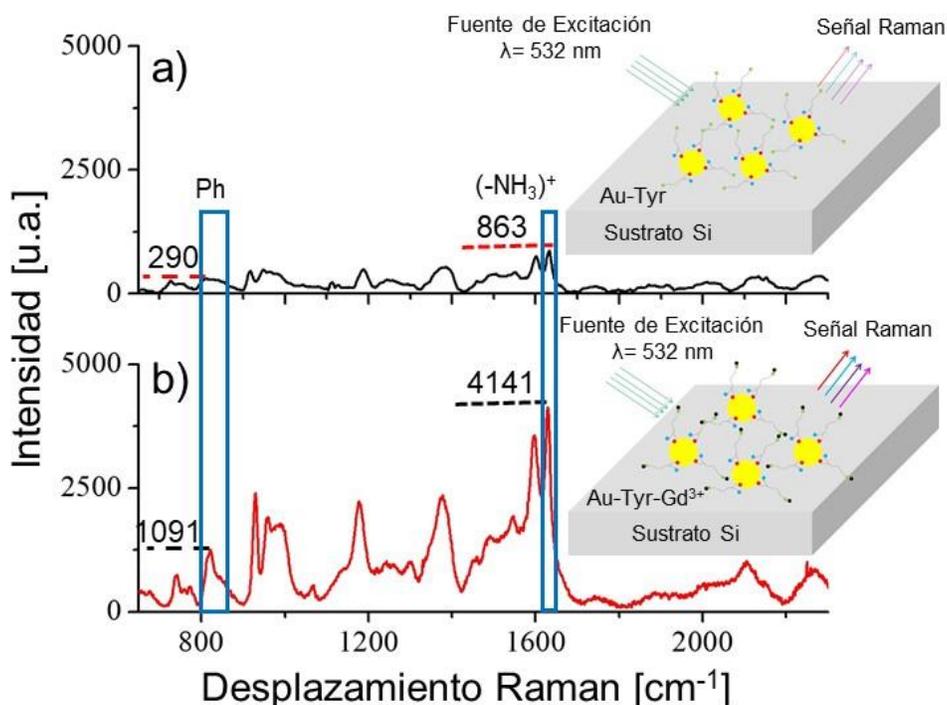


Figura 1.10. Espectro SERS de L-tirosina adsorbida sobre nanopartículas de oro (a) y SERS de L-tirosina asistido por NPsAu e iones Gd (b).

En la **Figura 1.10**, se muestra el aumento de la señal Raman mejorada de la L-tirosina adsorbida en la superficie de la nanopartícula de oro. Este incremento es el resultado del campo eléctrico alrededor

de las nanopartículas de oro que interactúan con moléculas de L-tirosina. Tal la interacción es más fuerte con el grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) porque está más cerca de la superficie de la nanopartícula de oro [18-19]. Uno de los modos de vibración más característico del grupo de amino se encuentra a 1630 cm^{-1} (banda resaltada en la **Figura 1.10**). Esta banda muestra un factor de realce de la señal Raman de al menos ~ 10 veces mayor que para la L-tirosina libre. Como se puede ver en la **Figura 1.10** (b), el factor de mejora debido a la presencia de Gd^{3+} aumentó aproximadamente 5 veces comparado con el factor de realce producido en el sistema Au-tyr sistema. Además, los iones Gd^{3+} en el sistema híbrido producen un factor de realce de 46 veces mayor que la señal Raman de L-tirosina libre.

El incremento en la señal Raman de L-tirosina podría ser debido a una combinación de tres factores: (i) formación de hotspots donde los iones Gd^{3+} funcionan como espaciadores entre nanopartículas de oro; (ii) el contraste del índice de refracción producido por la presencia de iones Gd^{3+} puede causar un incremento en el campo eléctrico alrededor de la nanopartícula y, en consecuencia, producir un mayor factor de realce; y (iii) un efecto de transferencia de carga entre nanopartículas de oro e iones Gd^{3+} .

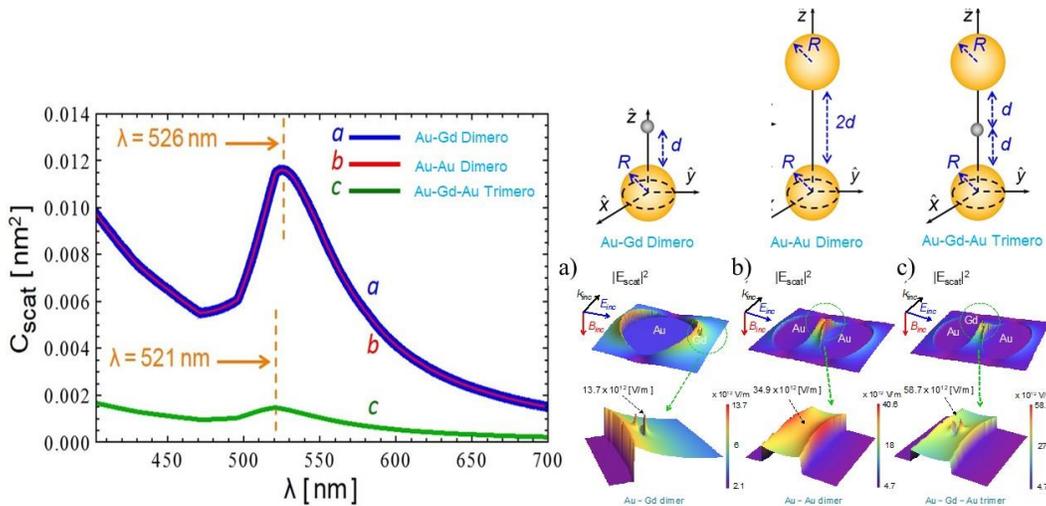


Figura 1.11. Espectro de la sección transversal de dispersión calculada para 3 sistemas (a Au-Gd, b Au-Au y c Au-Gd-Au), inmersos en agua. El radio de las partículas de oro es 3.75 nm, el diámetro de los iones Gd 0.22 nm y la distancia de separación es 0.5 nm.

En la **Figura 1.11**, se presentan los espectros de la sección transversal de dispersión, C_{scat} , para el Au-Gd (línea azul), Au-Au (línea roja) y Au-Gd-Au (línea verde), que muestran un desplazamiento al

rojo del LSPR de unos pocos nanómetros (5 nm aproximadamente) entre una sola NPAu en comparación con un dímero de oro (prácticamente no hay diferencia entre los sistemas Au-Au y Au-Gd-Au). Para los casos estudiados, los radios de partículas de oro se fijaron en $R = 3.75$ nm y el diámetro para los iones Gd fue $D = 0.22$ nm⁷. La distancia de separación entre el oro y las partículas de Gd se estableció en $d = 0.5$ nm.

Para cada sistema, en su frecuencia resonante, calculamos la magnitud del cuadrado del campo eléctrico cercano disperso alrededor de las partículas (ver **Figura 1.11**) usando el método BEM. El campo eléctrico aumenta alrededor de ~ 2 veces desde un solo Sistema Au-Gd a un dímero de partículas de oro, y aumenta de la misma forma otro factor ~ 2 con respecto al sistema Au-Gd-Au. Por lo tanto, el incremento es 4.2 veces mayor para el sistema híbrido Au-Gd-Au que para el sistema Au-Gd. Estos resultados claramente muestran un aumento de 1 orden de magnitud para el campo eléctrico local causado por iones Gd³⁺ en comparación con los resultados para únicamente nanopartículas.

El origen del incremento en el campo eléctrico disperso como mencionamos antes puede deberse a tres factores y ahora con los resultados obtenidos se debe a los dos primeros: (i) la formación de puntos calientes (hotspots), donde el Gd³⁺ actúa como un espaciador controlando la distancia de separación entre nanopartículas de oro, y (ii) la contribución de la respuesta electromagnética de las partículas que rodean las nanopartículas de oro, en este caso la presencia de iones Gd³⁺. Es decir, el origen físico de la mejora del campo eléctrico disperso producido en las proximidades del Gd³⁺ se debe al contraste en el índice de refracción de Gd³⁺ con el de los alrededores del medio ($n = 1.33$).

⁷ WebElements. Gadolinium: Radii of Atoms and Ions. http://www.webelements.com/gadolinium/atom_sizes.html. Accessed in Oct 2014.

Capítulo I

Este tipo de realces ha sido reportado antes, en sistemas donde usan sílice como espaciador entre las nanopartículas de oro y así pueden modular sus propiedades de realce en función del espesor del recubrimiento.

Como se mostró anteriormente, la presencia de iones Gd^{3+} aumenta el campo eléctrico alrededor de 1 orden de magnitud en comparación con nanopartículas de oro. Como consecuencia de esta mejora, el factor de mejora de la señal de Raman para L-tirosina libre aumentado 46 veces. Los cálculos numéricos junto con los resultados experimentales han demostrado que teniendo en cuenta los primeros dos factores, puntos calientes bien definidos y contraste en el índice de refracción, obtenemos resultados que son suficientes para explicar el incremento en la señal de Raman obtenida experimentalmente. Aunque el efecto de transferencia de carga (tercer factor) puede desempeñar un papel secundario en el sistema, este requiere un estudio más profundo para cuantificar su contribución a la mejora de señal Raman para L-tirosina o moléculas similares en el sistema.

Como se presentó en este capítulo los sistemas propuestos funcionan muy bien como sustratos SERS e incluso abren la posibilidad de estudio a sistemas similares con diferentes concentraciones de lantánidos e incluso otro tipo de iones en los que se puede demostrar que los resultados obtenidos no son inherentes al tipo de ion, todo esto debido al poco estudio de estos sistemas para esta aplicación en particular. Desafortunadamente la baja estabilidad de estos materiales limita su uso en las aplicaciones biológicas propuestas, por lo que nos vimos en la necesidad de cambiar el intermediario (aminoácido) por una cubierta de sílice para cumplir con los objetivos propuestos en esta tesis y esos sistemas se presenta en los capítulos posteriores.

Referencias

- [1] Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Golds Sols. *J. Phys. Chem.*, 86, **1982**, 3391-3395.
- [2] Role of Particle Size in Individual and Competitive Diffusion of Carboxylic Acid Derivatized Colloidal Gold Particles in Thermally Evaporated Fatty Amine Films. *Langmuir*, 15 (23), **1999**, 8197-8206.
- [3] A General Method to Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir*, 19 (17), **2003**, 6693-6700.
- [4] Capping of Gold Nanoparticles by the Amino Acid Lysine Renders Them Water-Dispersible, *Langmuir*, 19 (8), **2003**, 3545-3549.
- [5] Study of Electrolyte Induced Aggregation of Gold Nanoparticles Capped by Amino Acids, *J. Colloid Interface Sci.*, 299, **2006**, p. 191-197.
- [6] Beitrage Zur Truber Medien Speziell Kolloidler Metallo Sungen, *Ann. Phys.* **1908**, 25, 377-445.
- [7] Absorption and Scattering of Light by Small Particles, Wiley: New York, **1983**.
- [8] Numerical Simulation of Electron Energy Loss Near Inhomogeneous Dielectrics, *Phys. Rev. B* **1997**, 56, 15873-15884.
- [9] Retarded Field Calculation of Electron Energy Loss in Inhomogeneous Dielectrics, *Phys. Rev. B* **2002**, 65, 115418 (1-17).
- [10] Optical Constant of Noble Metals, *Phys. Rev. B* **1972**, 6, 4370-4379.
- [11] Optical Constants of Evaporated Gadolinium Oxide, *J. Opt. A Pure Appl. Opt.* **2001**, 3, 452-454.
- [12] Vibrational-Exciton Couplings for the Amide I, II, III, and A Modes of Peptides, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 11032-11046.
- [13] Malvern Technical Notes. Zeta Potential: An Introduction in 30 minutes. <http://www3.nd.edu/~rroeder/ame60647/slides/zeta>. pdf. Accessed in Aug 2014.
- [14] Capping of Gold Nanoparticles by the Amino Acid Lysine Renders Them Water-Dispersible, *Langmuir*, **2003**, 19, 3545-3549.
- [15] Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, β -amyloid peptides and fragment, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81 (2010) 235-241.
- [16] Acquisition of Raman Spectra of Amino Acids Using Portable Instruments: Outdoor Measurements and Comparison. *Spectrochim. Acta, Part A* **2010**, 77, 978-983.
- [17] References Database of Raman Spectra of Biological Molecules. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, 38, 1133-1147.
- [18] Near-Infrared Excited Surface-Enhanced Raman Scattering of Biological Molecules on Gold Colloid I: Effects of pH of the Solutions of Amino Acids and of Their Polymerization. *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 133-138.
- [19] Surface-Enhanced Raman Scattering of Biological Molecules on Metal Colloid II: Effects of Aggregation of Gold Colloid and Comparison of Effects of pH of Glycine Solutions Between Gold and Silver Colloids. *Appl. Spectrosc.* **1999**, 53, 1440-1447.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En este capítulo se plantean las hipótesis, justificación y objetivos general y específicos para la realización de este trabajo. Estos objetivos fueron planteados para abordar de una manera sistemática y lógica el proyecto de tesis.

2.1. Hipótesis

Proponemos materiales con estructura tipo núcleo-recubrimiento conformados por nanopartículas metálicas (NPsM) e iones lantánidos (en su mayoría presentan propiedades luminiscentes y magnéticas) combinen sus propiedades, e incluso dichas propiedades se realcen para que pueda ser utilizados como un sistema multifuncional. Nanopartículas metálicas de oro de morfología esférica presentan propiedades ópticas y electrónicas particulares que son de potencial uso en aplicaciones biológicas y biomédicas. Una molécula de anclaje (AA) o una matriz de sílice inerte que no absorbe en la mayor parte del espectro visible (300-800 nm), en la superficie de las NPsM y soportando los iones lantánidos, nos permitirá un material biocompatible, más estable y con una combinación de propiedades. Además, los iones lantánidos pueden ser soportados en la superficie de dicha matriz, que con un buen control del espesor podrá permitir variar la distancia de separación entre núcleo metálico y los iones lantánidos, y por consiguiente conservar o mejorar las propiedades del material.

2.2. Justificación

En la actualidad muchas técnicas alternativas para detección, marcaje, tratamiento y cura de enfermedades aprovechan las inusuales propiedades de los nanomateriales para mejorar en diferentes aspectos las técnicas ya existentes. Algunas de las desventajas de estos nanomateriales es que en muchos casos su compleja elaboración (síntesis y bajas concentraciones de los nanomateriales) y en otros tantos sus propiedades específicas delimitan su rango de aplicación. En nuestro caso, nosotros proponemos un material multifuncional basado en la combinación de dos o más materiales que pueda ser aplicado en diferentes áreas. Un material conformado de un núcleo metálico puede ser usado para detección de moléculas biológicas mediante SERS, contraste de imágenes por RX, etc. Si el núcleo metálico es recubierto con una especie inerte como el SiO_2 hacemos más biocompatible el material, más estable en medios acuosos y además eliminamos la necesidad de usar ligandos como intermediarios que pueden generar interferencias para ciertas aplicaciones. La superficie del SiO_2 permite ser ampliamente funcionalizada con diferentes moléculas, lo que podría volver al material más selectivo en su función, también permite ser decorado o dopado con iones lantánidos que puede inferirle al material propiedades magnéticas o luminiscentes según sea el caso. Así, un control en las dimensiones nano del material y en específico del espesor del recubrimiento nos permite obtener un material híbrido que conserve e incluso mejore las propiedades de los materiales de los cuales está conformado y así pueda ser usado en diversas aplicaciones.

2.3. Objetivo General

Diseñar compositos conformados por nanopartículas de oro de morfología esférica (NPsM) y lantánidos (europio o gadolinio) con propiedades ópticas, magnéticas y físico-químicas específicas; que se puedan combinar e incluso mejorar y tengan la capacidad de jugar un papel multifuncional en aplicaciones biológicas y biomédicas.

2.4. Objetivos Específicos

El objetivo general de este trabajo de tesis se dividió en los siguientes objetivos específicos:

- a. Sintetizar nanopartículas de oro de morfología esférica
- b. Recubrir las NPsM de oro con SiO₂, generando sistemas tipo núcleo-recubrimiento.
- c. Optimizar y controlar el espesor del recubrimiento de SiO₂ sobre las NPsM.
- d. Decorar los compositos de NPsM@SiO₂ con iones europio o gadolinio.
- e. Caracterizar tamaños, morfologías y propiedades ópticas de los sistemas; mediante micrografías (TEM y SEM) y espectroscopias.
- f. Evaluar la viabilidad y toxicidad de los materiales en sistemas biológicos como lo son las células.
- g. Determinar la respuesta térmica de los sistemas irradiados con un láser, para posibles aplicaciones fototérmicas.
- h. Evaluar el realce de señales Raman (SERS) de los sistemas en moléculas biológicas, específicamente en L-cisteína.
- i. Determinar la actividad fotocatalítica de los materiales en una reacción redox para la generación de hidrógeno.

2.5. Esquema general y alcance del proyecto

Un esquema general del alcance del proyecto basado en los objetivos planteados se presenta en la **Figura 2.1**, en el que partimos del objetivo general de este trabajo, que es el de diseñar los materiales multifuncionales. A continuación, tres etapas que corresponden a la metodología de síntesis seguida para la obtención de los materiales que son: síntesis de nanopartículas metálicas mediante reducción, funcionalizar con un aminoácido (Ver **Capítulo I**) o recubrir con sílice mediante el proceso de Stöber controlado las NPsM, para finalmente incorporar el ión lantánido a la matriz de sílice mediante un proceso sol-gel como se detallara de aquí en adelante.

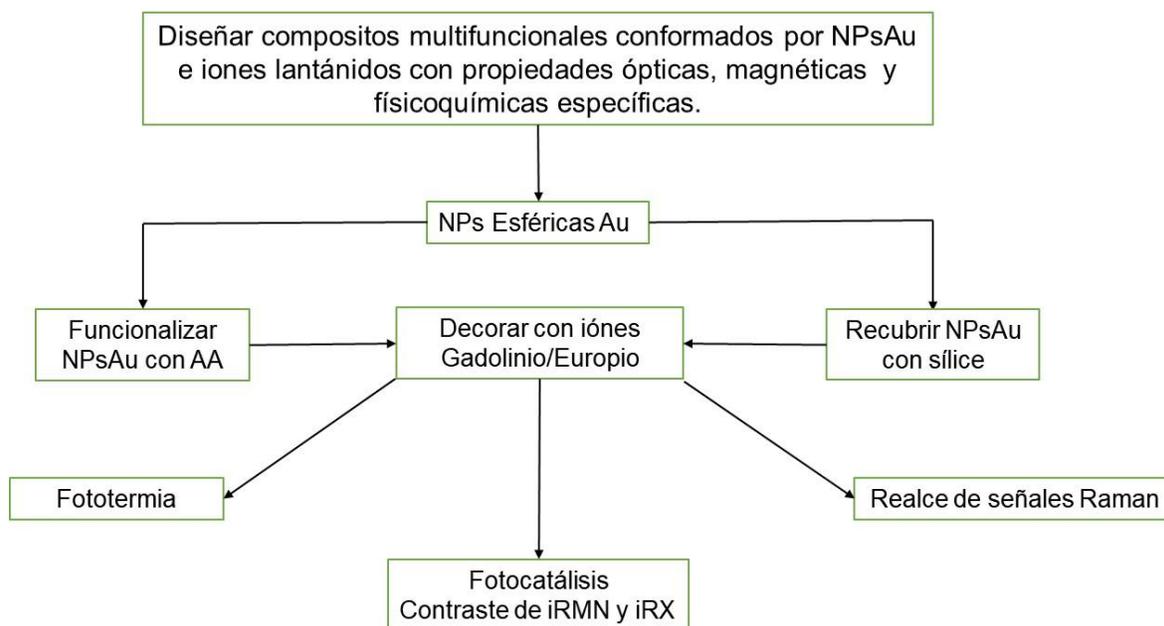


Figura 2.1. Esquema general del proyecto y su alcance.

Finalmente, los materiales se evalúan en algunas de las múltiples posibles aplicaciones para los cuales fueron diseñados como: agentes de realce de señales Raman (SERS) de moléculas biológicas que, en este trabajo en particular, usamos cisteína, un aminoácido no esencial, que presenta muchas funciones biológicas importantes, agentes para terapias fototérmicas inicialmente evaluadas in vitro en células y fotocatalizadores en una reacción de generación de hidrógeno. Entre otras muchas posibles aplicaciones que se propusieron, pero no pudieron ser evaluados por cuestiones de implementación y equipos como para agentes de contraste de imágenes (iRMN y iRX).

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

En este capítulo presentamos los materiales y reactivos usados, las metodologías para la síntesis paso a paso de los sistemas NPsM@SiO₂:Ln y el tipo de caracterizaciones realizadas a los composites obtenidos. En primera instancia partimos de la síntesis de núcleos de morfología esférica de nanopartículas metálicas (Au) usando agentes reductores suaves (potencial estándar de reducción intermedio), posteriormente se realiza un recubrimiento con SiO₂ de forma directa y controlada que se compara con otro procedimiento para realizar el recubrimiento usando moléculas como ligandos entre la superficie de las NPsM y el óxido de silicio. La incorporación de los iones lantánidos se realiza durante la formación del recubrimiento de sílice de la etapa anterior, adicionando al sistema de reacción la sal que contenga el ion de interés (europio o gadolinio, en principio cualquier lantánido puede ser incorporado). A continuación, mostramos de manera más detallada los procedimientos de síntesis para la elaboración de los materiales.

3.1. Materiales y Reactivos

Todos los reactivos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich y se usaron sin posterior purificación. Ácido tetracloroáurico (HAuCl₄.3H₂O, 99.999%) y nitrato de plata (AgNO₃, 99.99%) se usaron como precursores metálicos, como agentes reductores citrato de sodio dihidrato tribásico (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O, ≥ 99%), ácido ascórbico (C₆H₈O₆, >99%) y borohidruro de sodio (NaBH₄, 99.9%). El alcohol polivinílico (PVA, peso molecular promedio 89000-98000), bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB, >99%) y polivinil pirrolidona (PVP, promedio de peso molecular 40000) son usados como surfactantes y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 30%) como agente oxidante. Tetraetil ortosilicato (Si(OC₂H₅)₄, 98%) y (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES, >98%) como precursor de sílice, etanol absoluto (CH₃CH₂OH, >99,8%) e hidróxido amónico (NH₄OH, 28-30% en agua) para controlar la hidrólisis y como modulador de pH. Se utilizó nitrato de Europio (III) pentahidratado (EuN₃O₉.5H₂O, 99,9%) y nitrato de Gadolinio (III) hexahidratado (GdN₃O₉.6H₂O, 99,9%) como agentes dopantes. Cultivos celulares de osteoblastos adecuados en solución salina tamponada con buffer de fosfatos (PBS), Tryple express, azul de tripano bioreagent (C₃₄H₂₄N₆O₁₄S₄Na₄) para detectar las células muertas y moribundas en ensayos de citotoxicidad y para la evaluación rutinaria de la viabilidad celular, y glutaraldehído en solución (grado I, 25% en agua) se usó como agente fijador de células. El agua usada en todos los experimentos como

disolvente y para el lavado y purgado de todos los materiales fue destilada-desionizada ($\rho < 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, 24°C).

3.2. Metodología

Un esquema general del alcance del proyecto, los materiales que se proponen y sus posibles aplicaciones, se presentó en el capítulo anterior (ver **Figura 2.1**). Partiendo de un objetivo general, los materiales están conformados de un núcleo metálico de oro, posteriormente los núcleos metálicos son recubiertos con oxido de silicio para luego ser decorados con iones gadolinio o europio.

La metodología seguida para sintetizar los materiales la podemos dividir en tres etapas tal como se presenta esquematizada en la **Figura 3.1**, aunque en la práctica la etapa 2-3 ocurren casi de manera simultánea.

Partimos de un precursor metálico que es reducido a su estado de oxidación cero para generar las NPsM de morfología esférica (se puede extender a otras morfologías) en la etapa 1. En la segunda etapa mediante una modificación del proceso de Stöber realizamos un recubrimiento controlado de SiO_2 de alrededor de 50 nm para generar los sistemas núcleo-recubrimiento.

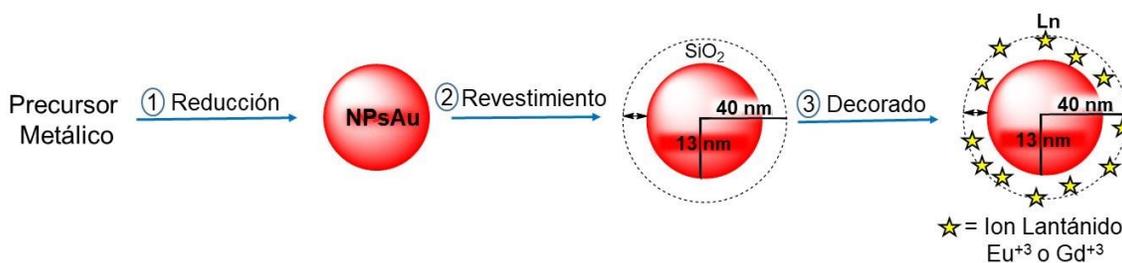


Figura 3.1. Esquema general de la metodología en 3 etapas para la síntesis de $\text{NPsM@SiO}_2:\text{Ln}$.

Por último, en la etapa 3 que ocurre de manera simultánea con la etapa 2, se adiciona una sal de europio o gadolinio al medio durante la formación del recubrimiento de SiO_2 en el núcleo metálico para someter al sistema a un proceso sol-gel.

3.3. Síntesis de los nanomateriales

3.3.1. Síntesis de nanopartículas esféricas de oro

Las nanopartículas esféricas de oro se sintetizaron según el método de reducción descrito por Turkevich [1-3], se preparó una solución acuosa de ácido tetracloroáurico (10^{-3} M) en un matraz de 100 ml que se mantuvo bajo agitación vigorosa y calentamiento hasta ebullición. Rápidamente, se inyectó una solución de citrato de sodio (1% p/p) en el matraz con la solución de ácido tetracloroáurico, y el sistema se mantiene bajo agitación y calentamiento. Después de 15 minutos de ebullición, la reacción se completó y la dispersión obtenida de color vino tinto se enfrió a temperatura ambiente [4], en la **Figura 3.2** se representa la reacción química que se lleva a cabo para la formación de las NPsAu.



Figura 3.2. Reducción del ácido tetracloroaurico en presencia de citrato de sodio para la formación de NPsAu.

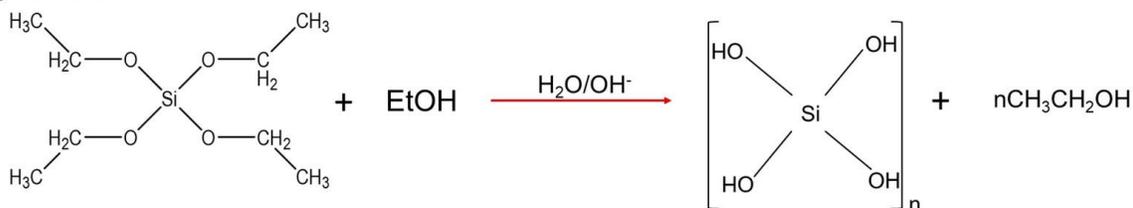
Finalmente, las NPsAu de ca. 14 nm de diámetro se filtran (Millipore, 0.45 μ m) y se dializó usando una membrana semipermeable (Tubo de diálisis, MWB de Fisherbrand 12000-14000) con una gran cantidad de agua desionizada para eliminar el exceso de reactivos.

3.3.2. Recubrimiento de Nanopartículas Metálicas con SiO_2 (NPsM@ SiO_2)

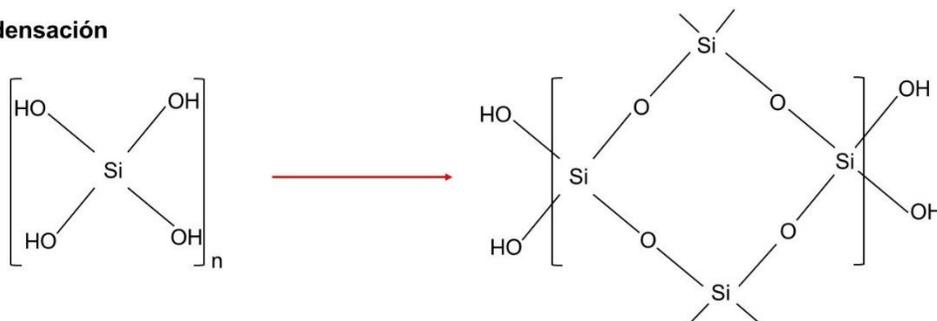
Las nanopartículas metálicas con recubrimiento de sílice se hicieron mediante una reacción controlada, usando una modificación del proceso de Stöber [6]. El recubrimiento con una capa de óxido de silicio homogénea se llevó a cabo mediante una inyección lenta del precursor TEOS para controlar la formación y deposición de monómeros durante la síntesis [7]. Las dos etapas para la formación de SiO_2 que son: A) la hidrólisis donde los grupos etilo del precursor TEOS son sustituidos por grupos OH generando el hidróxido de silicio como intermediario (monómeros) y B) la condensación

del hidróxido de silicio en la que varias unidades del hidróxido se polimerizan formando enrejados de estructura bidimensional, que se representan a continuación:

A) Hidrólisis



B) Condensación



La **Figura 3.3** muestra las condiciones de reacción para generar el recubrimiento de SiO₂ que siguen las dos etapas anteriores, pero ahora sobre un núcleo de oro y una imagen del sistema usado en el laboratorio para generar el recubrimiento de las NPsM que en ese caso correspondían a nanopartículas esféricas de oro (Izquierda), además se aprecia el sistema para la inyección controlada del precursor TEOS.

En un matraz, se añadieron en una proporción (1:8) NPsM 0.5 μM en etanol. El pH de la solución resultante se ajustó entre 9-10 utilizando hidróxido de amonio, la mezcla se agitó vigorosamente (500-600 RPM) e inmediatamente después se inyectaron 100 μl de TEOS a una velocidad de 5 μL/Min. La cantidad total de TEOS añadida se eligió en función del espesor del revestimiento de sílice y del número de nanopartículas metálicas presentes en el medio [8-9].

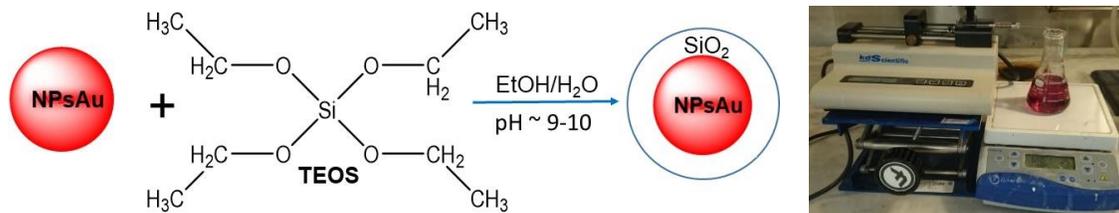


Figura 3.3. Generación del recubrimiento de SiO₂ sobre nanopartículas de oro e imagen del montaje utilizado.

Finalmente, la mezcla de reacción se agitó continuamente durante al menos 3 horas más para asegurar una hidrólisis completa. La dispersión coloidal obtenida fue purificada del exceso de reactivo y núcleos de nanopartículas de SiO₂ sin recubrir por centrifugación repetida y lavados con mezclas de agua destilada y etanol. Esta metodología permite obtener sistemas NPsM@SiO₂ con aprox. 80 nm de diámetro de una manera fácil y directa, sin la necesidad de funcionalizar la superficie de las nanopartículas o usar un ligando entre las NPsM y el óxido de silicio como se propone generalmente en múltiples trabajos.

Recubrimiento de nanopartículas metálicas con SiO₂ mediante funcionalización

También se realizó el procedimiento de recubrimiento de nanopartículas de oro con SiO₂ usando dos moléculas diferentes como ligandos para acoplar la superficie de las nanopartículas con la coraza de óxido de silicio y así poder compararlo con el procedimiento directo mencionado anteriormente.

a. Au-SiO₂ usando PVP como intermediario

La funcionalización de NPsAu con polivinilpirrolidona (PVP) se llevó a cabo mediante simple adsorción del polímero en la superficie de las partículas de oro. Una dispersión coloidal de partículas metálicas se dejó en continua agitación por 24 horas en presencia del PVP, esta dispersión fue centrifugada y redispersada para su posterior uso [10-11]. El revestimiento de SiO₂ se llevó a cabo mediante el método de Stöber, NPs funcionalizadas con PVP fueron adicionadas a una solución (EtOH:H₂O). La solución resultante fue llevada a pH (9-10) adicionando amoníaco bajo agitación constante y como paso final se adicionó lentamente el tetraetil ortosilicato (TEOS) a razón de 5 µl/Min para controlar la velocidad de hidrólisis. Finalmente, la mezcla se deja agitando por 3 horas, se centrifuga y redispersa en agua al menos 3 veces hasta eliminar el amoníaco y el etanol del medio [6, 8].

b. Au-SiO₂ usando APTES como intermediario

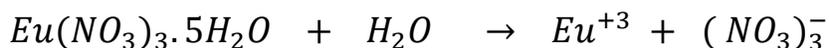
La funcionalización de NPsAu con (3-aminopropil) trietoxi silano se lleva a cabo por coordinación del grupo amino con la superficie del oro. A una dispersión de NPsAu en agitación constante se le adiciona APTES, la mezcla se deja reaccionar un par de horas hasta que se lleve a cabo la formación del complejo NPsAu-APTES [12-13]. El recubrimiento de sílice de los sistemas NPsAu-APTES se llevan

a cabo de la misma forma como aparece en el inciso anterior. La metodología usada anteriormente permite obtener NPsAu recubiertas de sílice con diámetros de entre 130 y 160 nm.

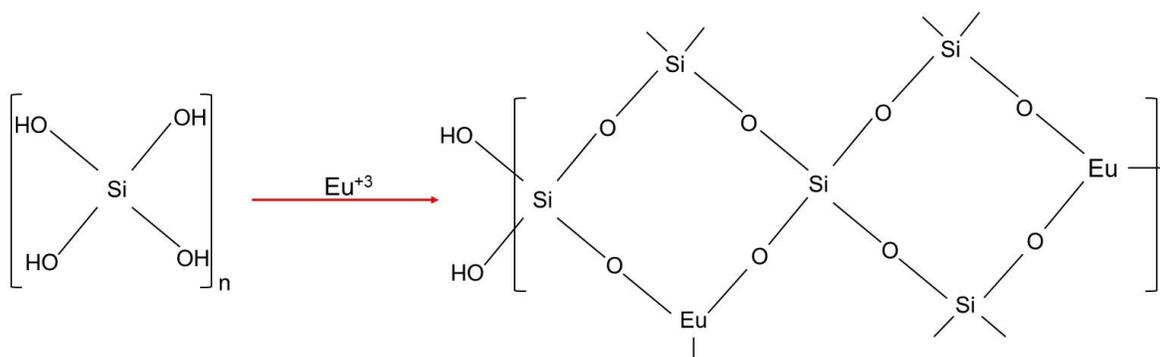
3.3.3. Síntesis de compositos de $NpsM@SiO_2$ decorados con lantánidos

El decorado con iones lantánidos (Ln^{+3}) de los sistemas $NpsM@SiO_2$ se obtiene siguiendo el mismo procedimiento que para los recubrimientos de NPsM con sílice, excepto por la adición de una solución de nitrato de Europio (III) o gadolinio (III) inmediatamente después de la inyección de TEOS al medio de reacción, la sal del lantánido en solución acuosa es dissociada a sus respectivos iones (A) y al adicionarse al medio de reacción durante la polimerización del óxido de silicio (B) se asegura la incorporación de los iones a lo largo de toda matriz tal y como se muestra a continuación:

A) Hidrolisis de la sal de europio



B) Incorporación del lantánido en la matriz de sílice



En este caso, después de la adición controlada de TEOS, se gotean 0.25 ml de nitrato de europio (III) pentahidrato (1 mM) en la mezcla y la reacción procede de la misma manera que en el procedimiento 3.3.2. Adicionalmente, el sistema se calienta a reflujo a 60 °C durante una hora [3, 14]. El material obtenido es centrifugado y lavado en repetidas ocasiones (EtOH:H₂O), y puede ser redispersado en solventes polares o no polares según convenga. Finalmente, el material también puede ser secado (110 °C) en estufa y estabilizado térmicamente (calcinar a 600 °C) para ser conservado en polvo [15].

3.4. Caracterización de los materiales

La espectroscopia de absorción UV-Vis se utilizó para determinar la banda de absorción correspondiente al plasmón de resonancia (LSPR) de las NPsAu desnudas, NPsAu recubiertas con sílice, y de los nanocompuestos Au@SiO₂:Eu. Usando la ley de Beer-Lambert⁸, mediante absorción UV-Vis se determinó la concentración de nanopartículas de oro y el coeficiente de absorción molar. Los espectros de absorción fueron obtenidos con un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50.

El análisis de la morfología y tamaño de NPsM en cada paso del proceso para obtener el sistema híbrido NPsM@SiO₂:Eu se llevó a cabo utilizando un Microscopio de Electrones de Transmisión (TEM, JEOL, JEM modelo 1230) y Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, Inspect f50 de alto vacío). El tamaño de las nanopartículas y los espesores del recubrimiento se midieron de 100 partículas con el software ImageJ 1.48v (32-bits, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

El radio hidrodinámico de los sistemas fue evaluado en un analizador de partículas Delsa Nano C, Beckman Coulter.

Los espectros Raman de L-cisteína se registraron utilizando un sistema Micro-Raman Horiba Jobin Yvon iHR320 con objetivo 100x (Olympus, N.A), a la longitud de onda de excitación de 532 nm y 784 nm. La intensidad del incidente fue de 15 mW en la muestra, y el tiempo de integración se fijó en 10 s. La región investigada tenía un área de 1 μm². La señal del aminoácido sin NPsM se midió a una concentración de 5x10⁻⁵ M y se usó como referencia.

Los patrones de difracción de rayos X (DRX) de los materiales fueron tomados de una gota de cada uno de los compositos secada a 110 °C y del material calcinado a 600 °C depositada sobre un sustrato de silicio puro <100>.

Las medidas de la potencia de los láseres usados en los experimentos se realizaron en un Potenciómetro Óptico Newport 1918-C Detector Óptico 91D-SL-D3R Rango espectral 400-1100 nm. Potencia máxima 2 W.

Las termografías fueron tomadas con una cámara IR FlexCam portable Infrared system.

⁸a = ε*b*C

La citotoxicidad de los materiales fue evaluada mediante un test de tinción histológica con azul de tripano y el conteo celular se realizó utilizando un microscopio óptico y una cámara de Neubauer.

3.5. Evaluación y aplicaciones de los nanocompositos

3.5.1. Ensayo de biocompatibilidad *in vitro*

Osteoblastos de hueso de maxilar inferior humano fueron cultivados, el proceso de cultivo completo se basó en el método de Escobar-García et al [18]. En una caja de 96 pozos se depositaron 100 μ l de células (~1'600 000 células/ml) junto con 100 μ l de medio de cultivo, la mezcla se incubó durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Después de 24 horas se cambió el medio de cultivo de una caja de 96 pozos y se depositaron 100 μ l de las muestras de NPsAu, NPsAu@SiO₂ y NPsAu@SiO₂:Eu respectivamente tal y como se distribuye en la **Tabla 3.1**, las células junto con las muestras se incubaron 24 horas y al día siguiente el medio de cultivo se retiró del pozo y se incubo nuevamente durante 10 min a 37 °C en presencia de tripsina al 0.125% para desprender las células fijadas a las paredes de los pozos.

	Células + Medio Cultivo	H ₂ O ₂	NPsAu	NPsAu@SiO ₂	NPsAu@SiO ₂ :Eu
Control (+)	200 μ l				
Control (-)	200 μ l	100 μ l			
Muestras	200 μ l		100 μ l	100 μ l	100 μ l

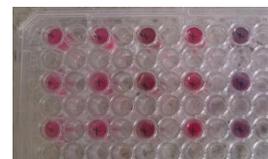


Tabla 3.1. Distribución del contenido de las cajas de crecimiento celular.

Finalmente, las células se precipitaron mediante centrifugación suave (10 min a 1000 rpm), y fueron lavadas con solución salina de PBS para su posterior conteo. La viabilidad celular de las células sedimentadas se determinó mediante un ensayo de tinción con azul de tripano. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, y con un control respectivo de células vivas y muertas.

3.5.2. Prueba de fototermia en células

Siguiendo la metodología anterior se incubaron osteoblastos provenientes de maxilar humano con las muestras de: NPsAu (10⁻³ M), NPsAu (5*10⁻⁴ M), NPsAu@SiO₂, NPsAu@SiO₂:Eu y los respectivos controles únicamente con células. Al tercer día, las cajas con los cultivos celulares son expuestas 90 segundos a radiación de dos fuentes y potencias diferentes; una curva de temperatura como control

se registró tomando imágenes termográficas en los tiempos 0, 2 y 4 minutos para cajas que contenían medio de cultivo y partículas, pero en este caso sin presencia de células. La **Figura 3.4** muestra fotografías de los sistemas usados para realizar las mediciones fototérmicas, dos fuentes que emiten a 532 nm de potencias diferentes 20 y 400 mW, y una cámara termográfica para medir los incrementos de temperatura a diferentes instantes de tiempo.

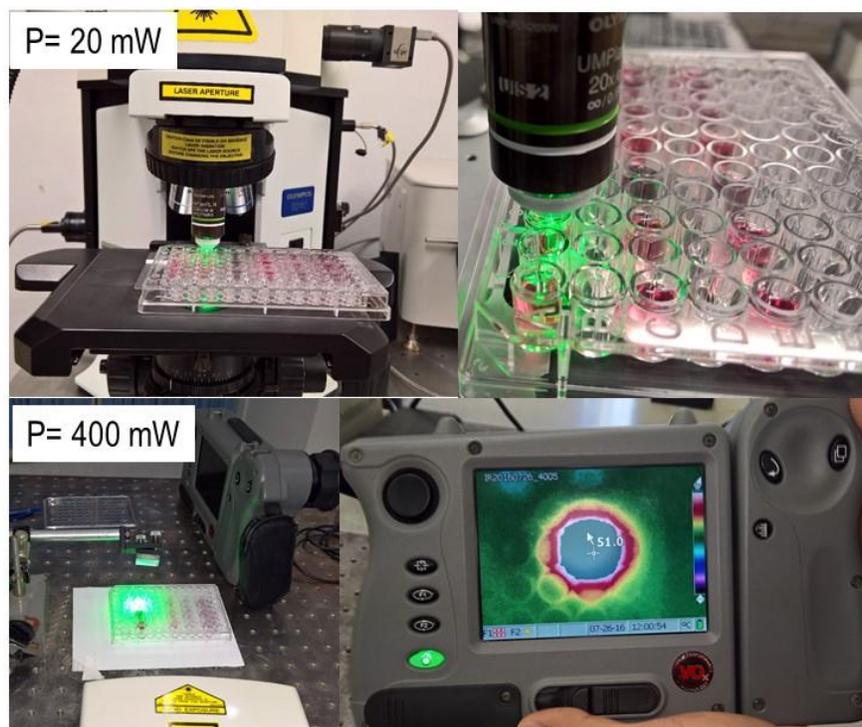


Figura 3.4. Imágenes de los sistemas usados para realizar las evaluaciones fototérmicas.

Este tipo de ensayos no sólo se realizaron con la fuente de emisión verde, sino también se utilizó una fuente de emisión infrarroja (785 nm), de igual manera a dos potencias diferentes (20 y 135 mW). Después de exponer los cultivos celulares a la radiación, se procede de la misma forma que en el apartado anterior para el conteo celular mediante el ensayo de tinción con azul de tripano.

3.5.3. Evaluación de sustratos SERS en L-Cisteína como molécula modelo

Los sustratos se hicieron en discos de silicio cortados en cuadros de aproximadamente 1 cm², se lavaron en una mezcla agua-jabón y luego se pusieron por 30 minutos en una mezcla de ácido sulfúrico-peróxido de hidrógeno comúnmente llamada solución piraña a 60 °C para eliminar residuos

orgánicos, grasas y óxidos de la superficie. Los sustratos de Si se lavaron con agua y etanol, para posteriormente ser secados a temperatura de 110 °C, tal y como se observa en la **Figura 3.5**.

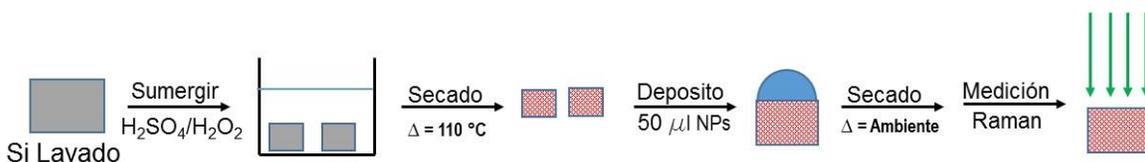
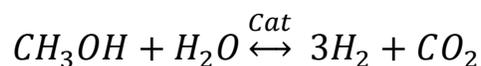


Figura 3.5. Preparación de sustratos SERS para realce de señales en espectroscopia Raman.

A los sustratos obtenidos se les deposita una muestra con 50 µl de nanopartículas y nanocompositos, y se dejaron secar a temperatura ambiente, los sustratos tratados fueron usados para evaluar la variación en la intensidad de los modos de vibración en el espectro Raman de una solución diluida de L-cisteína (10⁻⁵M) en presencia y ausencia de nanopartículas metálicas usando una fuente de radiación visible de 532 nm y 20 mW de potencia. Además de comparar el efecto producido en el realce con relación a las nanopartículas de oro desnudas.

3.5.4. Evaluación fotocatalítica de los materiales para reducción de metanol

Los ensayos fotocatalíticos se realizaron usando 20 mg del sistema NpsAu@SiO₂:Eu como catalizador de la reacción de descomposición de metanol en presencia de agua a una proporción (1:1), la reacción química se muestra a continuación:



El catalizador se puso en el medio de reacción, se dejó 30 minutos en agitación y ausencia de luz para asegurar el equilibrio adsorción/desorción, después se burbujeó nitrógeno para desgasificar la solución. Usando una lámpara UV (254 nm) como fuente de excitación la fotorreacción fue monitoreada por 6 horas en un cromatógrafo de gases y los resultados obtenidos fueron ajustados a una curva de calibración de concentración de hidrógeno gaseoso realizada previamente.

Referencias

- [1] Colloidal Gold. Part I: Historical and Preparative Aspects, Morphology and Structure, J. Turkevich; *Gold Bull*, **1985**, 18 (3), 86-91.
- [2] Colloidal Gold. Part II: Colour, Coagulation, Adhesion, Alloying and Catalytic Properties, J. Turkevich; *Gold Bull*, **1985**, 18 (4), 125-131.
- [3] Experimental Evidence of Luminescence Quenching at Long Coupling Distances in Europium (III) Doped Core-shell Gold Silica Nanoparticles, *Gold Bull*, **2013**, 46, 349–355.
- [4] Biocompatible, Multiresponsive Nanogel Composites for Codelivery of Antiangiogenic and Chemotherapeutic Agents, *Chem. Mater.*, **2016**, 28 (21), 7947–7954.
- [5] One Pot Synthesis of Multi-plasmonic Shapes of Silver Nanoparticles, *Mater. Lett.*, **2013**, 105, 62-64.
- [6] Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *J. Colloid Interface Sci.*, **1968**, 26, 62-69.
- [7] Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 2373–2433.
- [8] Various Au Nanoparticle Organizations Fabricated through SiO₂ Monomer Induced Self-Assembly, *Langmuir*, **2011**, 27(3), 895–901.
- [9] Temperature-Induced Interfacial Change in Au@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles Detected by Extended X-ray Absorption Fine Structure, *J. Phys. Chem. C*, **2010**, 114 (1), 41-49.
- [10] A General Method to Coat Colloidal Particles with Silica, *Langmuir*, **2003**, 19, 6693-6700.
- [11] Sorption Modification of Fine Silica with Polyvinylpyrrolidone, *Russian J. App. Chem.*, **2001**, 74 (12), 2017-2020.
- [12] Micro-patterns of Au@SiO₂ core-shell nanoparticles formed by electrostatic interactions, *App. Surf. Sci.*, **2008**, 254, 1684–1690.
- [13] Synthesis of Nanosized Gold-Silica Core-Shell Particles, *Langmuir*, **1996**, 12, 4329-4335.
- [14] Ag-SiO₂-Er₂O₃ Nanocomposites: Highly Effective Upconversion Luminescence at High Power Excitation and High Temperature, *Sci. Rep.*, **2014**, 4 (5087), 1-9.
- [15] Upconversion emission enhancement in silica-coated Gd₂O₃:Tm³⁺, Yb³⁺ nanocrystals by incorporation of Li⁺ ion, *Mater. Chem. and Phys.*, **2010**, 123, 806–810.
- [16] Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method, *Chem. Mater.*, **2003**, 15 (10), 1957-1962.
- [17] Thermal Stability of Gold Nanorods in an Aqueous Solution, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **2010**, 372, 177–181.
- [18] In vitro evaluation of osteoblastic cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration, *Mater. Sci. Eng.: C Mater. Biol. Appl.*, **2017**, 75, 445-453.

Capítulo IV: Análisis y discusión de resultados

En este capítulo presentamos los resultados de los distintos métodos de caracterización que se realizaron a los nanomateriales como: absorción UV-Vis, micrografías electrónicas, EDX, DLS, patrones de difracción de rayos X, FT-infrarrojos, termografías, entre otras. Además, se realiza el respectivo análisis y discusión de los resultados, para demostrar si la preparación de los nanocompositos va en detrimento de las propiedades de cada uno de los materiales que lo conforman.

4.1 Espectroscopia de absorción UV-Vis y plasmón de resonancia de los sistemas

Las nanopartículas de oro de morfología esférica con diámetros alrededor de 15 nm presentan una única banda de absorción correspondiente a su plasmón de resonancia dipolar [1-2]. Los espectros de absorción de los materiales fueron tomados para determinar la posición de la banda de absorción de las nanopartículas usadas y al mismo tiempo para verificar si el diseño de los sistemas modifica dichas propiedades ópticas. La **Figura 4.1** muestra los espectros de absorción de las NPsAu, NPsAu@SiO₂ y NPsAu@SiO₂:Eu, la banda de absorción que se aprecia corresponde al plasmón de resonancia del oro.

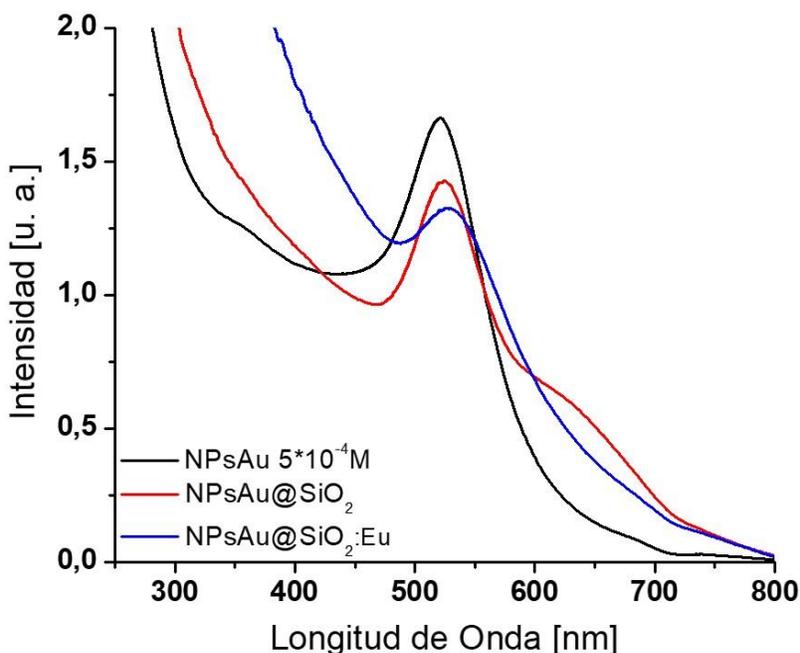


Figura 4.1. Espectros de absorción UV-Vis de NPsAu, Au@SiO₂ y Au@SiO₂:Eu.

En el caso de las nanopartículas usadas, la banda de máxima absorción está ubicada a 522 nm (curva azul), similar al que se reporta en la bibliografía para partículas con diámetros alrededor de 15 nm [3-4]. La **Figura 4.1** también presenta los espectros de los sistemas AuSiO₂ y AuSiO₂:Eu y en éstos se puede apreciar que se conserva la banda de absorción correspondiente al plasmón de resonancia con un ligero desplazamiento de su posición hacia el rojo (526 y 528 nm, respectivamente), que no son significativos y pueden deberse al cambio en el entorno de la partícula metálica debido al recubrimiento de óxido de silicio, cuyo índice de refracción es ligeramente mayor al del medio^{9,10}.

La **Figura 4.2** ilustra los sistemas de NPsAu y NPsAu@SiO₂ que se encuentran dispersos en un medio acuoso, donde se muestra cómo el entorno de las nanopartículas de oro se ve modificado por el recubrimiento de sílice en los sistemas NPsAu@SiO₂. Este ligero desplazamiento de la banda de absorción puede asociarse al espesor del recubrimiento de sílice que para dimensiones menores o iguales a las dimensiones de la nanopartícula no se aprecia, pero que para espesores superiores comienza a presentar este desplazamiento al rojo teniendo como máximo corrimiento para espesores alrededor de 80 nm, para valores superiores ya no presenta cambios apreciables [4-6].

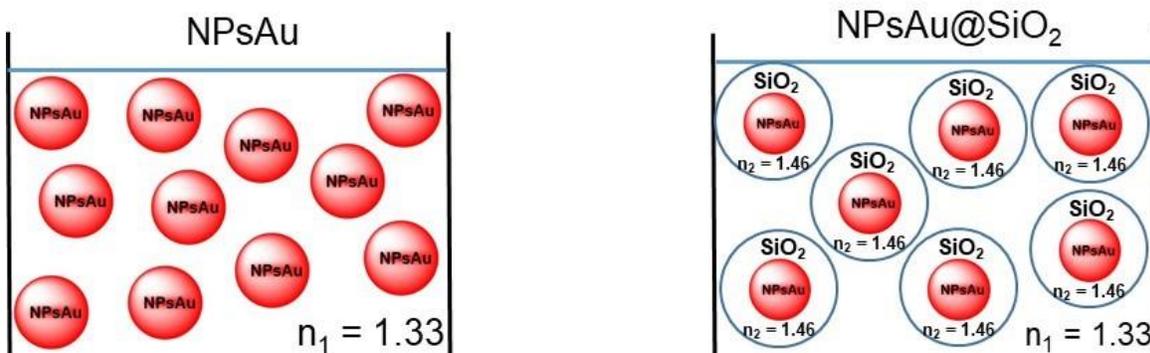


Figura 4.2. Representación del medio de refracción de los sistemas dispersos en solución acuosa.

En cuanto al sistema correspondiente al compuesto NPsAu@SiO₂, en su espectro de absorción también se aprecia un pequeño hombro desplazado hacia la derecha alrededor de los 650 nm, y esto se debe a sistemas que se generan donde el núcleo metálico no está formado por una única partícula

⁹ $n_{\text{agua}} = 1.33$.

¹⁰ $n_{\text{SiO}_2} = 1.46$.

sino por el contrario por dos o más (dímeros, trímeros o aglomerados). Esta banda puede hacerse más evidente cuando se usan nanopartículas con muy baja estabilidad, por lo cual su pequeña presencia en comparación con la banda del plasmon de resonancia propia del oro (curva azul) nos da un indicio que la mayor proporción corresponden a los sistemas conformados por núcleos de nanopartículas individuales [33]. El sistema completo AuSiO₂:Eu presenta una curva de absorción similar a la que acabamos de describir, mientras que la banda semidefinida propia de los semiconductores para el óxido de silicio no se aprecia debido a que esta comienza a aparecer por debajo de los 300 nm.

Los espectros de absorción muestran que, si bien se presenta un leve desplazamiento en la banda de absorción del oro en los compositos, éste no es significativo y las propiedades de absorción debidas al núcleo metálico no se ven perturbadas por efecto del recubrimiento de sílice.

También se aprovechó la espectroscopia de absorción UV-Vis para determinar la concentración de las NPsAu [7-8], usando una curva de calibración de la concentración de las NPsAu como la que se presenta en la **Figura 4.3** (Derecha) donde se tomó el espectro de dispersiones de oro a diferentes concentraciones (0.27, 0.67, 1, 1.3, 2.7, 3.3, 4.7 y 5.3 nM; Ver **Figura 4.3** Izquierda). Correlacionando el valor de la absorbancia de la banda de máxima absorción (522 nm) con la respectiva concentración como una función lineal tal como lo expresa la ley de Lamber-Beer, en la gráfica se aprecia la función que representa mejor los valores obtenidos y el coeficiente de regresión lineal que nos dice qué tan bueno es el ajuste de los datos respecto a la función.

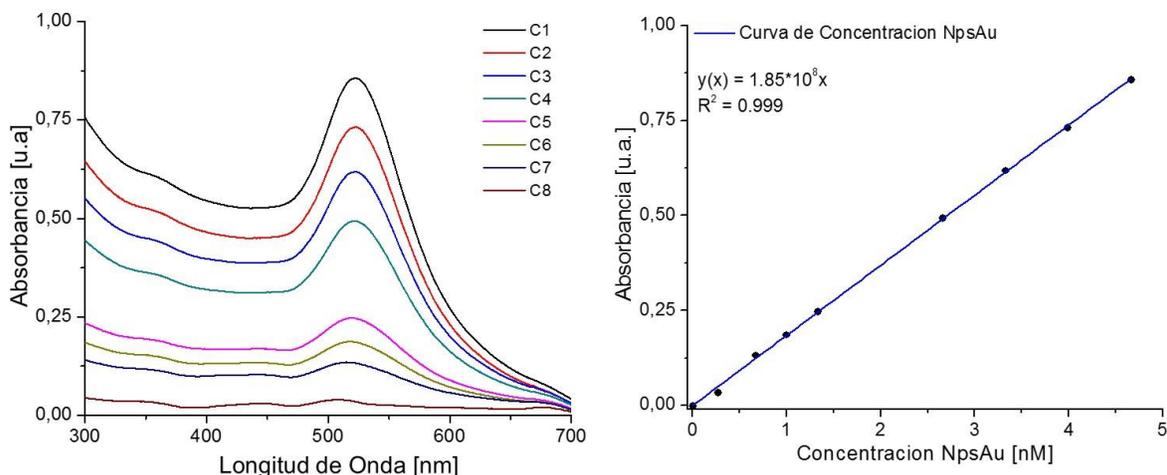


Figura 4.3. Espectros de absorción UV-Vis de NPsAu a diferentes concentraciones (Izq.) y curva de calibración en función de la absorbancia (Der.).

Sobre la gráfica también se observa la función lineal que representa la recta ($y(x) = 1.85 \cdot 10^8 \cdot x$), cuya abscisa corresponde a la absorbancia y la ordenada a la concentración de las nanopartículas¹¹. La pendiente de la recta corresponde a una propiedad de las nanopartículas usadas, como lo es el coeficiente de absorción molar ($\epsilon = 1.85 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Este valor va a depender del tamaño de las nanopartículas y concuerda bastante bien con los valores ya reportados en la literatura para este mismo tipo de partículas [9-10].

Además, el coeficiente de absorción molar está directamente relacionado con la sección transversal (cross-section) de la nanopartícula¹² [2], para las nanopartículas de oro usadas la sección transversal de absorción es de $7 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$ y como ya se mencionó anteriormente es varios ordenes de magnitud mayor que la mayoría de colorantes usados para aplicaciones fototérmicas como lo son: indiocianina, rodamina o verde de malaquita [11-13].

Usando la curva de calibración, la concentración de las nanopartículas de oro se determina realizando una dilución para escalar a dicha curva de calibración el valor de la absorbancia obtenida. Encontramos que la concentración de las nanopartículas es de $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (14 nM), este valor es muy importante puesto que sirve para determinar la cantidad de nanopartículas presentes en el medio.

¹¹ $[\text{Au}]/\#\text{átomosAu} \cdot \text{partícula}$.

¹² $0.2303 \cdot [\epsilon]/N_A$.

4.2. Morfología y tamaño de los nanomateriales por DLS, TEM y SEM

Inicialmente el tamaño de partícula de los materiales sintetizados fue determinado por DLS y después corroborado por micrografías de transmisión y barrido electrónico (TEM y SEM). Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.1**, en esta se presenta los tamaños de: las nanopartículas de oro, la sílice sintetizada usando el mismo procedimiento que se utilizó para recubrir las NPsAu y el sistema recubierto núcleo-recubrimiento de NPsAu@SiO₂. Comparando los resultados obtenidos por las dos técnicas podemos ver que los tamaños por DLS nos dan una buena aproximación del diámetro de partícula (entre 10-20% mayor que los determinados por micrografías electrónicas) para la sílice y los compositos de NPsAu@SiO₂ [8], no tan buena para las NPsAu donde su tamaño es casi del doble que el obtenido por TEM.

Muestra	Diámetro de Partícula DLS [nm]	Diámetro de Partícula TEM o SEM [nm]
NPsAu	22.6 ± 1.6	13.4 ± 1.9
SiO ₂	53.2 ± 0.3	48.2 ± 6.5
NPsAu@SiO ₂	92.2 ± 1.3	80.8 ± 6.5

Tabla 4.1. Comparación entre los diferentes tamaños de partícula obtenidos por DLS, SEM o TEM.

Esta diferencia se debe al límite de detección del equipo (DLS) que está muy próximo al tamaño de las nanopartículas de oro, para el caso de partículas más grandes la técnica nos da una buena aproximación y nos sirve en gran medida para ajustar las cantidades usadas durante las diferentes etapas de la síntesis de los materiales cuando no se tiene a la mano la caracterización por alguna microscopía electrónica.

El diámetro de partícula presentado en la **Tabla 4.1** por SEM o TEM fue obtenido del promedio de 100 partículas presentes en diferentes micrografías¹³. Vale la pena mencionar que los valores del diámetro para los sistemas decorados con iones lantánidos no fueron incluidos en la tabla, debido a que las dimensiones de estos sistemas no presentan cambios significativos con el sistema NPsAu@SiO₂.

La **Figura 4.4** presenta una micrografía típica obtenida de cada uno de los sistemas NPsAu, SiO₂ y NPsAu@SiO₂, y un histograma con la distribución de los valores del diámetro obtenidos de la medición

¹³ Conteo usando el software ImageJ.

de 100 partículas. Para el caso del oro se puede apreciar que la dimensión del diámetro promedio para 100 partículas es de 13.4 nm tal como se muestra en la tabla anterior, una aproximación del número de átomos que en promedio conforman las nanopartículas de oro obtenidas se calcula usando su densidad teórica, que a su vez se obtiene de su sistema de cristalización cubico centrado en las caras¹⁴, el diámetro promedio calculado anteriormente y el peso atómico del oro¹⁵ (197.97 g/mol).

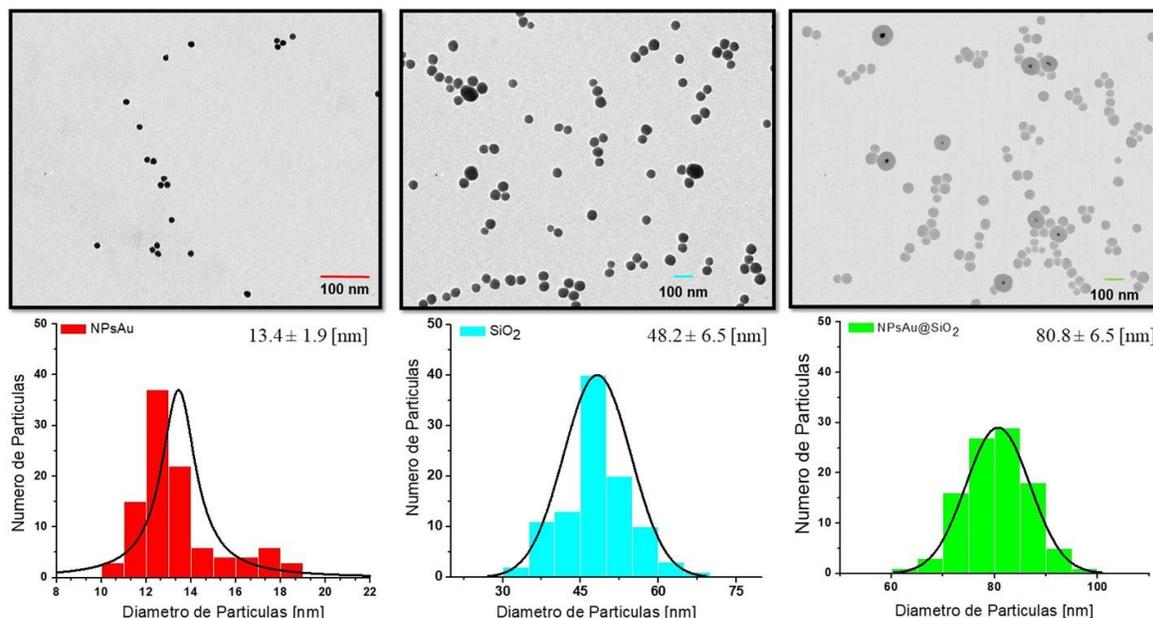


Figura 4.4. Micrografías TEM y distribución de tamaños de los sistemas NPsAu, sílice y NPsAu@SiO₂.

Las nanopartículas de oro sintetizadas de diámetro promedio 13.4 nm están conformadas por alrededor de 75,100 átomos de oro¹⁶, esto quiere decir que la concentración de nanopartículas de oro es de $8.4 \cdot 10^{15}$ partículas/L. El contenido aproximado del número de partículas de oro en el medio de reacción nos permite tener un mejor control en la cantidad de precursor (TEOS) usado en la etapa de formación del recubrimiento de sílice y de lantánido en el decorado, aun así y como veremos más adelante es inevitable la formación de exceso de núcleos de sílice.

Las nanopartículas de sílice se sintetizaron usando la misma metodología empleada para recubrir NPsAu como un control para determinar las posibles dimensiones que se pueden obtener en el

¹⁴ $\rho_{Au} = 19.28 \text{ g/cm}^3$.

¹⁵ www.webelements.com.

¹⁶ $\frac{\pi}{6} * D^3 * \rho_{Au} * \frac{N_A}{P. A. Au}$.

sistema final, la micrografía del centro en la **Figura 4.4** muestra núcleos de sílice de 48.2 nm en promedio que son muy cercanos en dimensiones al espesor del recubrimiento que se forma en presencia de las nanopartículas de oro. También podemos ver en la micrografía que corresponde al sistema NPsAuSiO₂ como el control en el contenido del precursor de sílice no sólo juega un papel importante en la dimensión final de la partícula sino en la formación del exceso de núcleos de sílice que se puede apreciar y que perjudica las propiedades de los materiales.

Una forma de controlar las dimensiones y el exceso de núcleos de sílice libre es controlando los parámetros que intervienen en su formación, como la concentración de TEOS y su velocidad de adición, hidrólisis, pH del medio de reacción, temperatura, tiempo de reacción, etc. En nuestro caso las dos variables que modificamos fueron la concentración del precursor de sílice y la hidrólisis mediante el control de la adición de este.

Para garantizar el recubrimiento específico de las nanopartículas de oro se evaluaron tres métodos tal y como se describió en el capítulo anterior (Sección 3.3.2-3.3.3), en dos de ellos se usaron dos moléculas (PVP y APTES) para funcionalizar la superficie del oro y la tercera se realizó la síntesis de forma directa sin usar intermediarios. La **Figura 4.5** muestra una micrografía correspondiente a cada uno de los 3 métodos usados para los sistemas de nanopartículas de oro recubiertas con sílice.

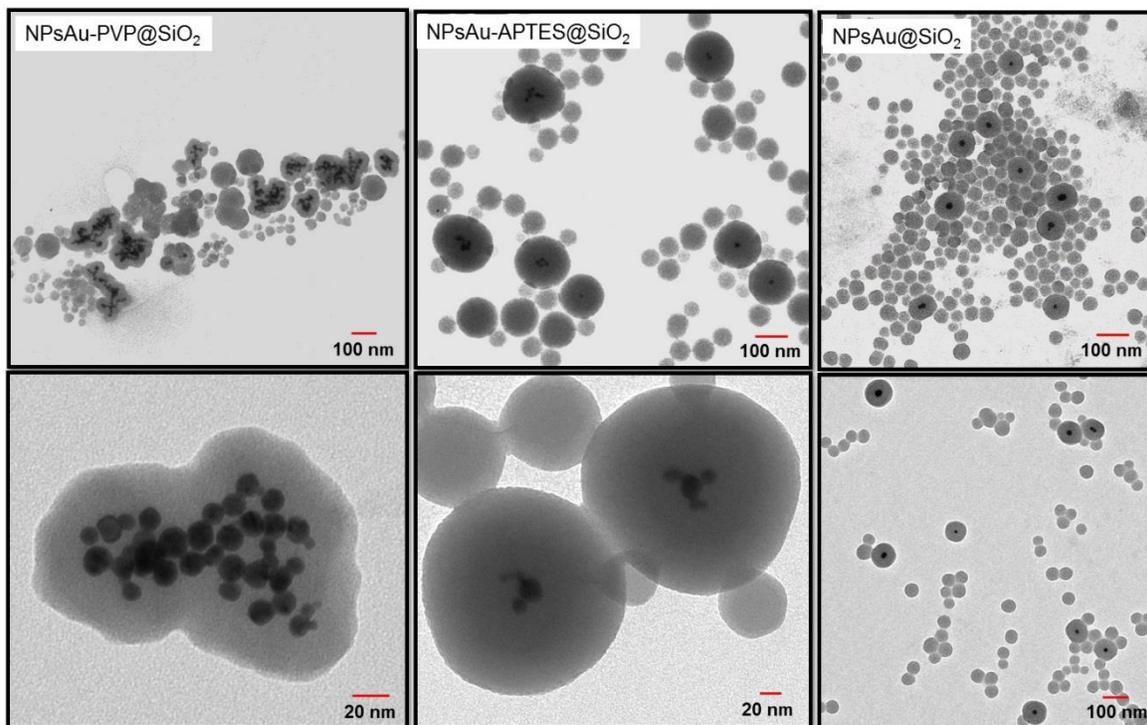


Figura 4.5. Micrografías TEM de los sistemas de NPsAu recubiertas con sílice de forma directa o mediante funcionalización de la superficie.

Para el primer sistema en el que se usó PVP vemos que las partículas han perdido estabilidad y se concatenaron por lo cual el recubrimiento se produce para los aglomerados presentes en el medio, en el segundo sistema se usó el APTES para funcionalizar y en la micrografía vemos núcleos de oro de forma cuasi-homogénea pero no todos estos núcleos son conformados de partículas individuales y en el tercero, que corresponde al sistema sin molécula para funcionalizar, se puede apreciar que el recubrimiento se realiza en su mayoría para núcleos individuales y sus dimensiones son del orden esperado (100 nm).

En las micrografías presentes de la **Figura 4.5** podemos ver la presencia de exceso de sílice libre que se forma, siendo más evidente en la que presenta los resultados para el recubrimiento de forma directa, esto es debido a que por esta metodología, el crecimiento de la sílice es menor y los núcleos de la sílice libre también lo son, por lo cual se genera un gran número de partículas de dimensiones menores comparado con los sistemas funcionalizados.

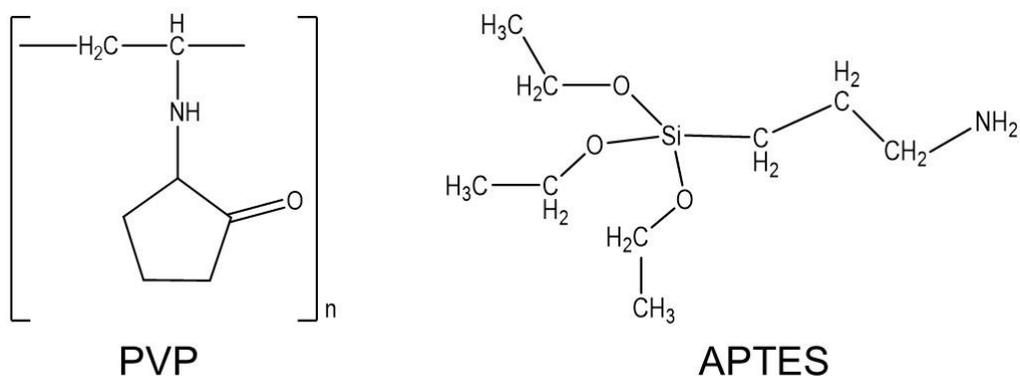


Figura 4.6. Estructura química de moléculas usadas para funcionalizar las NPsAu.

Después de obtener los resultados anteriores nos declinamos por seguir la metodología para el recubrimiento de forma directa puesto que con ésta se obtuvieron recubrimientos más homogéneos y núcleos conformados de una sola partícula. Contrario a lo que esperábamos que era un mejor recubrimiento con las partículas funcionalizadas fue peor, los resultados responden en sí a la forma como interaccionan estas especies químicas con las NPsAu. En el caso del PVP (**Figura 4.6**) este polímero puede interaccionar con la superficie del metal mediante el oxígeno presente en su estructura y luego envuelve las nanopartículas tal como se reporta en numerosos trabajos, el inconveniente está en el resto de la estructura del PVP que es hidrófoba y que explica su baja solubilidad en medio acuoso por lo cual es necesario tener en cuenta el peso molecular de este polímero y en función de la concentración de NPsAu encontrar la concentración óptima de PVP que las estabilice.

El APTES (Ver, **Figura 4.6**) a diferencia del PVP puede interaccionar con el oro por su grupo amino (NH₂) y durante la hidrólisis de la misma forma como ocurre con el TEOS libera los grupos etilos (CH₃CH₂) en forma de etanol dejando libre el grupo silicato (SiO₃)⁻² para interaccionar con la misma especie proveniente del TEOS y así formar la capa de sílice, es decir que interacciona por dos partes diferentes de la molécula (Ver **Figura 4.7**). En este caso hay que tener en cuenta que el exceso de APTES también promueve la formación de sílice y por esto las dimensiones de los materiales fueron más grandes comparados con los otros dos procedimientos, aunque vale la pena recalcar que una óptima proporción de APTES que estabilice las NPs de oro presentes en el medio nos puede llevar a resultados similares e incluso mejores que usando el método directo. La funcionalización con esta especie química presenta mejores resultados que con PVP, y en los dos casos sólo hay que encontrar

la concentración óptima que establezca las NPsAu, ya que esta es la clave para generar sistemas conformados por un núcleo de una sola partícula.

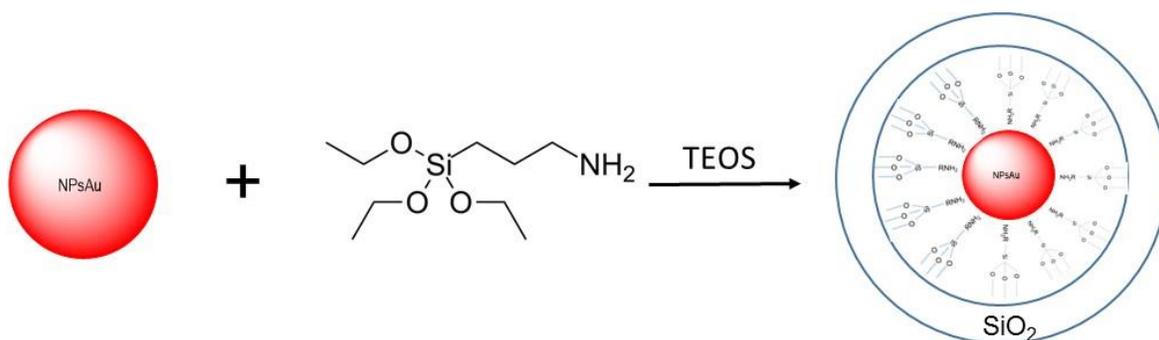


Figura 4.7. Esquema de conformación para NPsAu funcionalizadas con APTES y recubiertas con sílice.

Estos resultados obtenidos no descartan los métodos de recubrimiento funcionalizando con PVP o APTES (**Figura 4.6**), aunque la metodología y las proporciones usadas fueron seguidas como lo recomiendan en la bibliografía, es importante hacer un barrido a diferentes proporciones de las especies químicas para encontrar las condiciones óptimas de estabilidad y recubrimiento de las nanopartículas. Complicar la metodología que se siguió para obtener los materiales y además introducir al sistema ruido proveniente de la especie que interviene en la funcionalización nos hizo finalmente optar por el método de recubrimiento directo.

Teniendo definido el método a seguir para obtener los sistemas, evaluamos el efecto de la concentración del precursor TEOS en el espesor del recubrimiento y en el número de especies libres de sílice manteniendo constante el pH, tiempo de reacción, temperatura, agitación y la velocidad de adición del TEOS. Las micrografías de la **Figura 4.8** muestran como varía el espesor del recubrimiento de 160 nm – 100 nm para los sistemas de NPsAu@SiO₂ a los cuales se adicionó 200, 150 y 100 μ l respectivamente (A, B y C).

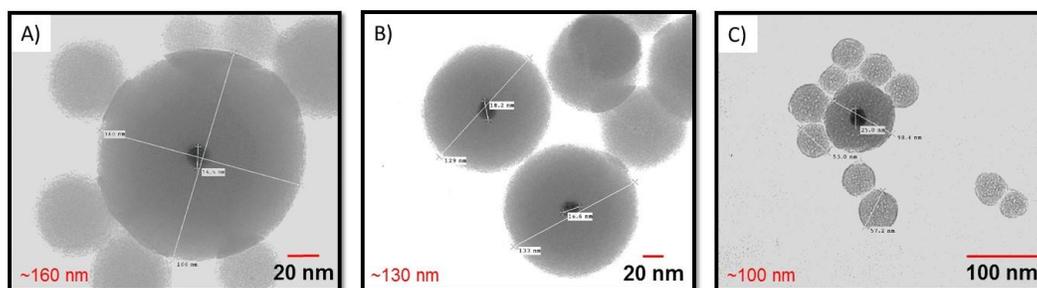


Figura 4.8. Disminución del diámetro de NPsAu@SiO₂ en función de la concentración de TEOS.

Un aumento en la concentración de TEOS por consiguiente se ve reflejado en un aumento del espesor del recubrimiento de sílice y además de un aumento de sílice libre en el medio [14-15]. Esto puede ser explicado por el exceso de monómeros de TEOS hidrolizado, al sobrepasar la solubilidad del medio da origen a la nucleación sobre las nanopartículas metálicas que es lo deseado, sin embargo, si la concentración de monómeros sigue aumentando al punto de saturación no sólo comienza a incrementar el espesor del recubrimiento de sílice sino que aparecen núcleos libres (núcleos de sílice que no presentan ningún centro metálico en su interior) [16]. Para evitar esto recomendamos una adición lenta y controlada del precursor TEOS, o bien metodologías en las cuales se realiza una fracción del volumen y éste se adiciona por etapas o ciclos.

Aun siguiendo las recomendaciones anteriores y en nuestro caso particular, se siguió presentando, aunque en menor medida sílice libre por lo que se optó por separar ésta mediante una centrifugación diferencial con el fin de poder concentrar la mayor proporción de NPsAu@SiO_2 en el material. Evaluando la separación del contenido de sílice libre en un volumen de muestra sometido a diferentes velocidades de centrifugación en la que el sobrenadante en cada etapa se sometía a una velocidad de centrifugación mayor, encontramos que se puede separar la mayor cantidad de sílice libre cuando centrifugamos por 20 minutos a velocidades entre 8000-12000 rpm. La **Figura 4.9** muestra dos micrografías correspondientes al sobrenadante resultante de la centrifugación, en esta se observa como predomina la sílice libre por encima de unos cuantos sistemas núcleo-recubrimiento (NPsAu@SiO_2) que inevitablemente no precipitan durante las repetidas centrifugaciones.

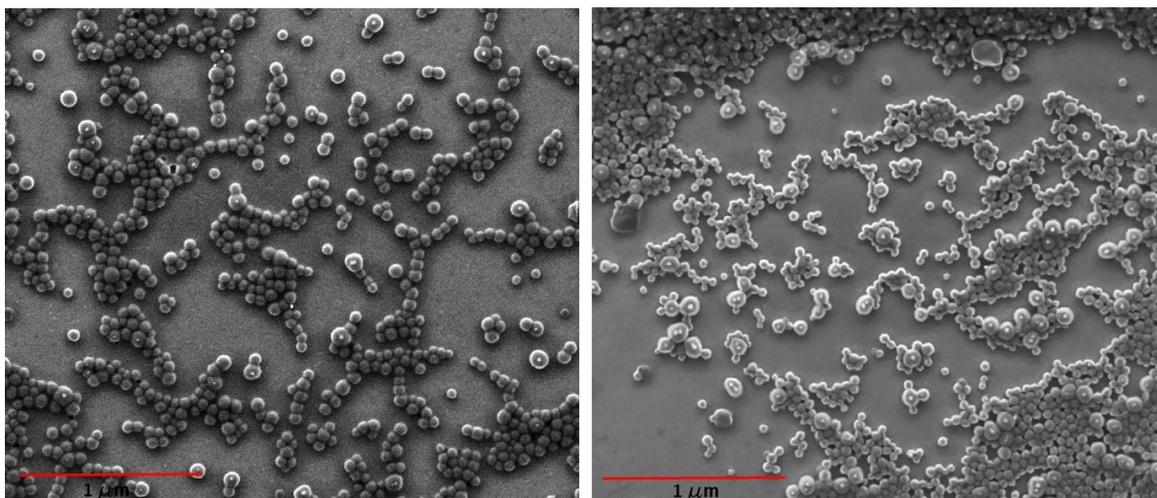


Figura 4.9. Micrografías de sílice libre separada de los sistemas NPsAu@SiO_2 por centrifugación.

La separación física mediante centrifugación fue muy útil, tal y como se observa en la **Figura 4.9** porque nos permitió eliminar del sistema el exceso de sílice que se seguía formando a pesar de estar usando muy al límite las cantidades de precursores sugeridas. Incluso, en la toma de las micrografías, ya se hace evidente la presencia del exceso de sílice puesto que la muestra tiende a cargarse fácilmente limitando la resolución de las imágenes, cosa que no ocurre en las muestras de NPsAu@SiO₂ debido a la presencia del núcleo conductor como veremos más adelante.

Luego de corroborar que el sobrenadante contenía en su mayoría núcleos de sílice libre, pudimos estar seguros de que el precipitado que separamos está conformado en su mayoría de los sistemas NPsAu@SiO₂ concentrados y que la sílice en exceso se quedó en el sobrenadante. La **Figura 4.10** muestra micrografías de los compositos donde se puede apreciar que la mayoría corresponden a los sistemas conformados por un núcleo de oro recubierto de sílice.

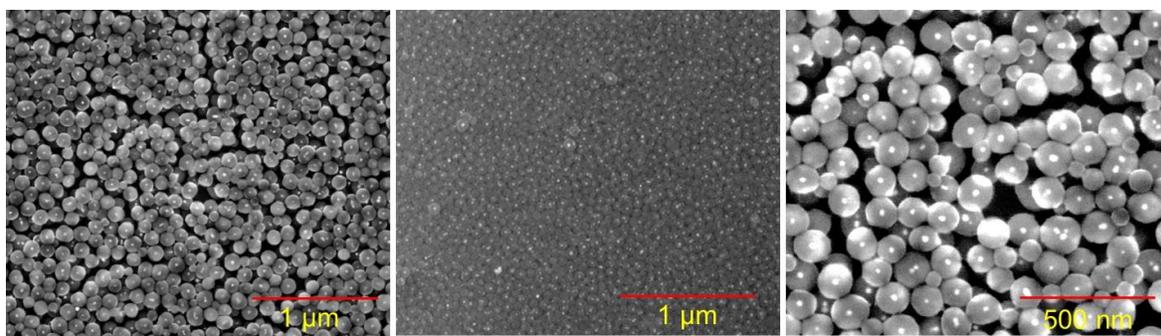


Figura 4.10. Micrografías de los sistemas de NPsAu@SiO₂ separadas por centrifugación.

Finalmente, después de todo el procedimiento anterior el material separado presenta entre 85-90% de NPsAu@SiO₂, siendo el porcentaje restante sílice libre. Este mismo sistema es aplicado para los compositos decorados con el ion lantánido y el material resultante es el que usamos en las evaluaciones para las distintas aplicaciones propuestas. En la **Figura 4.10** también se aprecia un mejor contraste y resolución de las imágenes gracias a la presencia del oro en el núcleo de los sistemas comparado con las micrografías anteriores (**Figura 4.9**), además se ve claramente en la mayoría de las partículas recubiertas están conformadas por una única partícula de oro que tiene un diámetro alrededor de 80 nm, como ya se mencionó en la **Tabla 4.1**.

Para sistemas decorados con europio, después de la hidrólisis del TEOS se adicionó al medio de reacción una sal de dicho lantánido en una proporción de alrededor de 2,500 iones por partícula de oro presente, que corresponde aproximadamente al 3% del total de átomos de oro presentes. El contenido de iones europio respecto a la sílice (incluyendo la sílice libre) es de alrededor de 0.25% en relación con el número de moléculas de óxido de silicio presentes. La **Figura 4.11** muestra micrografías del sistema completo (NPsAu@SiO₂:Eu), la imagen de la izquierda corresponde a los sistemas sin tratamiento térmico previo que son muy similares al sistema que no presenta el lantánido y que se pueden conservar dispersas en agua o etanol tal como se muestra en la fotografía puesta en la parte superior.

Las otras dos micrografías de la **Figura 4.11** corresponden a las muestras tratadas térmicamente a 600 °C, en éstas se puede apreciar que las partículas tienden a empaquetarse y se conjuntan formando capas debido al proceso de secado y reestructuración, en este caso las muestras son conservadas en polvo y para la toma de las micrografías que se presentan, éstas son redispersadas en agua.

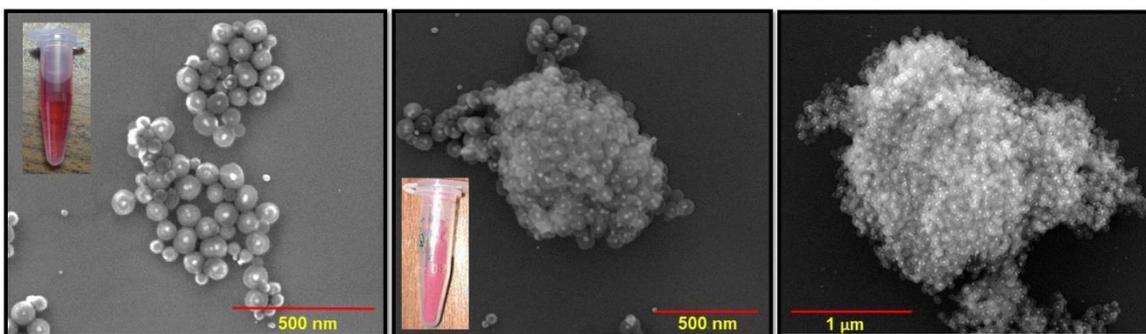


Figura 4.11. Micrografías para el sistema de NPsAu@SiO₂:Eu sin tratamiento térmico (Izq) y después de calcinar a 600 °C (Cen. y Der.).

La incorporación del lantánido a la matriz de sílice no modifica las dimensiones de la partícula ni su morfología, ni tampoco el tratamiento térmico de la muestra a 600 °C. El cambio más apreciable es la leve modificación de la superficie del compuesto que se puede ver un tanto más rugosa comparada con los sistemas NPsAu@SiO₂ y esto puede deberse a la formación de hidróxidos u óxidos del lantánido en la sílice [17]. El tratamiento térmico a temperaturas alrededor de los 600 °C le brinda al sistema estabilidad y ayuda a conformar la estructura semicristalina o cristalina del material, sin perjudicar cada una de las especies químicas que lo conforman y permitiendo conservar sus propiedades texturales.

El análisis químico semi-cuantitativo de los sistemas para corroborar la presencia de las especies que conforman los composites se presenta en la **Figura 4.12**, las mediciones se realizaron a partículas individuales de los composites de Au@SiO₂:Eu que fueron vistas desde un microscopio de alta resolución y así poder determinar su composición en diferentes puntos alrededor de su volumen.

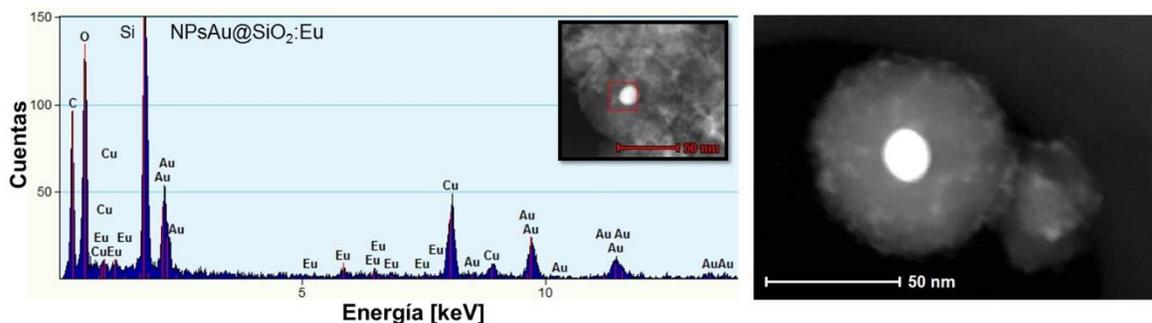


Figura 4.12. EDX y micrografía de transmisión de alta resolución para el sistema NPsAu@SiO₂:Eu.

La **Figura 4.12** muestra el espectro EDX y la micrografía correspondiente de la región que se analizó, en este se puede ver los elementos presentes Si, O, Au y Eu en orden decreciente de proporción donde cerca del 90% corresponde al silicio y oxígeno mientras que el oro se presenta en un porcentaje cercano al 10%, el porcentaje de lantánido apenas y aparece con algunos de sus picos característicos en una proporción de 0.1%. En el espectro EDX podemos apreciar algunas de las transiciones más características de los elementos presentes como son: silicio (K_a1.74 KeV), oxígeno (K_a0.53 KeV), oro (L_a9.71 y M 2.2 KeV) y europio (L_a5.85y M 1.13 KeV); cuya posición está en concordancia con algunas de las tablas que se manejan para realizar este tipo de análisis y que presenta cada equipo en particular¹⁷ y también se asemejan a las que presentan materiales similares ya reportados [18-19].

Teniendo en cuenta los valores experimentales usados para la síntesis de los materiales podemos decir que las proporciones elementales están muy cercanas a las obtenidas, haciendo un cálculo rápido usando las dimensiones de los sistemas¹², tenemos que las NPsAu están conformadas por 75,100 átomos, el recubrimiento de sílice por alrededor de 1*10⁶ moléculas y 2,500 átomos de europio. Los datos anteriores nos dan una idea de la proporción de las especies en el material donde la sílice representa un 92%, las NPsAu el 7% y el lantánido un 0.2%. Además, podemos corroborar que el ión

¹⁷ <https://www.unamur.be/services/microscopie/sme-documents/Energy-20table-20for-20EDS-20analysis-1.pdf>

lantánido se encuentra inmerso en toda la matriz de sílice debido a que su proporción se mantiene a medida que hacemos el análisis químico y nos movemos por la partícula.

4.3. Estructura de los sistemas NPsAu@SiO₂:Eu

4.3.1. FT-IR de los nanocompositos

Los espectros FT-IR de los sistemas de sílice y NPsAu@SiO₂ se presentan en **la Figura 4.13**, en estos se puede apreciar algunos enlaces que están formando las especies que conforman los materiales y en cierta medida la estructura de estos. Las dos muestras analizadas se sometieron al mismo tratamiento de purificación y secado (110 °C), y los polvos obtenidos fueron analizados por FT-IR. La sílice obtenida mediante el mismo procedimiento para realizar el recubrimiento de las NPsAu (Sección 3.3.2) presenta un modo de vibración que puede asignarse a vibraciones de tensión simétrica (ν_s) a 800 cm⁻¹ (Si-O-Si), mientras una banda más intensa y ancha con un leve hombro a la derecha ubicada entre 1,000-1,100 cm⁻¹ corresponden a los modos de tensión asimétrica (ν_a) de los grupos Si-O-Si [20-21].

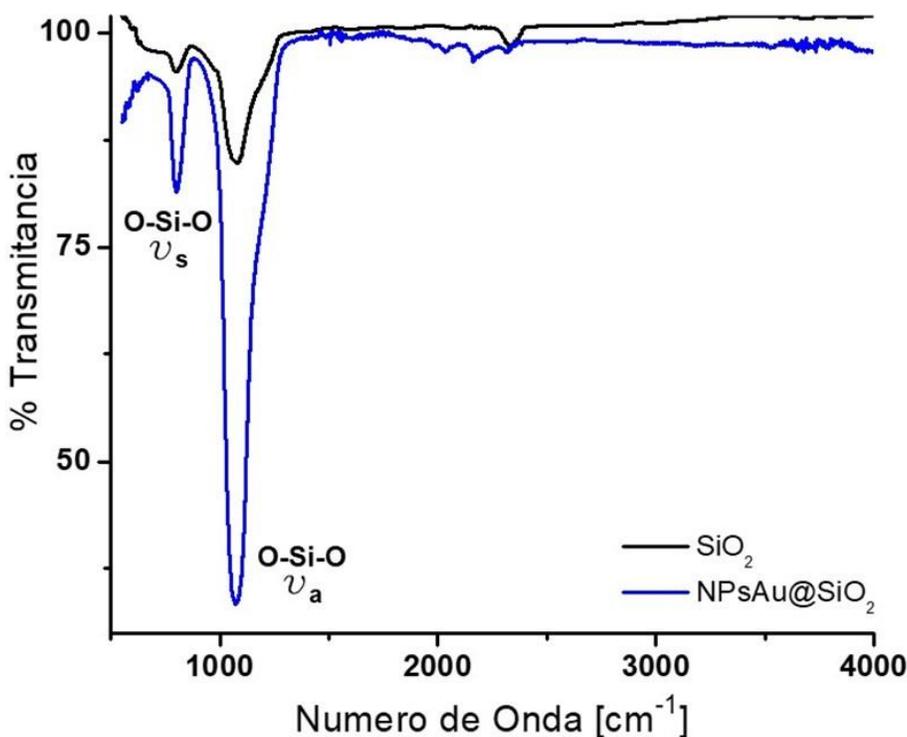


Figura 4.13. Espectros de Absorción FT-IR de sílice y NPsAu recubiertas con sílice.

En los dos espectros no se detecta la presencia de moléculas de agua o grupos hidroxilo (OH) asociados o enlazados a la estructura de la sílice debido a la ausencia de los modos de vibración de tensión a $3,450\text{ cm}^{-1}$ y de flexión a $1,630\text{ cm}^{-1}$ (d) característicos del agua, además tampoco se presentan las vibraciones de tensión propias de los grupos Si-OH presentes en la sílice amorfa ($3,240\text{ cm}^{-1}$) [22-24]. Esto quiere decir que el tratamiento térmico está eliminando el agua que podría estar presente en la estructura de los materiales después de la síntesis.

Analizando únicamente los espectros FT-IR es difícil determinar el tipo de estructura de la sílice presente, esto debido a que tanto la fase amorfa como todos los demás polimorfos presentan los mismos modos de vibración (cuarzo, cristobalita y tridimita). Las pequeñas diferencias que se pueden encontrar están en la definición de los picos y el ancho de estos, que se atenúa más en las especies de sílice cristalina y que puede explicar la diferencia entre la intensidad y el ancho de las bandas de la muestra de sílice pura respecto al de las NPsAu recubiertas con sílice (Ver **Figura 4.13**). Si bien es cierto que el tratamiento térmico es el mismo para los dos materiales que podría generar un cambio de fase, el núcleo de oro podría estar jugando un papel importante en la transferencia de energía para favorecer el cambio de fase si es que ocurre en este caso.

4.3.2. Patrones de difracción de rayos X de los nanocompositos

Para constatar la estructura cristalina que presentan los materiales y poder corroborar los resultados obtenidos por FT-IR se midieron los patrones de difracción de dichos materiales a dos temperaturas 110 °C y 600 °C . La primera temperatura es la recomendada para eliminar la humedad y el agua superficial de la muestra y la segunda es para estabilizar térmicamente la sílice y el ión dopante [25-26].

Inicialmente el patrón de difracción de dos muestras de sílice pura tratada a 110 °C y 600 °C , y de nanopartículas de oro se presenta en la **Figura 4.14** donde se puede ver para las dos muestras de sílice un único pico ancho que representa su estado amorfo, pero que se atenúa en la muestra

calcinada y se desplaza alrededor de un grado siendo un indicio de la reorganización de la estructura de dicho material causada por el tratamiento térmico.

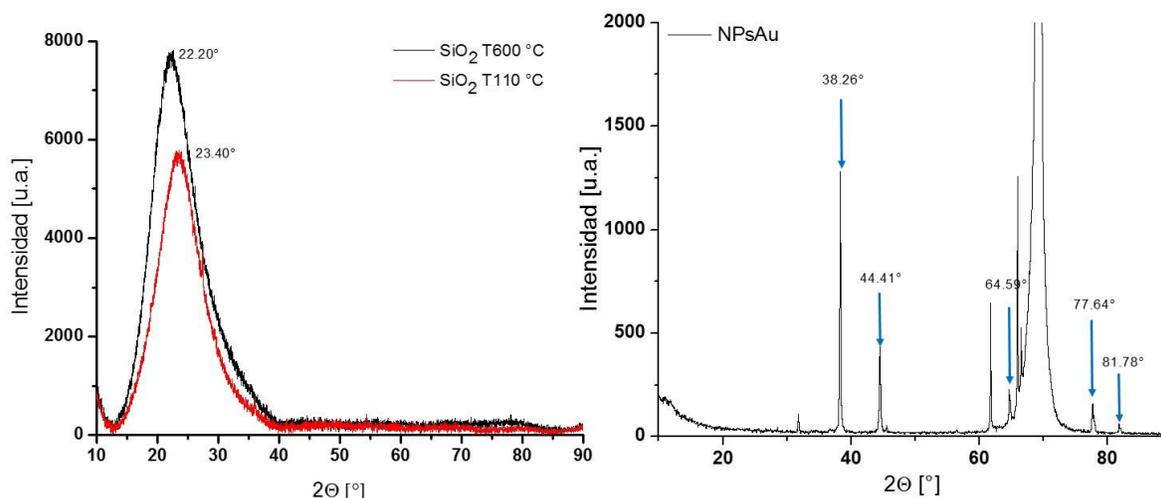


Figura 4.14. Patrones de difracción de Rayos X de sílice tratada térmicamente a 110 y 600 °C, y de NPsAu secadas a 110 °C.

El patrón de difracción de las NPsAu también se presenta en la **Figura 4.14**. En él se marcan con flechas azules los picos característicos que presenta el oro en su única fase cúbica centrada en las caras (FCC) cuyas posiciones se encuentran en (38.26, 44.41, 64.59, 77.64 y 81.78°), que concuerdan con el patrón de difracción del oro en bulto¹⁸ y de los reportados en la literatura para NPsAu (38.20° (111), 44.41° (200) y 64.54° (220), que corresponden a los planos de la fase cubica estándar del oro)¹⁹ [22-23]. El patrón de difracción de las NPsAu calcinadas a 600 °C no varía mucho respecto al que se presenta en la **Figura 4.14**. La temperatura permite una mejor organización de su estructura cristalina que se ve reflejado en picos más definidos por lo demás es muy similar.

La **Figura 4.15** presenta los patrones de difracción para los sistemas NPsAu@ SiO_2 y NPsAu@ SiO_2 :Eu que fueron tratados térmicamente a 110 °C. En ellos se puede identificar fácilmente las dos fases que componen los materiales, una es la del oro que caracterizamos anteriormente y la otra corresponde a la sílice amorfa.

¹⁸ <http://truff.info/chem=Au/notchem=all/display=default/>

¹⁹ JCPDS 04-0784

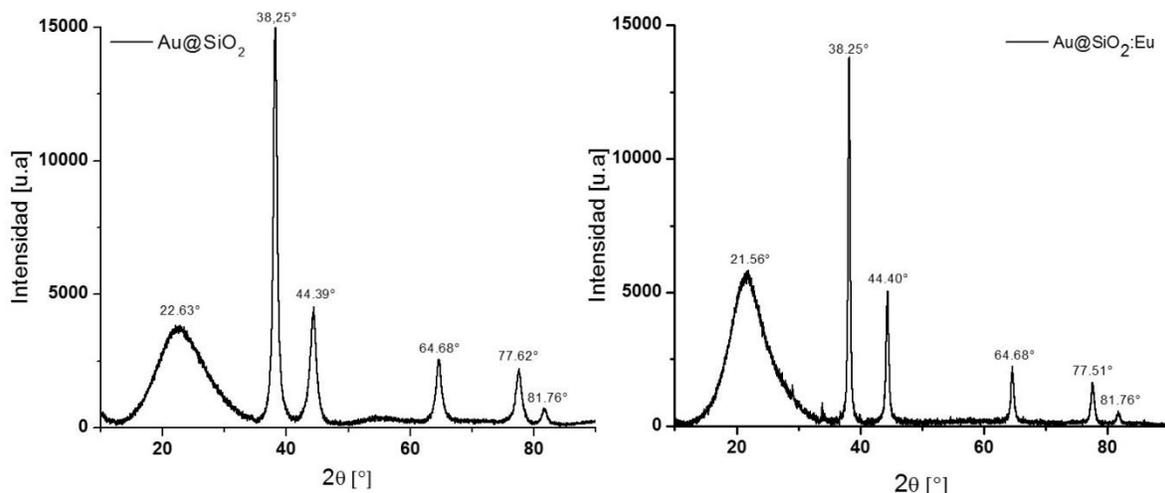


Figura 4.15. Patrones de difracción de los sistemas NPsAu@SiO_2 y $\text{NPsAu@SiO}_2:\text{Eu}$ secados a $110\text{ }^\circ\text{C}$.

Las pequeñas diferencias entre la muestra con y sin lantánido se presentan principalmente en la banda que anteriormente identificamos para la sílice amorfa, en la muestra decorada con europio puede verse una banda menos ancha y más intensa desplazada poco más de un grado respecto a la muestra que no contiene el lantánido. El único tratamiento térmico que recibieron las muestras es durante el secado a $110\text{ }^\circ\text{C}$, por lo que la reestructuración en la fase amorfa de la sílice presente en el sistema $\text{NPsAu@SiO}_2:\text{Eu}$ debe ser ocasionado por la interacción del lantánido con la matriz que beneficia de cierta manera la formación de una fase y que curiosamente es un fenómeno aun no muy estudiado ni reportado para este tipo de sistemas en particular [27-28].

Para determinar el posible efecto de la incorporación del ion europio a la matriz, se tomó el patrón de difracción de rayos X de la muestra $\text{NPsAu@SiO}_2:\text{Eu}$ calcinada a $600\text{ }^\circ\text{C}$ como se presenta en la **Figura 4.16**. En el patrón de difracción se identifica claramente la fase cúbica correspondiente al oro (recuadro rojo) que no sufre modificaciones drásticas respecto a esta misma muestra tratada a $110\text{ }^\circ\text{C}$, mientras que la banda identificada para la fase amorfa de la sílice presenta un cambio al parecer por una transición entra la fase amorfa y una cristalina.

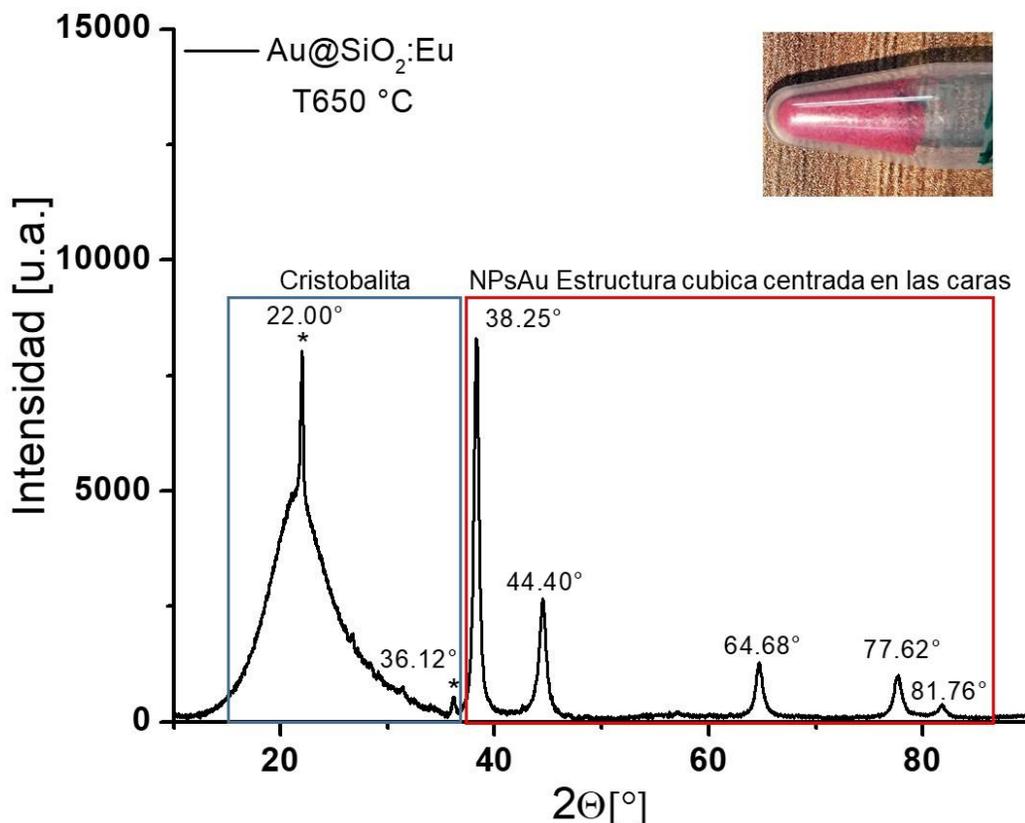


Figura 4.16. Patrón de difracción de rayos X para la muestra de NPsAu@SiO₂:Eu tratada térmicamente a 600 °C.

La banda que anteriormente identificamos para el SiO₂ amorfo (22.20-23.40°, **Figura 4.14**) y que está presente en los sistemas recubiertos y decorados con el lantánido sufre un cambio como se puede observar en la **Figura 4.16**, un pico bien definido en 22.00° surge de la banda asociada a la sílice amorfa y que corresponde a la fase α-cristobalita de simetría trigonal que se encuentra inmersa en una transición de la estructura amorfa a la cristalina²⁰. Además, también se puede apreciar el segundo pico más intenso asociado a la fase cristobalita a 36.12° que corrobora la presencia de esta fase en la muestra tal como se encuentra reportado en su respectiva carta cristalográfica²¹.

Los resultados de los patrones de difracción muestran que el ion lantánido puede estar dopando la red del SiO₂ y promoviendo la conversión a la fase cristobalita de la sílice a condiciones poco usuales, este efecto no ocurre en la muestra sin el europio tratada a la misma temperatura, se sugieren algunos experimentos donde se someta esta muestra a diferentes temperaturas para poder ver mejor en los

²⁰ <http://rruff.info/chem=Si,O/notchem=all/display=default/R061064>

²¹ JCPDS 77-1316

patrones de difracción como afecta realmente el ion la estructura cristalina de la sílice en función de dicha temperatura. Además, el tratamiento térmico y los resultados por DRX también sirvieron para demostrar la estabilidad térmica de los sistemas hasta al menos 600 °C donde podemos decir que se conserva el sistema núcleo-recubrimiento (Ver **Figuras 4.10-4.11**) y la estructura de estos sin colapsar, por lo que tenemos un material muy estable que conserva su estructura incluso a altas temperaturas.

4.4. Biocompatibilidad de los sistemas de NPsAuSiO₂:Eu en osteoblastos, ensayos in vitro

Una de las principales pruebas que se requieren realizar a un material nuevo para ser aplicado en sistemas biológico es la de biocompatibilidad, existen numerosos ensayos algunos muy rigurosos y otros más sencillos para dar una idea de la viabilidad que puede presentar el material al ser aplicado en estos medios. Sistemas de NPsAu fueron incubados con osteoblastos previamente cultivados e incubados en cajas de 96 pozos por 24 horas, 4×10^{11} nanopartículas (100 μ l) fueron puestas en el medio ([Au] = 32.8 μ g/ml, [SiO₂] = 270 μ g/ml y [Eu⁺³] = 0.38 μ g/ml, composición individual de cada una de las especies que presentan las muestras) junto con 480,000 células (osteoblastos, 1.6×10^6 Cel/ml) y mediante un test con azul de tripano (Ver detalles en la sección **3.5.1** y **Tabla 3.1**) se contabilizó el total de células vivas y muertas.

La **Figura 4.17** presenta unas imágenes tomadas de un microscopio óptico de osteoblastos con NPsAu y NPsAu@SiO₂, además de un control negativo de osteoblastos que se usó para diferenciar las células vivas de las muertas. Las células presentan en su pared celular una membrana semipermeable que funciona de manera selectiva dando paso a los nutrientes, en presencia del colorante azul de tripano la membrana de la célula impide el paso de esta a su interior y se genera un contraste como se ve la **Figura 4.17** para las muestras NPsAu y NPsAu@SiO₂.

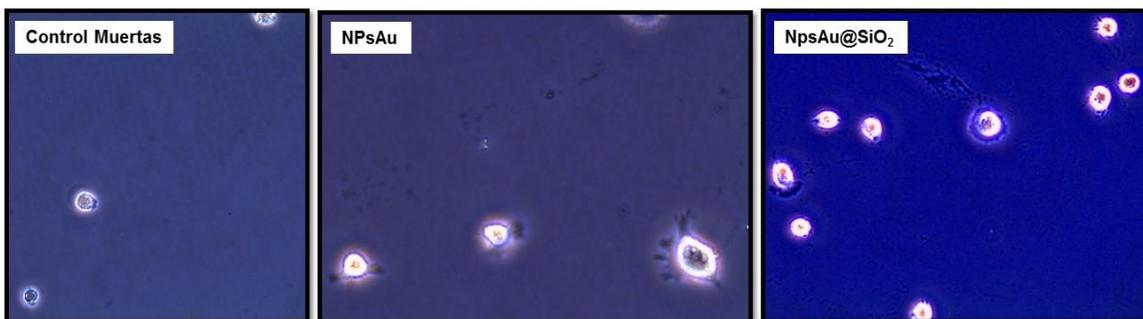


Figura 4.17. Imágenes de osteoblastos en presencia de NPAu y NPAu@SiO₂ tomadas en un microscopio óptico.

Cuando la pared celular ha sufrido daño o la célula está muerta, la retención del colorante no se da y es difícil apreciar la célula puesto que el colorante ingresa tal como se aprecia con el control. Este sencillo ensayo nos da una idea de la citotoxicidad que presentan los materiales, durante el conteo células vivas como las que se aprecian en la **Figura 4.17** para las muestras que fueron incubadas con NPsAu y NPsAu@SiO₂ y células muertas como las del control permiten ser diferenciadas con el colorante azul de tripano.

Las micrografías SEM permiten ver de manera más detallada el deterioro sufrido por parte de la célula en su pared celular. Osteoblastos fijados a un portaobjetos circular mediante glutaraldehído nos permite ver por SEM el estado de la célula después de la incubación. El deterioro o daño de la pared inhibe el crecimiento de este tipo de células y su morfología por lo que osteoblastos con algún daño tienden a conformarse de manera circular. En la **Figura 4.18** se puede apreciar la diferencia entre osteoblastos vivos y muertos vistos desde un microscopio de barrido electrónico (SEM), en el control de vivas se aprecian células estiradas de formas triangulares que confluyeron bastante (en este control se aprecian también algunos osteoblastos muertos) mientras que en el control de muertas es difícil de distinguir puesto que muchas de ellas parecen aplastadas y otra gran mayoría que sobresale de la superficie presentan una forma circular, por lo cual no están bien adheridas a la superficie. Con estos dos controles podemos comparar el daño sufrido por los osteoblastos al ser incubados con las partículas de oro y que tan perjudicial para la célula puede ser esta interacción.

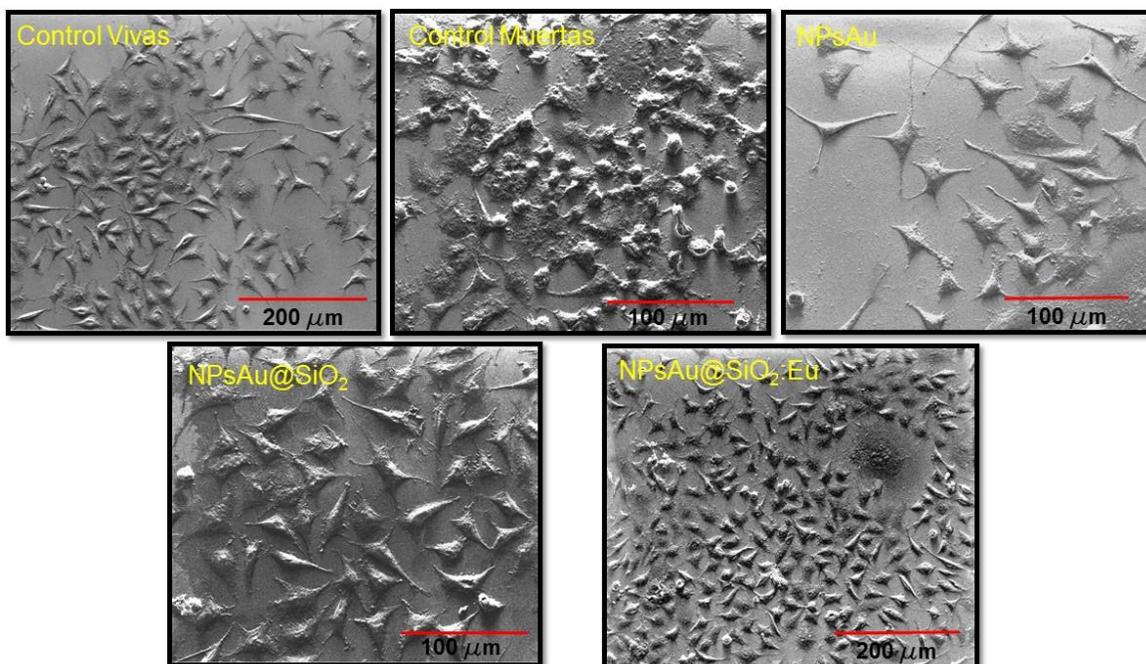


Figura 4.18. Micrografías SEM de osteoblastos incubados 24 H con NPsAu, NPsAu@SiO₂ y NPsAu@SiO₂:Eu.

En los sistemas que presentan los osteoblastos con las nanopartículas se puede apreciar bastante confluencia y además un estado similar de los osteoblastos al que presenta el control de vivas (ver **Figura 4.18**). Además, en las micrografías correspondientes a las 3 muestras se puede apreciar algunas células muertas, aunque una minoría respecto al total de células presentes por lo cual se puede adelantar de manera cualitativa que los sistemas son viables y tienen una baja toxicidad como comprobaremos más adelante.

Los resultados mostrados son de esperarse si tenemos en cuenta la baja toxicidad que presentan las NPsAu esféricas en sistemas similares [29-32] y si a eso le sumamos un revestimiento de sílice inerte, se puede incluso neutralizar el poco efecto tóxico de las partículas de oro. Probablemente lo más perjudicial para las células es el ion europeo [31], pero está claro que en las concentraciones y la forma como está soportado no tiene un efecto negativo sobre los sistemas biológicos.

La **Figura 4.19** presenta los resultados estadísticos obtenidos del conteo total celular presente para cada una de las muestras incubadas en osteoblastos, una alícuota de 10 μ l de los 100 μ l de células concentradas de cada uno de los pozos es tomada como referencia y puesta en una cámara de

neubauer para el conteo. Un total de 610,000 células (aproximadamente 2×10^6 Cel/ml) fueron contabilizadas en el control positivo y este valor fue usado como base de referencia (100%) respecto a las demás muestras que presentan una mayor o menor población celular en esta base tal y como se presenta en la **Figura 4.19**.

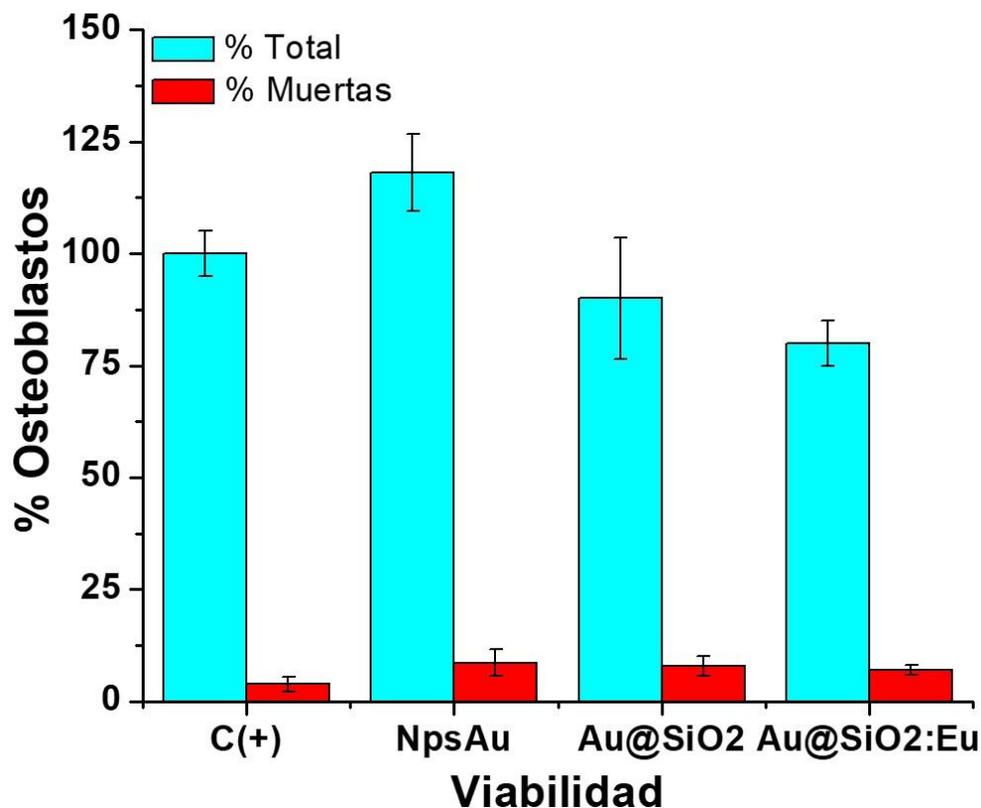


Figura 4.19. Viabilidad de osteoblastos en sistemas de NPsAu@SiO₂:Eu.

La gráfica muestra un control positivo (C(+)) en el que el punto azul con su respectiva desviación corresponde al total de osteoblastos encontrados que en este caso sería 100% (tanto vivos como muertos) y sobre la misma línea abajo un punto rojo que representa el porcentaje de células muertas encontradas que es de 4%, mientras que el control negativo (C(-)) presenta una población de 105% y una mortandad del 98%. Una viabilidad mayor o igual al 90% en el control positivo y una mortandad cercana al 100% en el control negativo nos dice que las líneas celulares utilizadas son recomendadas para realizar los ensayos por lo cual se puede proceder con los demás sistemas biológicos que contienen las nanopartículas.

Los resultados para el sistema que presenta la NPsAu muestran que para una población del 118% respecto al control (C(+)) el porcentaje de células muertas es de apenas 8.6%, mientras para el sistema recubierto con sílice (NPsAu@SiO₂) su población inicial es del 90% y la mortandad de 7.8% como era de esperarse, los valores graficados se presentan mejor en la **Tabla 4.2**.

En cuanto al sistema completo (NPsAu@SiO₂:Eu) éste presenta un 80% de la población inicial del control y una mortandad de 7%, lo que nos sugiere que el ion europeo no está incrementando la poca toxicidad que presentan las nanopartículas de oro usadas. Vale la pena mencionar que la baja población celular que se presenta en esta muestra (80%) se debe principalmente a una mala agitación del medio de cultivo antes de tomar la muestra celular por lo que se recomienda homogenizar bien las dispersiones y medir volúmenes precisos para tener poblaciones similares en las distintas muestras.

Viabilidad	Total	Muerte
Control C(+)	100.0 ± 5.0	3.8 ± 1.7
Control C(-)	105 ± 3.0	98.0 ± 3.0
NPsAu	118.2 ± 8.6	8.6 ± 3.0
NPsAu@SiO ₂	90.0 ± 13.6	7.8 ± 2.2
Au@SiO ₂ :Eu	80.0 ± 5.0	7.0 ± 1.1

Tabla 4.2. Citotoxicidad de nanomateriales en osteoblastos porcentaje de mortandad.

En general todos los sistemas presentan una viabilidad superior al 90% de la población por lo que las nanopartículas son altamente biocompatibles ([Au] = 32.8 µg/ml o [Au@SiO₂:Eu = 303.2 µg/ml]) con los osteoblastos usados en el ensayo y estos pueden utilizarse para la prueba de fototermia, ya que la población no se ve seriamente afectada por la presencia de los sistemas nanométricos. Aunque los resultados cuantitativos muestran materiales viables, es necesario estudios más específicos para determinar si la presencia de estos materiales puede producir daños en la célula y desencadenar muerte por apoptosis o que estos materiales no dañen directamente a la célula, pero sí inhiban alguna función vital como crecimiento o reproducción.

Referencias

- [1] Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103 (40), 8410-8426.
- [2] Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 7238-7248.
- [3] DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12674-12675.
- [4] Optical Properties of Thin Films of Au@SiO₂ Particles, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 3441-3452.
- [5] Surface morphology changes on silica-coated gold colloids, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **2008**, 322, 225–233.
- [6] Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *J. Colloid Interface Sci.*, **1968**, 26, 62-69.
- [7] Bioconjugated Gold Nanodots and Nanoparticles for Protein Assays Based on Photoluminescence Quenching, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 1497-1504.
- [8] In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives, *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 11115–11124.
- [9] Metal nanoshells as a contrast agent in near-infrared diffuse optical tomography, *Opt. Commun.*, **2005**, 253, 214–221.
- [10] Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **2007**, 58, 3–7.
- [11] Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas, *Acta Biochim. Pol.*, **2002**, 49 (2), 387-391.
- [12] Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment, *Cancer Lett.* **1997**, 115, 25-30.
- [13] A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 68, 141-142.
- [14] Bifunctional Magnetic-Luminescent Nanocomposites: Y₂O₃/Tb Nanorods on the Surface of Iron Oxide/Silica Core-Shell Nanostructures, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 9623-9626.
- [15] Nanoparticle Architectures Templated by SiO₂/Fe₂O₃ Nanocomposites, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 614-619.
- [16] Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses, *Chem. Mater.* **2012**, 24, 4572–4580.
- [17] Experimental Evidence of Luminescence Quenching at Long Coupling Distances in Europium (III) Doped Core-shell Gold Silica Nanoparticles, *Gold Bull*, **2013**, 46, 349–355.
- [18] Recent Advances in Plant-mediated Engineered Gold Nanoparticles and Their Application in Biological System, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2017**, 40, 10–23.
- [19] Chrysopogon Zizanioides Aqueous Extract Mediated Synthesis Characterization of Crystalline Silver and Gold Nanoparticles for Biomedical Applications, *Int. J. Nanomed.*, **2013**, 8, 2375–2384.

- [20] Synthesis of Silica Powders by Pressured Carbonation, *Chem. Eng. J.*, **2009**, 151, 380–386.
- [21] Hydrophobation and self-assembly of core-shell Au@SiO₂ nanoparticles, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **2007**, 302, 383–387.
- [22] Gradual Growth of Gold Nanoseeds on Silica for Silica@Gold Core-Shell Nanoparticles and Investigation of Optical Properties, *Int. J. Bio-Inorg. Hybd. Nanomat.*, **2013**, 2 (4), 477-483.
- [23] Precipitation of Amorphous SiO₂ Particles and Their Properties, *Braz. J. Chem. Eng.*, **2011**, 28 (01), 89-94.
- [24] Synthesis of novel core-shell structural AuNR@MCM-41 for infrared light-driven release of drug, *J. Mater. Res.*, **2011**, 26 (18), 2414-2419.
- [25] Ag-SiO₂-Er₂O₃ Nanocomposites: Highly Effective Upconversion Luminescence at High Power Excitation and High Temperature, *Sci. Rep.*, **2014**, 4 (5087), 1-9.
- [26] Upconversion Emission Enhancement in Silica-coated Gd₂O₃:Tm³⁺, Yb³⁺ nanocrystals by incorporation of Li⁺ ion, *Mater. Chem. and Phys.*, **2010**, 123, 806–810.
- [27] Temperature-Induced Interfacial Change in Au@SiO₂ Core-Shell Nanoparticles Detected by Extended X-ray Absorption Fine Structure, *J. Phys. Chem. C*, **2010**, 114 (1), 41-49.
- [28] Ag-Nanoparticle-Decorated SiO₂ Nanospheres Exhibiting Remarkable Plasmon-Mediated Photocatalytic Properties, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 19039–19045.
- [29] Amine-functionalized Gold Nanoparticles as Non-cytotoxic and Efficient Intracellular siRNA Delivery Carriers, *Int. J. Pharm.*, **2008**, 364, 94–101.
- [30] Biocompatible, Multiresponsive Nanogel Composites for Codelivery of Antiangiogenic and Chemotherapeutic Agents, *Chem. Mater.*, **2017**, 29 (5), 2303–2313.
- [31] A Brain Tumor Molecular Imaging Strategy Using A New Triple-Modality MRI-Photoacoustic-Raman Nanoparticle, *Nat. Med.*, **2012**, 18 (5), 829–834.
- [32] Inorganic Nanoparticles for Image-Guided Therapy, *Bioconjugate Chem.*, **2017**, 28 (1), 212–221.
- [33] Various Au Nanoparticle Organizations Fabricated through SiO₂ Monomer Induced Self-Assembly, *Langmuir* **2011**, 27(3), 895–901.

Capítulo V: Aplicaciones

En este capítulo se presentan tres de las múltiples posibles áreas de aplicación en las que pueden usarse los sistemas de NPsAu@SiO₂:Eu propuestos como son: realce de señales Raman (SERS) de moléculas biológicas, fototermia para tratamiento de enfermedades y fotocátalisis para la generación de hidrógeno. Los resultados de una evaluación preliminar de los materiales y la importancia de ser usados en cada una de estas áreas se presentan a continuación.

5.1. Realce de señales Raman de L-cisteína usando nanocompositos como sustratos SERS

La importancia de la espectroscopia Raman en este campo no sólo radica en su uso para la identificación y cuantificación de moléculas biológicas de interés, sino que sirve también para determinar las conformaciones más complejas de proteínas como estructuras secundarias y terciarias. El estudio de aminoácidos por espectroscopia Raman permite construir las bases para poder analizar moléculas más complejas, en nuestro caso la L-cisteína (L-Cys) es un aminoácido responsable de la estabilización de la estructura secundaria de las proteínas y en nuestro cuerpo actúa como un poderoso antioxidante. La cisteína está clasificada dentro de los aminoácidos neutros y es el único de los aminoácidos proteínogénicos que presenta el grupo tiol (SH) en su estructura, de ahí su polaridad y su importancia en la generación de puentes de hidrógeno que estabilizan la mayoría de las estructuras proteicas [1-2].

La **Figura 5.1** muestra el espectro Raman de la L-cys en polvo, se remarcan algunos de los modos de vibración más importantes como los referentes a los grupos SC, SH, y CH₂; y la estructura química del aminoácido.

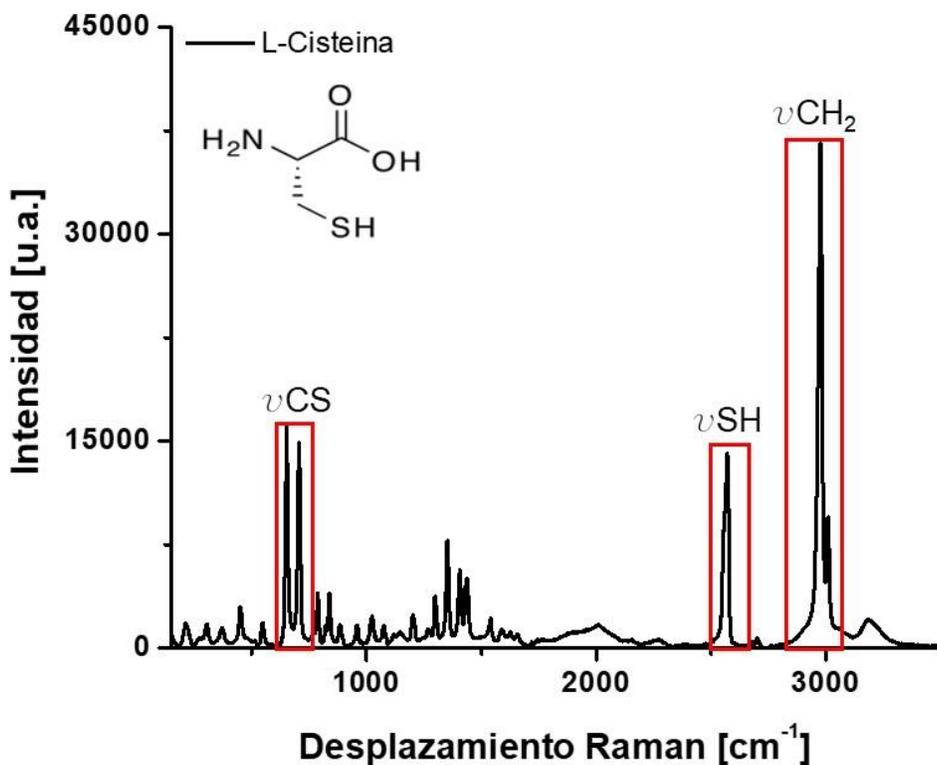


Figura 5.1. Espectro Raman de la L-cisteína en polvo.

El espectro Raman de la L-cisteína presenta una banda muy intensa bimodal correspondiente a vibraciones de tensiones simétrica y asimétrica de los grupos CH₂ (ν_s 2,975 y ν_a 3,008 cm⁻¹) como pico principal, además el grupo tiol presenta un pico característico alrededor de 2,500 cm⁻¹ atribuido a vibraciones de tensión que permite diferenciarlo del resto de aminoácidos debido a que no presentan bandas en esta región [3-5]. En la **Figura 5.1** también se enmarcan los modos de vibración correspondientes a la unión CS de tipo tensión (650 y 705 cm⁻¹), y no menos importantes también se pueden identificar los modos de vibración de flexión correspondientes al grupo NH₃ (δ 1,350 cm⁻¹) y balanceo (ρ 1,073 y 1,025 cm⁻¹) [1, 6].

La **Figura 5.2** muestra la conformación de una monocapa de los materiales (NPsAu@SiO₂:Eu) soportados sobre una película de silicio (Si, 1 cm²), en la que se puede ver un arreglo en el que las NPsAu (núcleo) equidistan unas a otras una distancia de dos veces el espesor del recubrimiento de la sílice (~30 nm), en nuestro caso, y por la metodología usada se forma un arreglo similar pero

tridimensional de múltiples capas en el cual en la siguiente capa las nanopartículas ocuparan los intersticios de la capa anterior y así sucesivamente.

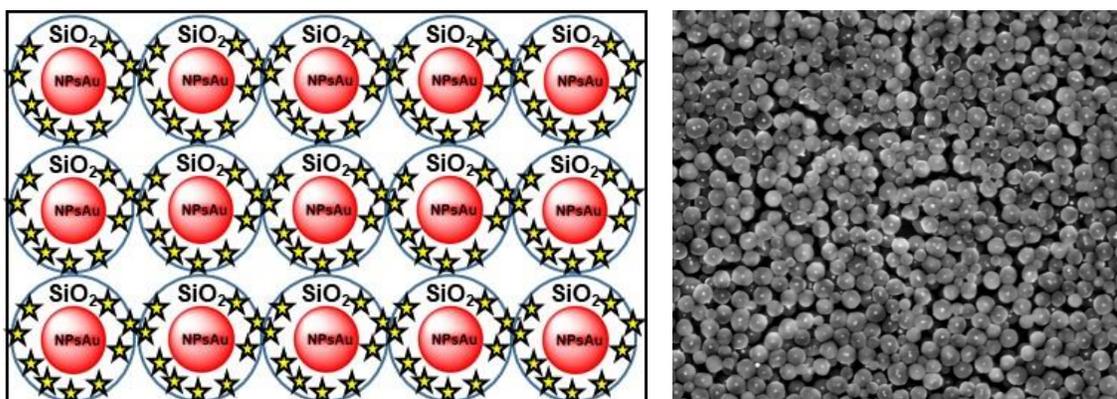


Figura 5.2. Esquema de sustrato SERS de una monocapa de nanocompositos de NPsAu@SiO₂:Eu sobre Silicio.

Este tipo de arreglo puede asemejarse al que realizan los átomos o moléculas que presentan una fase cristalina cúbica centrada en el cuerpo, donde el espacio que ocupan en la red cristalina es de 0.74. Lo importante del sistema ordenado que se forma, es que los núcleos quedan separados a una distancia promedio similar y en los intersticios se generan puntos calientes (hotspots) que favorecen el realce de señales Raman, siempre que esta distancia de separación entre núcleos sea óptima, como se evaluara más adelante.

Una solución de baja concentración (10^{-5} M) de L-Cys fue usada para evaluar el realce Raman que pueden llegar a generar los nanocompositos (NPsAu@SiO₂:Eu), 50 μ l de solución ($5 \cdot 10^{-10}$ moles de Cys) se depositaron sobre sustratos SERS preparados previamente que presentan una conformación similar a la presentada en la **Figura 5.2** pero de multicapas (Ver Sección 3.5.3). El sustrato con el depósito de cisteína fue evaluado por espectroscopia Raman para determinar algunas señales y compararlas con un blanco en el que sólo se depositó la solución de cisteína sobre el silicio.

La **Figura 5.3** presenta los espectros Raman de la L-cys a una concentración de 10^{-5} M en ausencia de nanocompositos y el espectro Raman de la misma especie a la misma concentración pero sobre un sustrato SERS conformado con los sistemas NPsAu@SiO₂:Eu, en los espectros podemos identificar dos modos de vibración: uno ubicado a $1,000 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al sustrato de silicio usado y el otro a vibraciones de tipo tensión del grupo CH₂ ubicado por debajo de los $3,000 \text{ cm}^{-1}$ [8-9].

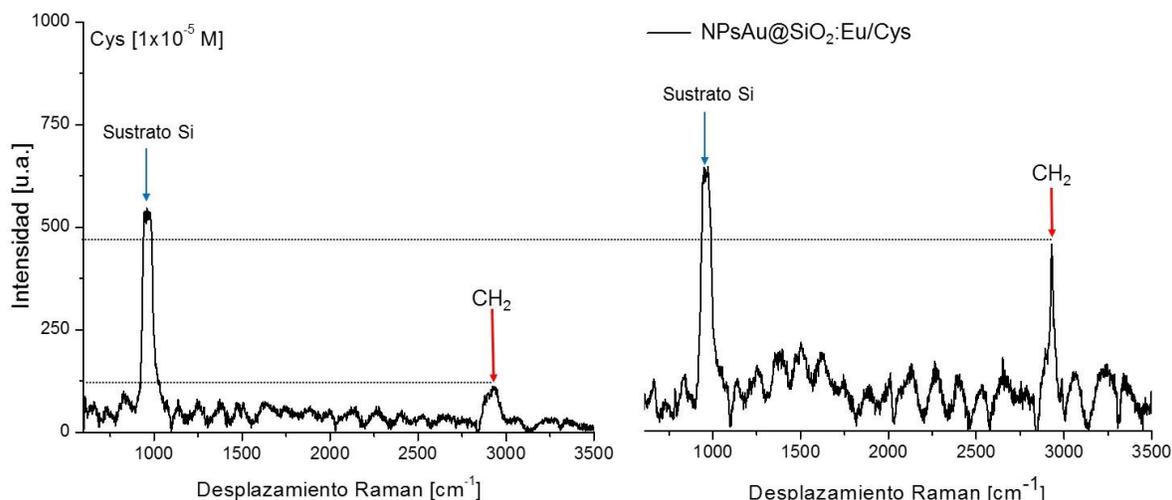


Figura 5.3. Espectros Raman de L-Cys (10^{-5} M) en ausencia y presencia de NPAu@SiO₂:Eu.

Un incremento alrededor de 5 veces la intensidad de la señal del grupo CH₂ se ve claramente en el espectro Raman del sistema NPsAu@SiO₂:Eu/Cys que es muy similar y comparable al que presenta este mismo sistema únicamente con NPsAu como agente de realce. Vale la pena resaltar que la única señal que se pudo identificar en el espectro corresponde al grupo CH₂, teniendo en cuenta que el aminoácido puede interaccionar con la superficie de la nanopartícula por el grupo tiol o amino siendo más afín el grupo tiol. Esto significa que el grupo CH₂ se encuentra a una distancia de separación de 2 enlaces con la nanopartícula que podría ser ideal para que se produzca el realce de esta [7].

Los nanocompositos producen un realce de la señal Raman del grupo CH₂ de la L-cisteína similar al que producen las nanopartículas de oro que no presentan recubrimiento de sílice, por lo que podemos decir que el recubrimiento no está restando las propiedades de realce que presentan las nanopartículas de oro. Si bien las propiedades de las nanopartículas no aumentaron debido al espesor del recubrimiento al menos estas se mantienen y permiten al material conservar el realce que produce el núcleo metálico por lo que no se descartan para potenciales aplicaciones.

El cálculo numérico del campo eléctrico disperso y la sección transversal de dispersión (C_{scatt}) de la partícula y de los sistemas propuestos se realizó usando la teoría de Mie y el bien establecido método numérico de elementos de frontera (BEM) [10-12]. La magnitud del cuadrado del campo eléctrico alrededor de una nanopartícula de radio (3.75 nm) y de una nanopartícula recubierta con sílice de

espesor entre 0.5-1.25 nm fue calculado. La gráfica como función de la coordenada “z” para cada uno de los sistemas se presenta en la **Figura 5.4**. Los cálculos se realizaron asumiendo una NPAu con un índice de refracción complejo tomado de Johnson and Christy [13], embebida en sílice (h= 1.456) y dispersa en agua (Ver **Figura 4.2**).

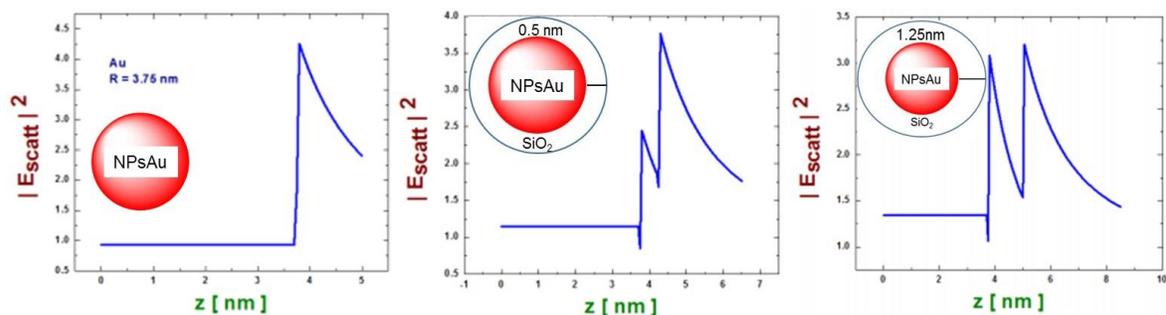


Figura 5.4. Magnitud del cuadrado del campo eléctrico dispersado alrededor de una NPAu y de una NPAu recubierta con sílice con un espesor de 0.5 y 1.25 nm en función de la distancia²².

Los resultados obtenidos para el sistema de una NPAu recubierta muestran que un espesor de 0.5 nm permite conservar casi el mismo campo eléctrico dispersado por una nanopartícula sin recubrir, donde sus picos máximos se presentan en la frontera de la superficie de los materiales. A medida que aumentamos el espesor de sílice (1.25 nm) hay una disminución del campo eléctrico dispersado. En nuestro caso un espesor de aproximadamente 30 nm en promedio debe presentar un campo eléctrico menor que el de la nanopartícula desnuda, pero hay que tener en cuenta la porosidad que presenta la sílice que puede permitir a la molécula de interés estar en las proximidades donde se generan los hotspots y esta podría ser la razón por la cual el sistema propuesto presenta un realce similar al que presentan las NPsAu.

Los cálculos presentados anteriormente se realizaron para nanopartículas individuales, pero en la realidad las partículas no están aisladas por lo que el resultado va a diferir si en el medio incluimos múltiples partículas. La **Figura 5.5** presenta la sección transversal (C_{scatt}) y el campo eléctrico (E_{scatt}) para un dímero de NPsAu con un espesor de 0.5 nm de sílice (mejor condición obtenida del resultado anterior) y una distancia de separación entre partículas de 0.25-0.75 nm. En la gráfica se puede apreciar que el plasmón de resonancia correspondiente al oro se desplaza al rojo algunos nanómetros (528-535 nm) en forma inversa a la distancia de separación del dímero. Experimentalmente se puede

²² Cálculo realizado por el Dr. Alejandro Reyes-Coronado y M.C. J.M. Galicia, Departamento de Física de la Facultad de Ciencias, UNAM.

evidenciar este desplazamiento tal y como se presentó en la **Figura 4.1**, donde los sistemas recubiertos presentan el plasmón de resonancia en 528 nm.

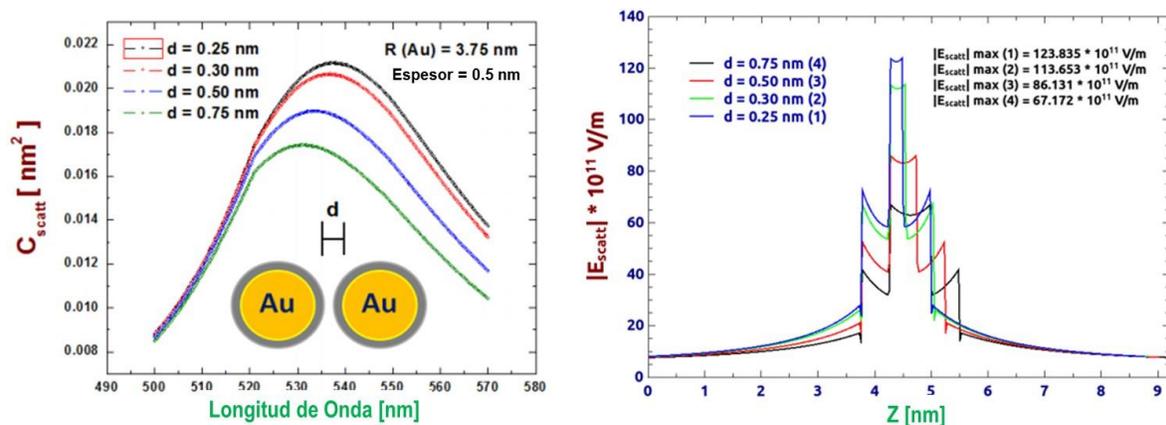


Figura 5.5. Sección transversal (C_{scatt}) y magnitud del campo eléctrico (E_{scatt}) para dímeros de NPsAu con un espesor de 0.5 nm y una distancia de separación entre partículas de 0.25-0.75 nm¹⁷.

En la **Figura 5.5** también se presenta la gráfica del campo eléctrico (E_{scatt}) en función de la coordenada “z”. En ella se muestra cómo los dímeros con una distancia de separación menor (0.25 nm) dispersan un campo eléctrico en su entorno de un orden de magnitud mayor al que presentan los sistemas con una separación mayor a los 0.25 nm. Estos resultados sugieren que un sistema óptimo está conformado por partículas que disten unas de otras lo menor posible, y esto no está lejos de la realidad si tenemos en cuenta que los sustratos se forman como películas multicapas donde los materiales están lo más compactos posibles (Ver **Figura 5.2**) o en el caso de los sistemas dispersos que la concentración del material sea lo más alta posible.

Los resultados teóricos de los sistemas presentados anteriormente nos muestran los límites de algunos parámetros que se deben controlar como es el caso del espesor del recubrimiento de sílice para mejorar las propiedades del material y tener una mayor respuesta de las señales Raman, que a pesar de no estar cerca de las condiciones óptimas presenta una buena respuesta de realce muy similar a la que presenta las nanopartículas de oro sin recubrir (Ver **Figura 5.3**). Esta contradicción puede deberse a la porosidad que posiblemente puede presentar el material que permite que la molécula de interés (L-Cys en nuestro caso) pueda estar más cerca del núcleo del sistema y por esto su respuesta Raman es similar a la de los núcleos de oro desnudos.

Un aumento del espectro Raman de la L-Cys se presentó en los nanocompositos propuestos similar al que presentan las nanopartículas de oro por lo que los sistemas propuestos son aptos para ser usados como sustratos SER. Los resultados para dímeros conformados por dos partículas de oro recubiertas con un espesor de sílice de 0.5 nm y distanciados 0.25 nm muestran que el campo eléctrico generado alrededor de estos sistemas es mayor en comparación con sistemas que presentan espesores de sílice mayor o distancias de separación entre partículas mayores. Todo lo anterior sugiere que las propiedades de los materiales propuestos se pueden mejorar con una disminución del espesor del recubrimiento, probablemente no hasta las dimensiones que se plantearon (0.5 nm) puesto que podría ser una limitante la técnica usada, pero si sería factible alcanzar espesores de sílice de 10 nm (esta afirmación basada en la obtención de sílice de entre 10-15 nm por esta misma técnica) y con esto mejorar las propiedades del material. No sobra decir que toda disminución de las dimensiones de las partículas conlleva problemas posteriores al momento de separar y purificar el material, pero sin duda generan sistemas de más calidad.

5.2. Prueba de fototermia de nanocompositos sobre osteoblastos, pruebas in vitro

Actualmente existe un sin número de estudios de nanopartículas metálicas aplicadas en terapia fototérmica [14-16], en los que se aprovecha la absorción de luz del sistema para poner en resonancia la nube electrónica del metal y calentar localmente la superficie de las nanopartículas que ubicadas en el lugar indicado puede deteriorar o matar células malignas por hipertermia ($\Delta T \sim 5-10$ °C) por lo que constituye una alternativa muy poderosa para tratar diversos tipos de tumores [17-19].

Anteriormente se demostró que los nanocompositos conformados de NPsAu@SiO₂:Eu son altamente biocompatibles (ver sección 4.4), en un ensayo preliminar con osteoblastos 303.2 µg/ml de los nanomateriales (de los cuales 89.05% SiO₂, 10.80% Au y 0.15%Eu) fueron incubados por 24 horas con estas células y mediante un conteo celular se determinó que más del 90% de la población celular se mantiene viable por lo que la citotoxicidad del material a esta concentración es baja y las partículas son prácticamente inocuas.

Basados en la viabilidad de los nanomateriales se realizó un test fototérmico en el que los sistemas se activaron con una fuente de radiación (láser verde, 532 nm) de longitud de onda cercana a la longitud de máxima absorción que corresponde al plasmón de resonancia de los materiales (522-528 nm). Nanomateriales incubados con osteoblastos en cajas de 96 pozos como se detalla en la sección 3.5.1 y 3.5.2, fueron irradiados con un láser verde de potencia 20 mW durante 90 segundos y posteriormente se realizó un conteo celular usando el azul de tripano como agente de contraste para determinar la mortandad por fototermia, tal como se muestra en la **Figura 5.6**.

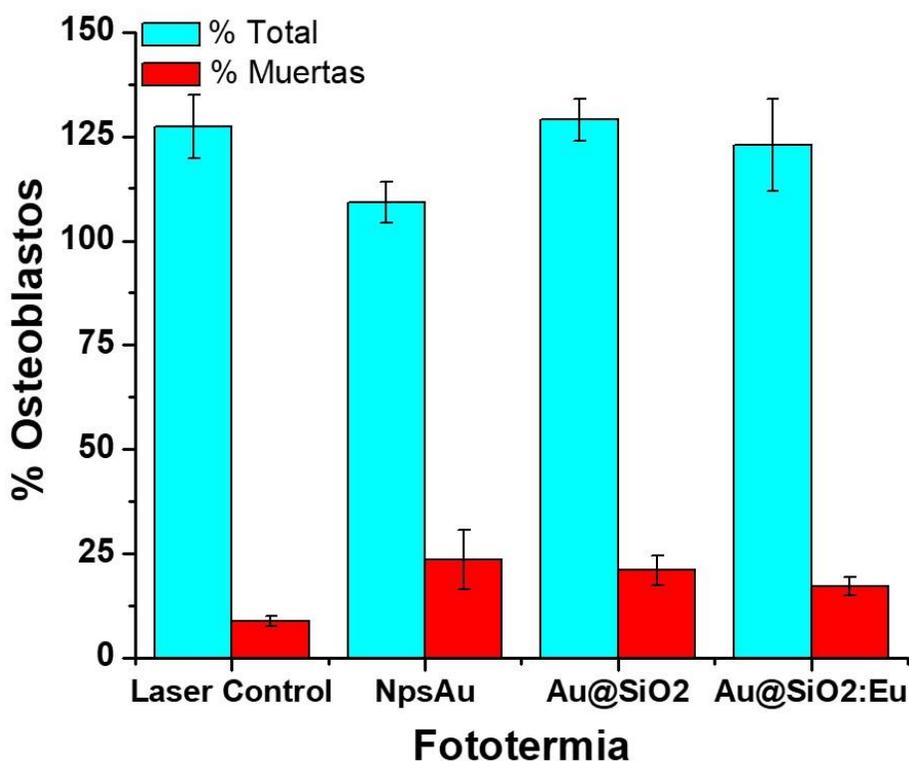


Figura 5.6. Evaluación fototérmica de nanomateriales irradiados con luz verde (20mW) en presencia de osteoblastos. Los porcentajes de población totales y de muerte de osteoblastos están calculados con base en la población del control positivo (C(+)) como referencia que se presentó en los resultados de viabilidad (Ver **Tabla 4.2**), donde el 100% corresponde a 610,000 células.

Los resultados obtenidos para un control donde las células son irradiadas sin la presencia de nanopartículas muestran que la exposición de las células a esta radiación durante 90 segundos no afecta la población celular de manera dramática (**Figura 5.6**), donde un 127.3% de la población encontrada en promedio en esta línea únicamente el 8.8% (resultados de la **Figura 5.6** se resumen

en la **Tabla 5.1**) corresponden a osteoblastos muertos que es un porcentaje muy similar al porcentaje de mortandad encontrado en el control sin exposición al láser (C(+)) Ver **Tabla 4.2**) por lo que suponemos que el láser por sí solo no está produciendo daño significativo en las células.

Muestra	Total	Muerte
Control Laser	127.3 ± 7.6	8.8 ± 1.2
NPsAu	109.2 ± 4.9	23.5 ± 7.2
NPsAu@SiO ₂	129.0 ± 5.0	21.0 ± 3.5
Au@SiO ₂ :Eu	123.0 ± 11.0	17.2 ± 2.2

Tabla 5.1. Porcentaje de osteoblastos muertos por hipertermia para los sistemas de NPsAu, NPsAu@SiO₂ y NPsAuSiO₂:Eu.

Para las muestras que contienen NPsAu el porcentaje de muerte es muy similar en todas (NPAu, Au@SiO₂ y Au@SiO₂:Eu) y está entorno al 20%. Esto significa que a estas concentraciones la incidencia del láser está activando el núcleo metálico de las partículas y produciendo cambios en el ambiente celular que causa este porcentaje de muerte en la población. Además, el recubrimiento de sílice y la incorporación del ion lantánido no están afectando de manera significativa las propiedades de las NPsAu (como ya se evidenció en la **Figura 4.1**) ni el efecto que están produciendo en los osteoblastos.

Los resultados sugieren que, si bien el porcentaje de mortandad de la población no es muy alto, los materiales finales conservan las propiedades del oro y bajo condiciones controladas (tiempo de exposición 90 S y láser verde de potencia 20 mW) como en nuestro caso no son muy invasivos, por lo que tienen un alto potencial para terapias térmicas si se mantienen bajos los tiempos de exposición y la potencia de la fuente irradiada a diferencia de muchos trabajos similares que usan fuentes de radiación de potencias mayores a 500 mW [17-19].

Además, los tres sistemas (NPsAu, Au@SiO₂ y Au@SiO₂:Eu) presentan valores similares en los porcentajes de muerte de osteoblastos encontrados, por lo que el mecanismo por el cual se está presentando un deterioro en la viabilidad celular es el mismo y es por hipertermia [17]. Un incremento de entre 5-10 °C es suficiente para matar células malignas en tratamientos para distintos tumores [20-21], pero incluso incrementos menores de temperatura pueden producir daños irreversibles en funciones vitales de las células que ocasionan la muerte de manera indirecta como muy posiblemente está ocurriendo en nuestro caso para estas condiciones en particular.

Una manera de determinar la temperatura que se produce en el medio en el que se encuentran las células es mediante la toma de imágenes termográficas de los pozos irradiados, la **Figura 5.7** muestra las termografías para cada una de las muestras de NPAu ($10^{-3}M$), NPsAu ($5 \cdot 10^{-4}M$), NPsAu@SiO₂ y NPsAu@SiO₂:Eu que se tomaron a tres tiempos de exposición (0, 2 y 4 minutos) a un láser verde de 20 mW de potencia.

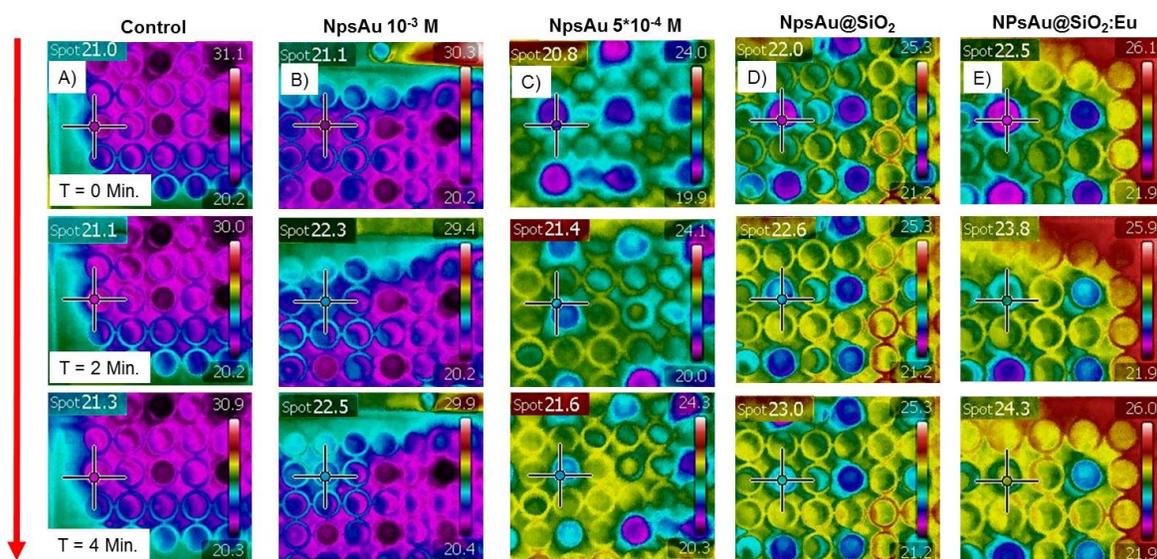


Figura 5.7. Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un láser verde (532 nm) de potencia 20 mW.

Una muestra de control se realizó sin nanopartículas y se presenta en la primera columna de la **Figura 5.7**, en ella se puede ver que la irradiación directa del láser al medio de cultivo no presenta cambios significativos en la temperatura durante los 4 minutos de exposición ($\Delta T = 0.3 \text{ } ^\circ\text{C}$) la variación en el color de las termografías como lo muestra la paleta de contraste a la derecha de las imágenes nos permite diferenciar pozos fríos de calientes.

En las termografías también se observa que las muestras correspondientes a NPsAu más concentradas ($10^{-3}M$) presentan incrementos de temperatura mayores respecto a la misma muestra que tiene la mitad de la concentración, por lo que el incremento en la temperatura es función de la concentración de nanopartículas en el medio. Las otras dos muestras correspondientes a los sistemas recubiertos con sílice y decorados con europio presentan incrementos similares a los de la muestra NPsAu ($5 \cdot 10^{-4}M$), en particular para la muestra de NPsAu@SiO₂:Eu presenta los mayores incrementos

de temperatura en el medio ($\Delta T = 1.8 \text{ }^\circ\text{C}$) y puede deberse a la presencia del lantánido que favorece la transferencia de energía al núcleo metálico.

En general los sistemas presentan incrementos de temperatura de entre 1-2 $^\circ\text{C}$ que son aproximadamente lo esperado debido a la baja potencia usada de la fuente de irradiación no tanto de la baja concentración de las NPsAu que si bien afecta, pero no de forma drástica tal y como se ve en la **Figura 5.7**.

Un ensayo similar al anterior, ahora usando una fuente de la misma naturaleza (532 nm) pero con una potencia de 400 mW se realizó para determinar el alcance que pueden tener los sistemas y qué tanto pueden incrementar la temperatura del medio en el que se encuentran. La **Figura 5.8** muestra las termografías para los mismos sistemas ahora irradiados con una fuente de potencia mayor durante el mismo tiempo, los resultados obtenidos para el control al igual que ocurrió con el láser de 20 mW muestran que el medio de cultivo por sí solo no absorbe la radiación incidente y el incremento de temperatura que se registra durante los 4 minutos es de apenas 1.1 $^\circ\text{C}$ por lo que el calentamiento del medio no va a depender únicamente de la potencia del láser sino también de la presencia de los sistemas con las nanopartículas de oro.

Las muestras que corresponden a los sistemas de NPsAu de dos concentraciones diferentes (10^{-3} y $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) presentan incrementos de temperatura de 28 y 21 $^\circ\text{C}$ respectivamente (Ver columna 2 y 3 de la **Figura 5.8**), por lo que una diferencia del doble de concentración de NPsAu en el medio incrementa alrededor de 7 $^\circ\text{C}$. Estos valores son importantes a la hora de ajustar un incremento óptimo de temperatura para aplicar en un tratamiento médico, ya sea aumentando la potencia del láser usado sin exponer el tejido circundante o la concentración del material sin llegar a valores tóxicos. En ambos casos se produce un incremento de temperatura, pero como ya se vió el aumento de la concentración de los materiales producen incrementos de temperatura menores.

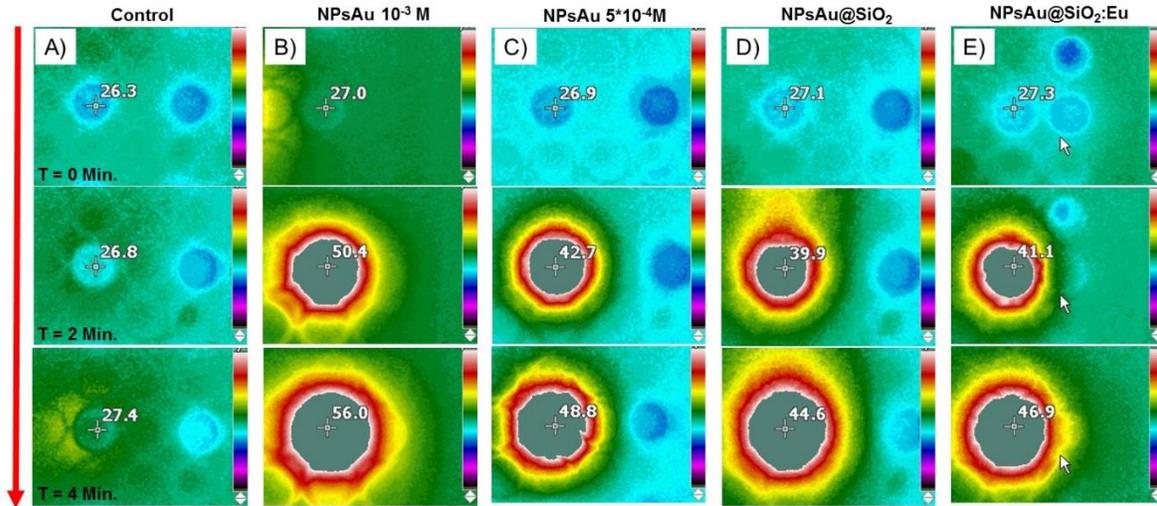


Figura 5.8. Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un láser verde (532 nm) de potencia 400 mW.

La respuesta de los materiales recubiertos y decorados con europio es similar a la que presenta las NPsAu (5*10⁻⁴M), además los materiales presentan la misma tendencia que tuvieron con el láser de potencia 20 mW por lo que independientemente de la potencia del láser la respuesta térmica va a ser muy similar a la que presentan las nanopartículas de oro desnudas.

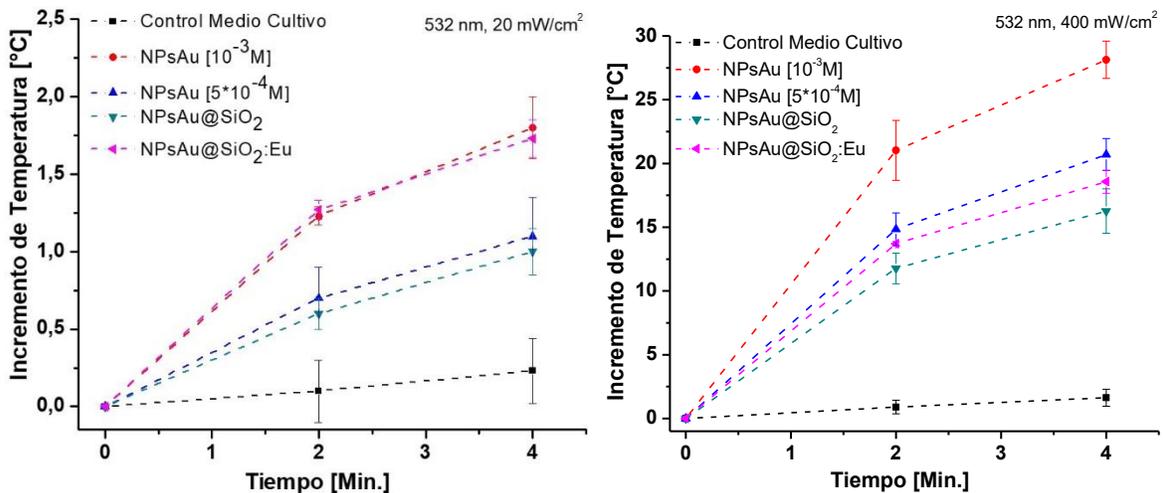


Figura 5.9. Incrementos de temperatura en función del tiempo de sistemas de NPsAu dispersas en medio de cultivo irradiadas con láser verde de 20 y 400 mW.

La **Figura 5.9** recoge los datos de temperatura obtenidos de las termografías de los sistemas que fueron expuestos a un láser verde de potencia 20 y 400 mW en función del tiempo. En la gráfica se puede ver más claramente las diferencias entre los incrementos de temperatura de las distintas muestras. Con excepción de la muestra de oro de mayor concentración que presentan las rampas de temperatura más grandes y el control que prácticamente no registra cambios de temperatura, las otras

muestras presentan rampas muy similares cómo ya mencionamos, con lo que se demuestra que los materiales recubiertos no presentan diferencias significativas respecto a las del oro.

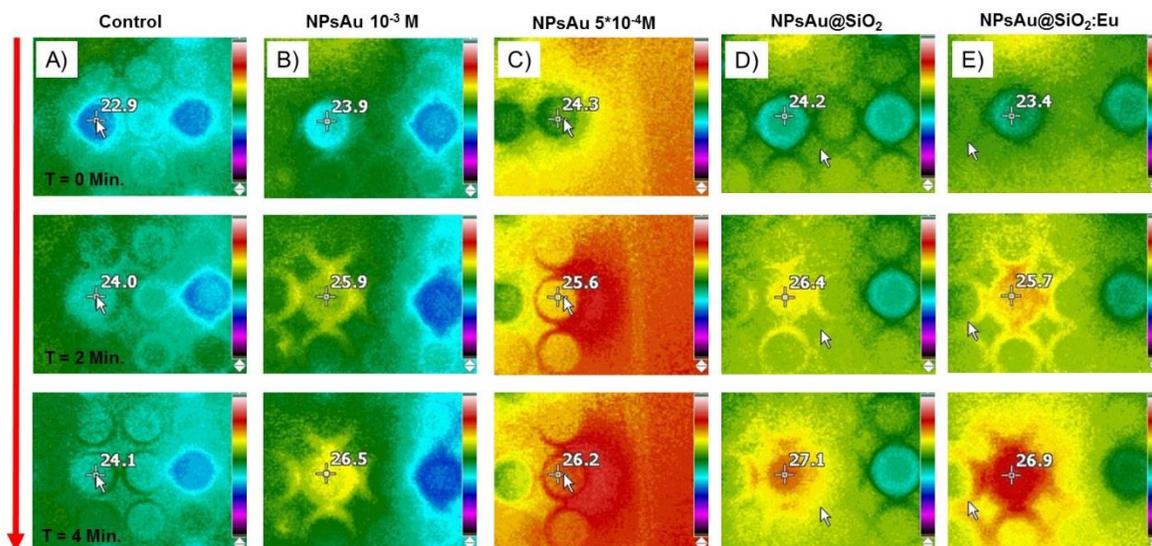


Figura 5.10. Termografías de sistemas conformados por las muestras de NPsAu dispersas en medio de cultivo e irradiadas con un diodo láser IR (785 nm) de potencia 135 mW.

Además, también se puede ver cómo la muestra que presenta la incorporación del lantánido es la que mejor conserva las propiedades del núcleo metálico en ambos casos (potencia de 20 y 400 mW). Este comportamiento se sigue presentando incluso cuando la muestra es irradiada con una fuente de excitación diferente a la longitud máxima absorción (diodo láser IR de 785 nm, potencia 135 mW) donde si bien la eficiencia en la absorción es baja aun así se siguen presentando incrementos de temperatura en los sistemas (Ver **Figura 5.10**), esto probablemente se deba como ya se mencionó anteriormente a fenómenos de transferencia de energía. En este caso, los incrementos de temperatura para la mayoría de muestras oscilan entre 2.5-3.0 °C y para la muestra con el europio de 3.5 °C.

Finalmente, podemos concluir que los materiales inducen un calentamiento del medio en respuesta a la absorción de la radiación a la que son expuestos, que puede explicar el incremento en la muerte celular de osteoblastos por hipertermia. Aunque en el experimento con sistemas celulares se usó el láser de más baja potencia (20 mW) a tiempos de exposición cortos (90 segundos), el incremento de la temperatura del medio alrededor de un par de grados promueve daños irreversibles en las células que desencadenan muerte directa o por apoptosis. Los sistemas conservan las propiedades del núcleo de oro, en particular los sistemas con el lantánido incorporado conservan mejor las propiedades del

oro e incluso mejoran cuando el sistema es irradiado por una fuente diferente a la longitud de absorción.

5.3. Evaluación fotocatalítica de nanocompositos para la degradación de metanol y producción de hidrógeno

Un ensayo para determinar la actividad fotocatalítica del material final (NPsAu@SiO₂:Eu) se realizó en la reacción de degradación de metanol para la producción de hidrógeno. Una respuesta positiva en esta área abre un sinnúmero de aplicaciones de los materiales tales como degradación de contaminantes orgánicos, remediación de aguas o tratamiento de aguas residuales, potabilización y desinfección; y además en algunas reacciones para la generación de energía como subproducto. En nuestro caso el material está conformado de un semiconductor que es el recubrimiento de los nanocompositos y que presenta actividad fotocatalítica como es demostrado en numerosos estudios, pero que además presenta un núcleo metálico que sirve como aceptor de electrones y que juega un papel importante en reacciones fotocatalíticas evitando uno de los principales inconvenientes que presentan todos los semiconductores usados en fotocatalisis como es la recombinación electrónica [22-23].

Los ensayos fotocatalíticos se realizaron usando 20 mg del sistema NpsAu@SiO₂:Eu como catalizador de la reacción de descomposición de metanol en presencia de agua a una proporción (1:1) (ver detalles en la sección 3.5.4), el catalizador se puso en el medio de reacción y se dejó 30 minutos en agitación y ausencia de luz para asegurar el equilibrio adsorción/desorción. Una lámpara UV (254 nm) fue usada como fuente para la fotorreacción durante 6 horas y monitoreada cada hora en un cromatógrafo de gases, los resultados obtenidos son ajustados a una curva de calibración de concentración de hidrógeno gaseoso.

La **Figura 5.11** muestra la evolución de la reacción de descomposición de metanol en función de la concentración de hidrógeno gaseoso (H_2) generado a lo largo del tiempo en ausencia (fotólisis, datos rojos) y presencia de un fotocatalizador $NpsAu@SiO_2:Eu$ (datos azules).

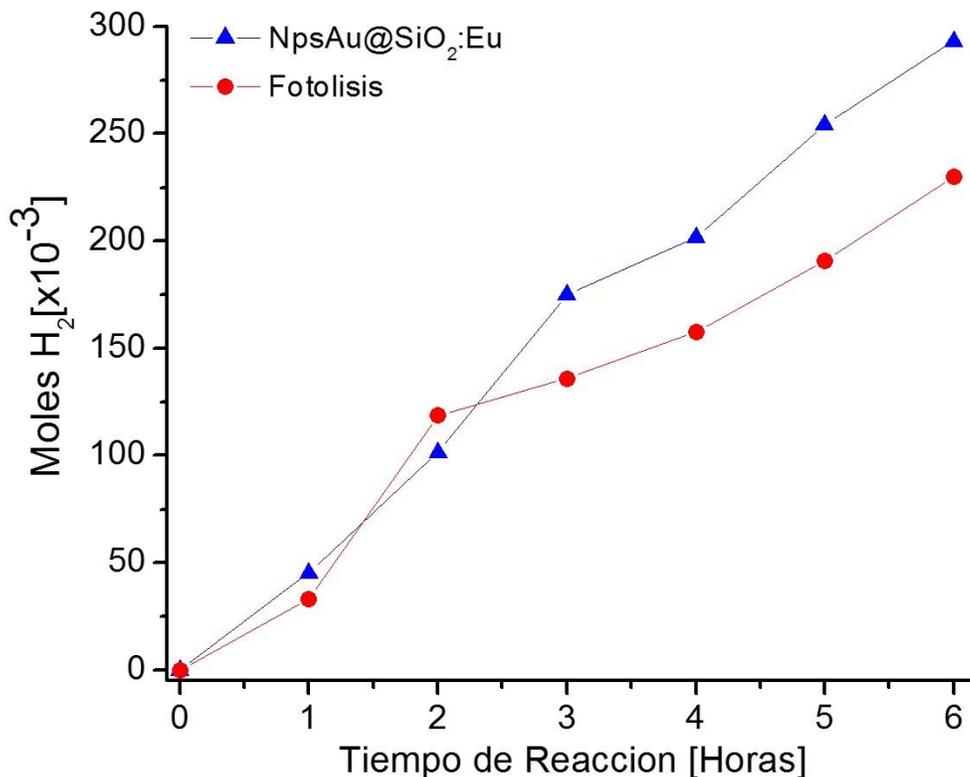
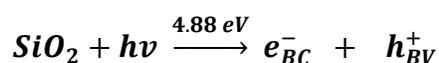


Figura 5.11. Moles de hidrógeno gaseoso en función del tiempo de reacción para la degradación fotocatalítica de metanol usando $NPsAu@SiO_2:Eu$.

Los resultados muestran que el material presenta una ligera actividad en relación con la fotólisis después de transcurridas dos horas de reacción. Las dos primeras horas la cantidad de hidrógeno que se produce es similar al que se produce en la fotólisis y esto puede ser debido a que el tiempo de equilibrio absorción-desorción fue insuficiente por lo que el material tarda más tiempo en interactuar con el metanol del medio. Transcurridas las dos horas el material mantiene una diferencia mayor en la concentración de hidrógeno que se genera, aunque no mucho mayor que la concentración generada por la fotólisis. La baja actividad puede deberse a la fase semicristalina que presenta la sílice en el material final que no favorece la degradación fotocatalítica (ver patrones de difracción de rayos X, **Figura 4.16**), aunque faltan estudios para poder corroborar esto.

De cualquier forma, el material presenta actividad fotocatalítica y en base a esto podemos encontrar las mejores condiciones del material que promuevan el aumento en su actividad.

La **Figura 5.12** muestra el mecanismo de acción fotocatalítica que presentan los materiales, el recubrimiento de sílice absorbe luz ultravioleta (UV, $h\nu = 254 \text{ nm}$) que promueve un electrón de la banda de valencia (e_{BC}^-) a la banda de conducción y genera una vacante o hueco en la banda de conducción (h_{BV}^+), tal como se denota en la ecuación:



Las moléculas de agua quimisorbidas en la superficie del material con los huecos generados en la banda de valencia forman radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) que son las principales especies químicas que se forman y promueven los mecanismos de degradación de las especies orgánicas presentes en el medio de reacción.

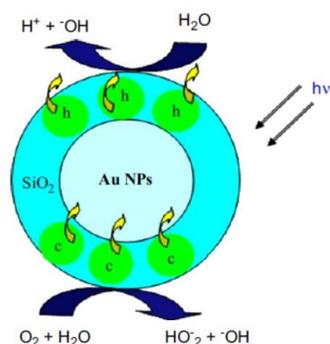
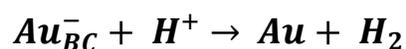
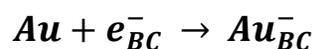


Figura 5.12. Mecanismo de acción fotocatalítica de sistemas de NPs Au@SiO₂²³

Además, los electrones de la banda de conducción reaccionan con el oxígeno disuelto en el medio para producir radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que mediante otra serie de reacciones generan más radicales hidroxilo. El principal factor que afecta la eficiencia de una reacción fotocatalítica es la concentración de radicales hidroxilo, por lo que cualquier mecanismo que promueva su formación favorece la eficiencia en la degradación fotocatalítica.

²³ Imagen tomada de: *J. Phys. Chem. Solids*, **2007**, 68, 413–419.

El papel principal que juega el núcleo metálico en el sistema es consumir los electrones presentes en la banda de conducción de la sílice y evitar la recombinación de cargas. Las siguientes ecuaciones químicas muestran cómo pueden actuar las NPsAu aceptando los electrones y promoviendo la formación de otras especies químicas en el medio de reacción lo cual debe favorecer la degradación fotocatalítica:



Podemos ver que en si la composición de los materiales conformados de NPsAu@SiO₂:Eu favorecen las reacciones fotocatalítica, por lo que se recomienda que éstos sean evaluados más rigurosamente (concentración de catalizador y comparación con otro catalizadores usualmente empleados) y en otro tipo de reacciones, por lo que no se descarta sus potenciales aplicaciones en esta área. Además, en la evaluación queda pendiente el estudio del papel que juega el ion lantánido que posiblemente también puede aportar una mejora en las propiedades fotocatalíticas de la sílice.

Referencias

- [1] *Raman Spectroscopy and Applications*; Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals, Cap.10, **2017**, 201-223.
- [2] UV Resonance Raman Investigations of Peptide and Protein Structure and Dynamics, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 2604–2628.
- [3] Acquisition of Raman spectra of amino acids using portable instruments: Outdoor measurements and comparison, *Acta Mol. Biomol. Spectros.*, **2010**, 77 (5), 978-983.
- [4] Reference Database of Raman Spectra of Biological Molecules, *J. Raman Spectrosc.*, **2007**, 38, 1133-1147.
- [5] Part I: Surface-enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Amino Acids and their Homodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver, *Appl. Spectrosc.*, **2004**, 58, 570-580.
- [6] Highly Sensitive and Selective Detection of Trinitrotoluene Using Cysteine-capped Gold Nanoparticles, *Anal. Methods*, **2016**, 8, 4398-4405.
- [7] Surface Enhanced Raman Scattering of Amino Acids Assisted by Gold Nanoparticles and Gd³⁺ Ions, *J. Phys. Chem. A* **2015**, 119, 4127-4135.
- [8] Raman Study of Pressure-induced Phase Transitions in Crystals Orthorhombic and Monoclinic Polymorphs of L-Cysteine: Dynamics, *J. Raman Spectrosc.*, **2010**, 41, 1458–1468.
- [9] In Situ Raman Spectroscopy Distinguishes Between Reversible and Irreversible Thiol Modifications in L-Cysteine, *RSC Adv.*, **2017**, 7, 2964–2970.
- [10] Numerical Simulation of Electron Energy Loss Near Inhomogeneous Dielectrics, *Phys. Rev. B* **1997**, 56, 15873–15884.
- [11] Retarded Field Calculation of Electron Energy Loss in Inhomogeneous Dielectrics, *Phys. Rev. B* **2002**, 65, 115418, 1-17.
- [12] The SERS Effect in Coordination Chemistry, *Coord. Chem. Rev.*, **2017**, 333, 108-131.
- [13] Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B* **1972**, 6, 4370–4379.
- [14] *Nanomaterials for the Life Sciences: Mixed Metal Nanomaterials*, **2009**, Vol. 3, Gold Nanoshells in Biomedical Applications, 1-44.
- [15] Macrophage Cell Membrane Camouflaged Au Nanoshells for in Vivo Prolonged Circulation Life and Enhanced Cancer Photothermal Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, 8, 9610–9618.
- [16] Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces*, **2007**, 111(9), 3636–3641.
- [17] Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas, *Cancer Res.*, **2009**; 69 (9), 3982-3900.
- [18] Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, 82, 412–417.
- [19] Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120, 4691–4716.
- [20] Gold Nanocages as Photothermal Transducers for Cancer Treatment, *Small*, **2010**, 6 (7), 811–817.

Capítulo V

[21] Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 13549–13554.

[22] Photocatalytic Degradation of Methyl Orange by Gold Silver Nano-core/silica Nano-shell, *J. Phys. Chem. Solids*, **2007**, 68, 413–419.

[23] Photooxidation Mechanism of Methanol on Rutile TiO₂ Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 6623–6635.

[24] Redox Catalysis Using Ag@SiO₂ Colloids, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 6770–6773.

[25] Ag-Nanoparticle-Decorated SiO₂ Nanospheres Exhibiting Remarkable Plasmon-Mediated Photocatalytic Properties, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, 116, 19039–19045.

Conclusiones

- ✓ Se obtuvieron materiales híbridos conformados de NPsAu-Tyr-Gd, donde la incorporación del ion Gd funciona como espaciador entre las nanopartículas (generando mayor número de hotspots) y el aminoácido mejorando la respuesta de las señales Raman en al menos un orden de magnitud comparado con el que se obtiene usando únicamente las nanopartículas de oro. Además, el estudio del campo eléctrico cercano alrededor del sistema híbrido es mayor que el de los sistemas conformados únicamente por NPsAu por lo que también contribuyen al aumento de las señales Raman. Los sistemas propuestos pueden ser usados como sustratos SERS, pudiéndose extender su rango de sistemas de estudio a moléculas biológicas similares, proteínas, enzimas, etc. Desafortunadamente la baja estabilidad de los sistemas nos obligó a modificar los materiales para poderlos usar en las aplicaciones propuestas, pero los sistemas propuestos conservan la conformación del núcleo metálico y el ion lantánido.
- ✓ Nanomateriales conformados de un núcleo metálico de oro recubierto de sílice y decorado con iones europio de dimensiones inferiores <100 nm estables en polvo o en dispersiones acuosas fueron obtenidos controlando la velocidad de formación de la sílice. En particular los sistemas de NPsAu@SiO₂:Eu presentan propiedades similares a las de las NpsAu, por lo que el recubrimiento de SiO₂ no está afectando significativamente las propiedades ópticas, como lo muestran los espectros de absorción UV-Vis.
- ✓ La caracterización de los materiales corrobora la composición química presente, los FT-IR muestran la presencia de sílice posiblemente amorfa que en las condiciones de tratamiento y medición (T = 110 °C) presentan baja humedad, mientras que los patrones de DRX muestran sistemas de nanopartículas de oro conformados por una fase cúbica centrada en las caras y sílice amorfa que es estable hasta 600 °C conservando la conformación núcleo-recubrimiento, pero que por encima de esta temperatura favorece la formación de la fase cristobalita.
- ✓ Los nanocompositos producen un realce de la señal Raman del grupo CH₂ de la L-cisteína similar al que producen las nanopartículas de oro que no presentan recubrimiento de sílice, por lo que podemos decir que el recubrimiento no está restando las propiedades de realce

Conclusiones

que presentan las nanopartículas de oro. Si bien las propiedades de las nanopartículas no aumentaron debido al espesor del recubrimiento al menos estas se mantienen y permiten al material conservar el realce que produce el núcleo metálico por lo que no se descartan para potenciales aplicaciones.

- ✓ Los nanomateriales presentan una baja citotoxicidad y la viabilidad en osteoblastos a la concentración de (303.2 $\mu\text{g/ml}$) es superior al 90% en una prueba realizada durante 24 horas de incubación, por lo que estos sistemas son altamente compatibles a estas condiciones en sistemas biológicos y pueden usarse para diferentes tipos de ensayos en estos medios.
- ✓ Los resultados obtenidos en la prueba de fototermia sugieren que, si bien el porcentaje de mortandad de la población no es muy alto, los materiales finales conservan las propiedades del oro y bajo condiciones controladas (tiempo de exposición 90 S y láser verde de potencia 20 mW) como en nuestro caso no son muy invasivos, por lo que tienen un alto potencial para terapias térmicas si se encuentran las condiciones adecuadas.
- ✓ Las termografías muestran que al ser irradiados los sistemas de NpsAu con los osteoblastos el material está induciendo un calentamiento en el medio en respuesta a la absorción de radiación proveniente del láser que explica el aumento de la muerte celular ya sea por hipertermia o por apoptosis promovida por deterioro de alguna función vital de la célula, por lo que los materiales son potenciales candidatos para ser aplicados en terapia fototérmica.
- ✓ La respuesta térmica de los materiales a la exposición de un láser de longitud de onda cercana a la de máxima absorción, es función de la potencia de éste y de la concentración de los nanomateriales en el medio, presentando los incrementos de temperatura mayores en los cambios de potencia más que en los de concentración de los materiales. Además, los sistemas de NpsAu@SiO₂:Eu son los que conservan mejor las propiedades térmicas del oro e incluso las supera cuando la fuente de radiación es diferente a la longitud de máxima absorción.
- ✓ En sí la composición de los materiales conformados de NPsAu@SiO₂:Eu favorecen las reacciones fotocatalítica y en la foto degradación de metanol para la generación de hidrógeno presenta valores de concentración de H₂ mayores que la fotólisis después de 2 horas de

Conclusiones

reacción. Con una evaluación más rigurosa (concentración de catalizador y comparación con otros catalizadores usualmente empleados) y en otro tipo de reacciones, no se descartan los materiales para ser aplicados en esta área.

- ✓ La metodología presentada para la síntesis de los sistemas de $\text{NPsAu@SiO}_2\text{:Eu}$ puede ser extendida a otro tipo de núcleos metálicos (NPsAg@SiO_2 , también se obtuvieron pero no se presentan en este trabajo) y otro tipo de lantánidos (Gadolinio, $\text{NPsAg@SiO}_2\text{:Gd}$ también se sintetizó pero no se presentan en el trabajo) que potencian aún más la gama de aplicaciones de los materiales y que pueden ser elaborados dependiendo de la aplicación para la cual se requiera.