

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS**



TESIS

**PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES, MORFOLÓGICAS,
ÓPTICAS Y ANTIMICROBIANAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
ULTRAFINAS SINTETIZADAS CON METABOLITOS Y FITOQUÍMICOS**

**PRESENTA
LIC. GUILLERMO CRUZ MARTÍNEZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL**

ENERO, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS



TESIS

**PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES, MORFOLÓGICAS,
ÓPTICAS Y ANTIMICROBIANAS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
ULTRAFINAS SINTETIZADAS CON METABOLITOS Y FITOQUÍMICOS**

**PRESENTA
LIC. GUILLERMO CRUZ MARTÍNEZ**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

ENERO, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES, MORFOLÓGICAS,
ÓPTICAS Y ANTIMICROBIANAS DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA ULTRAFINAS SINTETIZADAS CON METABOLITOS Y
FITOQUÍMICOS**

Tesis que presenta:

Lic. Guillermo Cruz Martínez

Para obtener el Grado de
**DOCTOR EN
INGENIERÍA FÍSICA INDUSTRIAL**

Directores de Tesis:

Dr. Carlos Luna Criado	Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, UANL. Nuevo León, México.
Dra. Raquel Mendoza Reséndez	Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, UANL. Nuevo León, México.
Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño	Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Nuevo León, México.

San Nicolás de los Garza, N.L. Enero 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES, MORFOLÓGICAS,
ÓPTICAS Y ANTIMICROBIANAS DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA ULTRAFINAS SINTETIZADAS CON METABOLITOS Y
FITOQUÍMICOS**

Tesis que presenta:

Lic. Guillermo Cruz Martínez

Comité de Tesis Doctoral:

Dr. Carlos Luna Criado
Presidente

Dra. Raquel Mendoza Reséndez

Secretaria

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Primer Vocal

Dr. Miguel Ángel Gracia Pinilla

Segundo Vocal

Dr. José Rubén Morones Ibarra

Tercer Vocal

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

En esta investigación se proponen y estudian métodos de síntesis más sustentables que los convencionales, de nanoestructuras de plata con aplicaciones potenciales en plasmónica, tecnología de sensores y nanomedicina. Se introduce un método sencillo de síntesis de matrices nanoscópicas de ácido ascórbico que embeben y estabilizan núcleos nanoscópicos cristalinos de plata, uniformes en tamaño, con un diámetro de 3.3 ± 1.5 nm. El procedimiento de preparación consiste en la reducción de iones Ag^+ procedentes de la solución de nitrato de plata en agua utilizando soluciones acuosas de ácido ascórbico con concentraciones superiores a las exploradas en otros estudios, y que fueron previamente calentadas a 70°C . Los nanocompuestos resultantes muestran una morfología alargada con longitudes de 120 a 200 nm, y anchos entre 30 y 70 nm, presentando núcleos nanoscópicos de plata metálica en su interior. En estas nanoestructuras se excitan plasmones superficiales localizados a longitudes de onda alrededor de 400 nm. Por otra parte, se encontró que este material muestra una actividad antimicrobiana mejorada contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

También se han estudiado nanopartículas basadas en plata obtenidas por medio de síntesis mediadas por extractos naturales, caracterizando su composición y microestructura, así como sus propiedades espectroscópicas y bactericidas. Específicamente, se sintetizaron nanopartículas mediante la reducción de iones de plata a su estado metálico empleando extractos de semillas de *Salvia hispanica* L. (chía). Los estudios microestructurales y morfológicos mostraron que las muestras resultantes están constituidas por una mezcla de nanopartículas de Ag y AgCl que tienden a coalescer cuando se depositan sobre un sustrato. Las caracterizaciones mediante espectroscopias infrarroja y Raman revelaron que estas partículas están recubiertas por metabolitos de las semillas de chía, principalmente proteínas y polifenoles. Los espectros UV-visible mostraron bandas de extinción asociadas a excitaciones plasmónicas dipolares. Adicionalmente, ensayos biológicos mostraron que estas partículas son agentes antimicrobianos potentes.

ABSTRACT

In the present investigation, sustainable syntheses of silver nanostructures with potential applications in plasmonics, sensor technology and nanomedicine are proposed and studied. A facile method of synthesis of a nanocomposite is introduced. This material consists of nanoscopic matrices of ascorbic acid that embed and stabilize silver crystalline nanoscopic nuclei, uniform in size, with a mean diameter of 3.3 ± 1.5 nm. The preparation procedure consists of the reduction of Ag^+ ions from an aqueous silver nitrate solution in water using aqueous solutions of ascorbic acid with concentrations higher than those explored in other studies, and which were previously heated to 70°C . The resulting nanocomposites show an elongated morphology with lengths of 120 to 200 nm, and widths between 30 and 70 nm, embedding nanoscopic nuclei of metallic silver. In these nanostructures, localized surface plasmons at wavelengths around 400 nm are excited. On the other hand, it was found that this material shows an improved antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Silver-based nanoparticles obtained by means of sustainable synthesis mediated by natural extracts have also been studied. Specifically, the composition, microstructural, spectroscopic and bactericidal properties of nanoparticles synthesized by reducing silver ions to their metallic state using extracts of seeds of *Salvia hispanica* L. (chía) have been investigated. The microstructural and morphological studies showed that the obtained nanostructures are a mixture of Ag and AgCl nanoparticles that tend to coalesce when they are deposited on a substrate. The characterizations by infrared and Raman spectroscopy revealed that these particles are coated by metabolites of chia seeds, mainly proteins and polyphenols. The UV-visible spectra showed extinction bands associated to dipolar plasmonic excitations. Additionally, biological assays showed that these particles are potent antimicrobial agents.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis fue publicado en la revista *Journal of Cluster Science*, bajo la cita:

Luna, C., Cruz-Martínez, G., Barriga-Castro, E. D., Gómez-Treviño, A., & Mendoza-Reséndez, R. (2018). Synthesis, Characterization and Improved Bactericide Activity of Ellipsoidal Nanoscopic Ascorbic Acid Matrixes Embedding Ultrafine Silver Nuclei. *Journal of Cluster Science*, 29(3), 425-430.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Vitales de la catedral de Notre Dame (Paris), con colores llamativos proporcionados por la presencia de nanopartículas.	24
Figura 1.2	Copa de Licurgo, con iluminación reflejada (izquierda) y con iluminación transmitida (derecha).Figura extraída de la referencia [7].	29
Figura 1.3	Un ejemplo de porcelana de la "Familia Rosa" expuesta en el Museo Guimet de París. Figura extraída de la referencia [7].	30
Figura 1.4	Diagrama que resume la interacción de la plata en la nano-escala con células bacterianas: (1) liberación de iones de plata y generación de ROS; (2) interacción con las proteínas de membrana que afecta su correcto funcionamiento; (3) acumulación en la membrana celular afectando su permeabilidad; y (4) dentro de la célula en la que puede generar ROS, liberar iones de plata, y afectar el ADN. La generación de ROS también puede afectar el ADN, membrana celular, y proteínas de la membrana, y la liberación de iones de plata es probable que afecten ADN y las proteínas de membrana. Figura extraída de la referencia [13].	32
Figura 1.5	Nanopartículas de plata unidas a la membrana celular de <i>E. Coli</i> (a) y <i>S. typhus</i> (b).Figura extraída de la referencia [10].	33
Figura 1.6	Imágenes de bacterias <i>E. Coli</i> en presencia de nanopartículas de plata tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión en campo oscuro: a) Se observa una presencia considerable de nanopartículas de plata en la membrana y el interior de una bacteria de <i>E. coli</i> . b) imagen de alta magnificación de una bacteria de <i>E. Coli</i> con nanopartículas de plata en su interior. Figura extraída de la referencia [10].	33
Figura 1.7	a) Representación de un plasmón superficial y b) simulación de plasmones superficiales SPs. Figura extraída de la referencia [36].	41

Figura 1.8	a) Interacción de la radiación electromagnética con partículas metálicas esféricas, donde la partícula es más pequeña que la longitud de onda de la radiación incidente. b) Simulación del campo eléctrico un plasmón superficial localizado. Figura extraída de la referencia [36].	42
Figura 1.9	Interacción de la radiación electromagnética con partículas metálicas cilíndricas, donde la partícula es más pequeña que la longitud de onda de la radiación incidente. Figura extraída de la referencia [8].	42
Figura 1.10	a) Serie de coloides de nanopartículas de plata mostrando diferentes tonalidades debidas al cambio de tamaño, el cual tiene una asociación directa con la RPSL. b) Algunas bandas de plasmón experimentales representativas. Figura extraída de la referencia [38].	43
Figura 1.11	Descripción esquemática de un sensor PS. Figura extraída de la referencia [45].	44
Figura 2.1	Coordenadas polares esfericas con centro en una partícula de radio $r = a$. Figura extraída de la referencia [8].	58
Figura 3.1	Regiones del espectro electromagnético, clasificados según su longitud de onda, frecuencia y número de onda. Figura extraída de la referencia [1].	65
Figura 3.2	Generación de rayos X cuando los electrones de un filamento calentado, F, acelerados mediante una diferencia de potencial, V, chocan con un blanco metálico, T, dentro de una cámara evacuada, C. La ventana W es transparente a los rayos X. Figura extraída de la referencia [4].	67
Figura 3.3	Un haz de rayos X choca con un cristal C. Aparecen haces difractados intensos en ciertas direcciones, formando un patrón de Laue sobre la película fotográfica S. Figura extraída de la referencia [4].	67
Figura 3.4	Vista exagerada de las reflexiones de Bragg por varios planos en un cristal. Figura extraída de la referencia [3].	68

Figura 3.5	Transiciones electrónicas para las capas cercanas al núcleo, que dan lugar a los espectros característicos de los rayos X. Figura extraída de la referencia [3].	69
Figura 3.6	Radiación Bremsstrahlung producido por la aceleración de un electrón en un campo coulombiano. Figura extraída de la referencia [3].	70
Figura 3.7	Espectro de rayos X de la plata, en este se muestran los espectros Bremsstrahlung y característicos. Figura extraída de la referencia [3].	70
Figura 3.8	Esquema del método de Laue por transmisión. Figura extraída de la referencia [8].	72
Figura 3.9	Esquema del método de Laue por retroreflexión. Figura extraída de la referencia [8].	73
Figura 3.10	Esquema del método de cristal giratorio. Figura extraída de la referencia [9].	74
Figura 3.11	Cámara de Polvo Cristalino de Debye - Scherrer. Figura extraída de la referencia [8].	75
Figura 3.12	Geometría del método de polvo cristalino (Debye - Scherrer). Figura extraída de la referencia [8].	75
Figura 3.13	La figura muestra las transiciones electrónicas, y además los niveles vibracionales y rotacionales dando como resultado los espectros UV-Visible que observamos. Figura extraída de la referencia [2].	77
Figura 3.14	Diferentes transiciones electrónicas en un formaldehído, la cual depende de la energía. Figura extraída de la referencia [2].	78
Figura 3.15	Niveles de energía electrónicos de orbitales moleculares. Figura extraída de la referencia [1]	79
Figura 3.16	Atenuación de un haz de luz al pasar sobre una muestra en diferentes concentraciones. Figura extraída de la referencia [2]	80

Figura 3.17	Representación inicial para la deducción de la ley de Beer.Figura extraída de la referencia [1].	81
Figura 3.18	Absorción de un haz incidente P_0 a través de un bloque de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].	82
Figura 3.19	Dos bloques de las mismas condiciones superpuestos al paso de un haz incidente. Figura extraída de la referencia [11].	82
Figura 3.20	Interacción de un haz incidente a través de dos bloques de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].	82
Figura 3.21	La longitud b de la muestra es representada con n cantidad de bloques de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].	82
Figura 3.22	Se indican los dos tipos de vibraciones moleculares, a) Tensión y b) Flexión; + Indica movimiento del plano de la pagina hacia el lector , - Indica movimiento del plano de la pagina alejándose del lector. Figura extraída de la referencia [1].	84
Figura 3.23	Disolventes utilizados en espectroscopia de infrarrojo cercano. Las líneas continuas indican una transparencia satisfactoria para emplearlos con cubetas de 1 cm. Figura extraída de la referencia [1].	86
Figura 3.24	Disolventes utilizados en la región del infrarrojo medio. Las líneas horizontales indican las regiones útiles. Figura extraída de la referencia [1].	87
Figura 3.25	Vista aumentada de una cubeta de infrarrojo desmontable para muestras liquidas, la cual dispone de espaciadores de teflón con grosor de 0.015 a 1 mm. Figura extraída de la referencia [1].	88
Figura 3.26	Interacción de un haz con una partícula. Figura extraída de la referencia [13]	89
Figura 3.27	Chandrashekhara Venkata Raman (1888-1970)	90
Figura 3.28	Representación esquemática de la dispersión de la luz por una partícula. Figura extraída de la referencia [12].	92

	La energía proveniente del haz incidente no es suficiente para llegar a un estado electrónico excitado, pero sí para realizar un cambio de estado vibracional. Además se muestra la diferencia entre una línea <i>Raman Stokes</i> y <i>Raman Anti-Stokes</i> . Figura extraída de la referencia [12].	92
Figura 3.29		
	Espectro Raman de CCl_4 excitado con una fuente laser de $\lambda_0 = 488$ nm ($\bar{\nu} = 20492\text{cm}^{-1}$). Figura extraída de la referencia [1].	95
Figura 3.30		
	Representación esquemática de la óptica de un espectrómetro Raman- FT. Figura extraída de la referencia [1].	97
Figura 3.31		
	Lente magnética para electrones, y su análogo óptico. Figura extraída de la referencia [18].	98
Figura 3.32		
	Lente electromagnética de doble abertura, y su análogo óptico. Figura extraída de la referencia [18].	98
Figura 3.33		
	Lentes electrónicas simétricas. Figura extraída de la referencia [18].	98
Figura 3.34		
	Comparación de la óptica electrónica con la luminosa. Figura extraída de la referencia [18].	99
Figura 3.35		
	Comparación del microscopio óptico con el electrónico. Figura extraída de la referencia [18].	99
Figura 3.36		
	Interacción del haz con la muestra.	100
Figura 3.37		
	Formas de interacción entre los electrones del haz y los electrones que conforman el átomo de las diferentes muestras.	100
Figura 3.38		
	Camino de rayos para la formación de imagen.	103
Figura 3.39		
	Formación de imágenes de campo brillante.	103
Figura 3.40		
	Formación de imágenes de campo oscuro.	103
Figura 3.41		
	Diagrama para obtener un campo oscuro axial.	104
Figura 3.42		
	Difracción de electrones de área selecta (DEAS).	104
Figura 3.43		
	Fundamento teórico para la técnica EDEX.	105
Figura 3.44		

	a) y b) Imágenes de MET de campo brillante de bajos aumentos. c)	
Figura 4.1	Imagen de MET de campo oscuro de bajos aumentos. d)-i) Imágenes de MET convencional de altos aumentos.	111
	Distribución de tamaños de los núcleos de plata encontrados dentro de las matrices de ácido ascórbico. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa.	
Figura 4.2		112
Figura 4.3	Espectro EDEX de las nanoestructuras de plata / vitamina C.	113
	a) y b) Imágenes de microscopía electrónica de alta resolución de núcleos cristalinos de plata embebidos en vitamina C. c) Patrón de difracción de electrones de área selecta.	
Figura 4.4		114
Figura 4.5	Patrón de difracción de rayos X de las nanoestructuras plata/ácido ascórbico.	115
	Espectros UV-visible de ácido ascórbico puro disuelto en agua bidestilada y de suspensiones de nanoestructuras de Ag/ácido ascórbico en agua.	
Figura 4.6		116
	a) Valores calculados mediante la teoría de Mie de las secciones eficaces de extinción de nanopartículas de plata esféricas en agua (índice de refracción $n=1.333$), como funciones de la longitud de onda de la radiación incidente y el diámetro de partícula. b) Evolución del máximo de la sección eficaz de extinción de nanopartículas de plata esféricas en agua con el diámetro de la partícula.	
Figura 4.7		117
	Espectro UV-visible obtenido al substrar al espectro de las nanoestructuras de plata/ácido ascórbico la absorbancia medida para el ácido ascórbico puro. Se compara este espectro con los espectros simulados aplicando la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas de diámetro de 3.3 nm en agua y para partículas de plata (no interactuantes) esféricas considerando la distribución de diámetros de la figura 4.2.	
Figura 4.8		118

Figura 4.9	Espectro infrarrojo de las nanoestructuras de plata/ácido ascórbico.	119
Figura 4.10	a) Espectro infrarrojo del ácido ascórbico reportado en la referencia [4]. b) Tabla reportada en la referencia [5], con los datos espectrales correspondientes a la espectroscopias infrarroja, Raman y SERS correspondientes al ácido ascórbico.	120
Figura 4.11	Fotografías de (a) <i>S. typhimurium</i> y (b) <i>S. aureus</i> incubadas en placas de agar durante 24h a 37 °C en presencia de una alícuota de 20 μ l del coloide de las nanopartículas de Ag ultrafinas embebidas en ácido ascórbico, con una concentración de plata de 2 mg /l. c) Relación entre los valores de absorbancia del pocillo de cultivo incubado y el control de cepa positiva en experimentos llevados a cabo con <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i> , respectivamente, en función del contenido de plata presente en el pocillo de cultivo.	121
Figura 4.12	Patrones de DRX de las muestras S-5mM y S-0.1M. También se indican las posiciones e intensidades relativas de los picos (hkl) correspondientes a las fases de plata metálica (JCPDS 04-0783) y cloruro de plata (JCPDS 31-1238).	126
Figura 4.13	Ajustes de varios picos de difracción de la muestra S-5mM a funciones lorentzianas: a) $(200)_{AgCl}$, b) $(111)_{Ag}$, c) $(200)_{Ag}$, d) $(220)_{Ag}$, e) $(311)_{Ag}$ y f) $(222)_{Ag}$.	128
Figura 4.14	Ajustes de varios picos de difracción de la muestra S-0.1M a funciones lorentzianas: a) $(200)_{AgCl}$, b) $(111)_{Ag}$, c) $(200)_{Ag}$, d) $(220)_{Ag}$ y e) $(311)_{Ag}$.	129
Figura 4.15	Caracterizaciones de la muestra S-5mM realizadas con electrones: a), b) y c) son imágenes MET. d) Patrón de DEAS de la misma muestra. e) Distribución de tamaños. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa. La curva verde muestra un mejor ajuste considerando dos distribuciones Gaussianas.	132

Figura 4.16	<p>Caracterizaciones de la muestra S-0.1M realizadas con electrones: a), b) y c) son imágenes MET. d) Patrón de DEAS de la misma muestra. e) Distribución de tamaños. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa.</p>	133
Figura 4.17	<p>Imágenes de MET de alta resolución (a y c) y sus respectivas transformadas rápidas de Fourier (b y d). Los. Patrones de puntos de difracción de estas últimas imágenes se han indexado a los ejes de zona [110] y [001] de la plata metálica.</p>	134
Figura 4.18	<p>Espectro EDEX de las nanoestructuras de la muestra S-0.1M.</p>	135
Figura 4.19	<p>Espectros UV-visible del extracto de semillas de chía empleado en las síntesis y de las muestras S-5mM y S-0.1M. Estos espectros experimentales son comparados con los simulados con la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas con diámetros de 20 nm y 50 nm suspendidas en agua.</p>	136
Figura 4.20	<p>Espectros infrarrojos del extracto de semillas de chía empleado en las síntesis y de las muestras S-5mM y S-0.1M</p>	138
Figura 4.21	<p>Espectro infrarrojo de <i>Salvia hispanica</i>. Obtenido por Hermoso - Díaz.^[14]</p>	138
Figura 4.22	<p>Espectros Raman de las muestras S-5mM y S-0.1M</p>	144
Figura 4.23	<p>Relación entre los valores de absorbancia del pocillo de cultivo incubado y el control de cepa positiva en experimentos llevados a cabo con <i>S. typhimurium</i>, en función del contenido de plata presente en el pocillo de cultivo.</p>	145

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Propiedades generales de la plata en bulto.	25
Tabla 1.2	Toxicidad de las nanopartículas según su forma y composición. Tabla extraída y acoplada de la referencia [5]	28
Tabla 1.3	Resumen de los métodos convencionales para la obtención de nanopartículas de plata.	36
Tabla 1.4	Resumen de algunos extractos utilizados en la obtención de nanopartículas de plata.	38
Tabla 1.5	Zona de inhibición por diferentes bacterias patógenas a diferentes concentraciones, utilizando nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de planta. Tabla extraída y acoplada de la referencia [32]	39
Tabla 1.6	Nanopartículas de plata empleando diferentes agentes reductores, y la concentración mínima inhibitoria para diferentes agentes bacterianos.	39
Tabla 1.7	Bacterias patógenas más comunes bajo el efecto de nanopartículas de plata con diferentes características, formas y tamaños, las cuales muestran diferentes valores en el CMI.	40
Tabla 1.8	Compañías dedicadas a la comercialización de instrumentos basados en biosensores. Tabla extraída de la referencia [43]	45
Tabla 3.1	Regiones del espectro infrarrojo. Tabla extraída de la referencia [1]	86
Tabla 3.2	Fuentes láser más comunes en espectroscopia. Tabla extraída de la referencia [1].	96
Tabla 3.3	Descripción general de cada uno de los nombres, así como el fundamento y aplicación de cada una de las diferentes interacciones electrón-muestra.	101

Tabla 4.1	Datos obtenidos a partir del análisis de los patrones de difracción de rayos X de las muestras S-5mM y S-0.1M: θ_B es el ángulo de Bragg asociado a los picos (hkl), β es el ancho del pico (hkl), d_{hkl} es la distancia interplanar asociada a los planos {hkl}, L_{hkl} es el tamaño de cristal en la dirección [hkl].	127
Tabla 4.2	Valores asociados a los picos de absorbancia obtenidos mediante espectroscopía infrarroja para el extracto de chía utilizado en la síntesis.	127
Tabla 4.3	Resultados obtenidos por los autores Hermoso - Díaz , asociados a los picos de Transmitancia.	139
Tabla 4.4	Estructura química y actividades de los dos compuestos principales de <i>Salvia hispanica</i> .	139
Tabla 4.5	Compuestos fenólicos identificados en semillas de chía y aceite (<i>Salvia hispánica L.</i>) analizados por EASI-MS. ^[1]	140
Tabla 4.6	Compuestos, estructura química y actividades en el cuerpo humano para algunos compuestos fenólicos para <i>Salvia hispanica</i> . Tabla tomada y acoplada de la referencia [12].	141
Tabla 4.7	Valores asociados a los picos de absorbancia obtenidos mediante espectroscopía infrarroja para las muestras basadas en plata mediante extractos de chía.	142

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstroms
Ag	Plata
Au	Oro
AgNO₃	Nitrato de plata
ATP	Adenosín trifosfato
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D	Distancia interplanar
d.C.	Después de Cristo
d.	Diferencia de camino óptico
δ	
λ	Longitud de onda
μl	Microlitro
μg	Microgramo
ml	Mililitro
Nm	Nanómetros
Ppm	Partes por millón
Ref.	Referencia
$\sigma_{\text{abs}}^{\text{el}}$	Sección eficaz de absorción
$\sigma_{\text{dis}}^{\text{abs}}$	Sección eficaz de dispersión
$\sigma_{\text{ext}}^{\text{dis}}$	Sección eficaz de extinción
SERS	Dispersión Raman enaltecida por Superficies (Siglas en inglés).

θ	Ángulo de difracción
V	Potencial eléctrico / Voltios
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ALA	Ácido alfa-linolénico
ATP	Trifosfato de adenosina
CD	Disco compacto
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d.C.	Después de Cristo
DRX	Difracción de rayos X
DVD	Disco versátil digital
EDEX	Espectrometría de dispersión de energía de rayos X
EDR	Ensayos de difusión radial
etc.	Etcétera
ME	Microscopios electrónicos
MET	Microscopía electrónica de transmisión
NASA	Administración nacional de aeronáutica y del espacio de Estados Unidos

de América

ONCN Oficina nacional de coordinación de la nanotecnología

Ppm Partes por millón

P.S. Plasmones superficiales

RX Rayos X

ROS Especies reactivas de oxígeno

RPSL Resonancia del plasmón superficial localizado

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	23
1.1 Propiedades fisicoquímicas de la plata	24
1.2 Aplicaciones de la plata	25
1.3 Plata en forma nanométrica	26
1.4 Uso de nanoestructuras basadas en plata como agentes antimicrobianos	31
1.5 Métodos convencionales para la obtención de nanopartículas de plata	34
1.6 Rutas sostenibles para la obtención de nanoestructuras de plata con productos naturales	37
1.7 Fenómenos físicos encontrados en las nanopartículas de plata	41
1.7.1 Efecto de confinamiento en la resonancia de plasmones superficiales	41
1.7.2 Sensores	44
1.7.3 Dispersión Raman Enaltecida por Superficie (SERS)	46
1.8 Motivación, objetivos e hipótesis del trabajo	48
1.9 Contribuciones de la investigación presente	49
Referencias del capítulo 1	50

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	54
2.1 Resonancia de plasmones superficiales: Teoría de Mie	55
Referencias del capítulo 2	62
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	63
3.1 Introducción	63
3.2 Difracción de rayos X	65
3.3 Espectroscopía ultravioleta-visible	76
3.4 Espectroscopía infrarroja	84
3.5 Espectroscopía Raman	89
3.6 Microscopía electrónica de transmisión	97
3.7 Ensayos biológicos	106
Referencias del capítulo 3	107
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	108
4.1 Síntesis, caracterización y actividad bactericida mejorada de nanopartículas de plata ultrafinas embebidas en matrices nanoscópicas de ácido ascórbico (vitamina C)	109
4.1.1 Resumen	109

4.1.2 Método de síntesis empleado	109
4.1.3 Estudios morfológicos y microestructurales	110
4.1.4 Propiedades ópticas	115
4.1.5 Espectroscopia infrarroja	118
4.1.6 Ensayos biológicos	119
4.2 Síntesis, caracterización y actividad bactericida de nanopartículas de plata sintetizadas usando fitoquímicos de semillas de chía como agente reductor y estabilizante	122
4.2.1 Introducción	122
4.2.2 Método de síntesis empleado	124
4.2.3 Caracterización de la microestructura, tamaño y morfología de las nanopartículas sintetizadas con metabolitos de chía	124
Referencias del capítulo 4	146
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	148

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA PLATA

La plata es un metal noble que pertenece al grupo de metales de transición. Su símbolo es *Ag*, el cual proviene de la abreviación de *Argentum* que significa en latín blanco y brillante^[1]. Presenta la mayor conductividad eléctrica (63×10^6 S/m) y el mayor índice de reflexión en el espectro visible (con un factor de reflexión de la luz blanca de 92-97 %) a pesar de reflejar mal la radiación ultravioleta. Se disuelve en ácidos oxidantes y puede presentar los estados de oxidación +1, +2 y +3 siendo el más común el estado de oxidación +1; sin embargo, el ácido nítrico es el que disuelve la plata con mayor facilidad, dando lugar al nitrato de plata (AgNO_3).

Sus aplicaciones son muy diversas, y su uso se remonta hasta la antigüedad, el cual está documentado desde el año 3,500 antes de Cristo (A.C), destacando su empleo en la joyería, el arte decorativo, acuñamiento de monedas, la fotografía, aplicaciones eléctricas, fabricación de instrumentos y como potente agente antimicrobiano. En la época medieval, entre los siglos X y XII, los óxidos de plata obtenidos de minas fueron utilizados como aditivos en el proceso de fabricación de vidrios debido a que proporcionan diferentes tonalidades de amarillo al producto^[1]. Estos vitrales, fueron utilizados sobre todo en el ámbito religioso (ver figura 1.1).



Figura 1.1: Vitrales de la catedral de Notre Dame (Paris), con colores llamativos proporcionados por la presencia de nanopartículas.

Además, este metal ya era utilizado como un conservador del agua potable en las civilizaciones antiguas (1,000 a.C). De igual forma, las sales de plata se han empleado desde hace siglos en el tratamiento de heridas y quemaduras^[2]. La tabla 1.1 resume las propiedades de este metal en bulto.

Tabla 1.1: Propiedades generales de la plata en bulto.

PROPIEDADES DE LA PLATA EN BULTO			
Símbolo	Ag	Radio atómico	165 pm
Numero atómico	47	Energía de ionización	731 kJ/mol
Serie química	Metales de transición	Estado ordinario	Sólido
Grupo	11	Densidad	10,490 kg/m ³
Periodo	5	Punto de fusión	961.78° C
Bloque	D	Punto de ebullición	2435 K (2162 °C)
Masa atómica	107 8683 u	Estructura cristalina	Cubico centrado en las caras
Configuración electrónica	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ¹	Calor específico	232 J/kg °K
Electrones por nivel	2, 8, 18, 18, 1	Conductividad eléctrica	63 × 10 ⁶ S/m
Radio medio	16 pm	Conductividad térmica	429 W/(K m)
Electronegatividad	1.93 Pauling	Velocidad del sonido	2600 m/s a 293,15 K (20 °C)

1.2 APLICACIONES DE LA PLATA

Como ya mencionamos en la sección anterior, este metal ha tenido diversas aplicaciones a lo largo de la historia, y se cree que es el tercer metal descubierto por el hombre. Entre sus diferentes usos, destacan la base económica, siendo la prueba de esto la moneda del imperio griego en el año 610 a.C.^[1]

En la actualidad este metal tiene diferentes aplicaciones, como lo son la joyería, la fotografía, la explotación de fuentes de energía alternativa, la industria automotriz, plantas purificadoras de agua, cristales, fabricación de baterías, electrónica, sin dejar atrás las diversas aplicaciones médicas^[3].

En el desarrollo de fuentes de energía alternativa, la plata es utilizada en forma de pasta en un 90% de las células fotovoltaicas, un segundo método utiliza a este metal como un elemento para reflejar y concentrar energía solar sobre colectores con sales, que son finalmente utilizadas para ejecutar los generadores^[3].

En el sector automotriz se utilizan miles de toneladas de plata, las cuales son empleadas en los interruptores eléctricos, ya sea de encendido del motor,

ventanas eléctricas, e incluso en el parabrisas trasero, el cual está elaborado de líneas de plata cerámica que generan el calor suficiente para remover la escarcha. Dentro del motor, la plata es empleada como cojinetes en las piezas debido a su alta resistencia al calor, lo que le permite un funcionamiento continuo, además de aumentar el rendimiento y longevidad del motor^[3].

En la purificación de agua, la plata actúa como inhibidor del crecimiento de bacterias y algas, evitando su acumulación en los filtros^[3].

Por su parte, las baterías elaboradas con óxido de zinc y plata tienen el doble de capacidad comparada con las baterías basadas en plomo - ácido, siendo su principal ventaja la alta resistencia a temperaturas elevadas^[3].

Dentro de la electrónica, la plata se utiliza en la elaboración de circuitos impresos, celulares, computadoras, pantallas, hornos de microondas, teclados para ordenador, CD y DVD, entre otros. Todo lo anterior es debido a su alta resistencia que le confiere una duración de millones de ciclos de encendido y apagado^[3].

Estas son algunas de las diversas aplicaciones de este metal en bruto, que en gran parte son debido a su conducción eléctrica y térmica, y sobre todo a los precios accesibles del mismo, lo cual ha hecho que las empresas tengan a este como su primer objetivo.

1.3 PLATA EN FORMA NANOMÉTRICA

La administración nacional de aeronáutica y del espacio (NASA) de estados unidos, define a la nanotecnología como "la creación de materiales funcionales, componentes y sistemas mediante el control de la materia en la nanoescala, y la explotación de fenómenos novedosos y nuevas propiedades en esa escala".^[4]

Por su parte, la oficina nacional de coordinación de la nanotecnología (ONCN) de estados unidos tiene dos definiciones básicas, la primera es para el término "nanociencia" el cual se define como aquello que "involucra la investigación y descubrimiento de nuevas características y propiedades de

materiales en la nanoescala"; y la segunda es para el término "nanotecnología", el cual se define como "la manera en que los descubrimientos en la nanoescala son puestos a trabajar".^[4]

Actualmente la nanociencia y la nanotecnología se han ido consolidando como campos de conocimiento fundamentales y aplicados, al grado de implicar tecnologías presentes en diferentes productos comerciales, como lo son los cosméticos, pinturas, electrónica, etc.^[5]

Al comparar las propiedades de estos materiales en su tamaño en bulto con sus análogos en forma nanométrica, se pueden observar grandes diferencias, mismas que han sido reconocidas en numerosas áreas tecnológicas y científicas, y que a su vez han aprovechado en su beneficio. Una de ellas es la nanomedicina, la cual aplica estas nuevas propiedades para hacer posible diagnósticos en etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad y tratamientos de enfermedades como la esclerosis múltiple, aterosclerosis y cáncer^[5]. Al disminuir el tamaño de las partículas, su relación superficie/volumen aumenta, permitiendo que esta tenga mayor actividad, motivo por el cual presentan una mayor reactividad química en comparación con el mismo material en bulto.^[4,5,6] Sin embargo, el tamaño no es el único factor que altera sus propiedades ya que la forma, el efecto de la carga en la superficie, la composición, los recubrimientos y la rugosidad superficial son también determinantes. La tabla 1.2 resume los efectos tóxicos de las nanopartículas según su morfología y composición.^[5]

Tabla 1.2: Toxicidad de las nanopartículas según su forma y composición. Tabla extraída y acoplada de la referencia [5]

FORMA DE LA PARTÍCULA	EJEMPLO DE PARTÍCULA	MECANISMO DE TOXICIDAD	RESPUESTA FISIOLÓGICA
 Esférica	Oxido de hierro, oro	Ruptura de la membrana celular e internalización de las nanopartículas. En comparación con otras morfologías, producen la mayor captación celular con menor perturbación de la membrana.	Disfunción en la división celular y perturbación del transporte de macromoléculas a través de la célula; interferencia mecánica con el huso mitótico y DNA.
 Fibras homogéneas	TiO ₂ , oro, Sílice mesoporosa	Internalización y ruptura de la membrana. Severa influencia sobre la iniciación de la fagocitosis. Bloqueo de los canales de transporte. En comparación con otras morfologías, producen la mayor fuerza de distorsión de la membrana celular. Las relaciones de aspecto más pequeñas conducen a la internalización más rápida y menor ruptura de la membrana celular	Inflamación crónica debido a la fagocitosis frustrada, eventos mutagénicos, la formación de mesotelioma
 Formas asimétricas	Oro	Dependiendo del radio promedio de curvatura. Puede producirse la ruptura de la membrana y afectar el transporte de macromoléculas en la membrana.	Toxicidad debida a la inflamación crónica o alteración de la fagocitosis
 Aglomerados de partículas homogéneas	Níquel, TiO ₂	La agregación o aglomeración de nanopartículas cambia el tamaño efectivo de partículas aumentando así su detección por los macrófagos.	La agregación cambia el tiempo de retención de las partículas; estos cambios en el tamaño pueden aumentar o disminuir la toxicidad
 Aglomerados de partículas heterogéneas	ZnO, óxido de hierro.	La internalización y la ruptura de la membrana celular pueden depender de la prevalencia de la alta relación de aspecto de las partículas.	Efecto similar a la combinación de agregados de partículas y partículas fibrosas
 Núcleo-Coraza	Puntos cuánticos	Similar al de nanopartículas esféricas	Similar al de nanopartículas esféricas

La plata en forma de nanopartículas metálicas ha sido utilizada desde la antigüedad, en particular como colorante en la industria cerámica y vidriera, y se cree haber comenzado este uso con el inicio de la fabricación del vidrio en Egipto y Mesopotamia en los siglos XIII y XIV a.C.. El ejemplo más famoso es una copa de vidrio romana llamada copa de Licurgo (figura 1.2), que data del siglo IV d.C. y que actualmente se encuentra expuesta en el museo Británico de Londres. Un microanálisis ha permitido detectar la presencia de trazas de oro y plata alrededor de 40 ppm y 300 ppm respectivamente. Otro estudio realizado por microscopía electrónica de transmisión, reveló la presencia de nanopartículas de tamaños entre 50 y 100 nm, y un estudio por Rayos X determinó una composición de oro y plata con una proporción 7:3 con un contenido del 10% de cobre.^[2,7,8]



Figura 1.2: Copa de Licurgo, con iluminación reflejada (izquierda) y con iluminación transmitida (derecha). Figura extraída de la referencia [7].

Otro ejemplo no tan conocido de la aplicación de nanopartículas es el florero “Mille Fleurs” (figura 1.3) expuesto en el museo Guimet en París. No obstante, estos ejemplos no son la única evidencia de la aplicación de

nanopartículas, ya que los científicos han encontrado diversas piezas antiguas del siglo XVII que se cree también las tienen, como es el caso del sable, el cual presenta propiedades mecánicas y un borde de corte excepcional, para el cual los análisis han revelado la presencia de nanotubos de carbono. Incluso estas propiedades no son únicamente observadas en objetos antiguos del viejo continente, sino también en el nuestro, ya que el característico color azul de la pintura maya también era obtenido mediante la presencia de nanopartículas en las pinturas.^[7]



Figura 1.3: Un ejemplo de porcelana de la "Familia Rosa" expuesta en el Museo Guimet de París. Figura extraída de la referencia [7].

Cabe mencionar que la plata como metal, ha sido utilizada durante unos 7,000 años en monedas y cubiertos, además de otros utensilios de uso cotidiano. Por esta razón J.W. Alexander apuntó que la "sangre azul" de la nobleza era, posiblemente, debida a depósitos de plata de color gris azulado sobre la piel, esto debido al frecuente uso de cubiertos de plata.^[9]

1.4 USO DE NANOESTRUCTURAS BASADAS EN PLATA COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

El creciente número de bacterias resistentes a los antibióticos más comunes ha generado un problema de salud pública cada vez más preocupante que ha motivado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, presentándose la plata, ya sea en forma de iones o de nanopartículas, como una de las alternativas más prometedoras.^[10]

Las propiedades terapéuticas de las nanopartículas coloidales de plata se conocen desde al menos 120 años; en la primera mitad del siglo 20, era usual su consumo oral con fines terapéuticos.^[9] En su venta comercial como agentes medicinales, estos coloides fueron denominados con diferentes nombres, entre los que destacan el *Collargol*, *Argyrol* y *Protargol*, que fueron utilizados en la primera mitad del siglo XX, y durante un lapso aproximado de 50 años su uso fue generalizado, ya que eran empleados en la terapia de enfermedades como la sífilis y diversas infecciones bacterianas, así como quemaduras^[2,10].

Aunque existen otros registros que muestran que la nanoplata ha sido utilizada durante más de cien años, el registro más antiguo realizado por los Estados Unidos, bajo la Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas fue para el *Algaedyn* en el año de 1954, considerándose como el primer producto comercial de plata biocida.^[2]

Por lo anterior, y debido al deseo de alejarse del uso de los agentes antibióticos empleados ampliamente en la actualidad, la plata ha sido muy considerada actualmente, y la organización mundial de la salud la ha catalogado dentro del listado de medicamentos esenciales^[2,11].

Es bien conocido que los iones de plata y compuestos son altamente tóxicos para los microorganismos.^[12] A pesar de que los mecanismos de esta actividad bactericida aún son tema en discusión,^[12,13] se sabe que puede ser efectiva tanto en bacterias Gram Positivo como Gram Negativo, tanto bacterias aeróbicas como anaeróbicas^[13].

Existen varios mecanismos de acción bactericida propuestos para la plata, destacando tres mecanismos principales^[13]:

- 1) Liberación de iones de plata libre, seguidos de la interrupción de la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- 2) Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por presencia de iones de plata.
- 3) Daño directo a la membrana celular.

Para el caso de liberación de iones de plata Ag^+ , se cree que estos interactúan con los grupos tiol de las proteínas bacterianas, y esta interacción es dependiente del tamaño y forma de la nanopartícula.^[9,14] Estas observaciones e hipótesis son representadas en la figura 1.4.^[13]

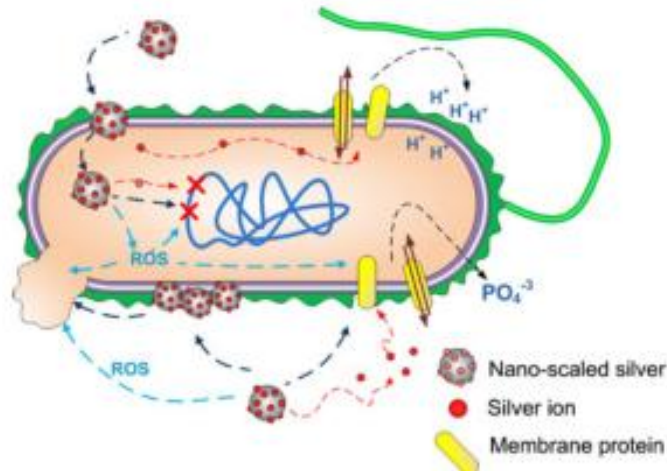


Figura 1.4: Diagrama que resume la interacción de la plata en la nano-escala con células bacterianas. (1) liberación de iones de plata y generación de ROS; (2) interacción con las proteínas de membrana que afecta su correcto funcionamiento; (3) acumulación en la membrana celular afectando su permeabilidad; y (4) dentro de la célula en la que puede generar ROS, liberar iones de plata, y afectar el ADN. La generación de ROS también puede afectar el ADN, membrana celular, y proteínas de la membrana, y la liberación de iones de plata es probable que afecten ADN y las proteínas de membrana. Figura extraída de la referencia [13].

Algunos reportes muestran nanopartículas unidas a la membrana celular (figura 1.5.a y 1.5.b) e incluso dentro de las bacterias (figura 1.6.a y 1.6.b).

Además, según lo establecido en la teoría, la plata tenderá a una mayor afinidad para reaccionar con fósforo y compuestos de azufre; por tal motivo, la membrana podría ser un sitio preferencial para la acumulación de las nanopartículas, y aquellas que se encuentren en el interior podrán interactuar con el ADN provocando la pérdida de su capacidad de replicación, pudiendo afectar también a procesos vitales de la bacteria como la cadena respiratoria y división celular, provocando finalmente su muerte.^[2,10, 12]

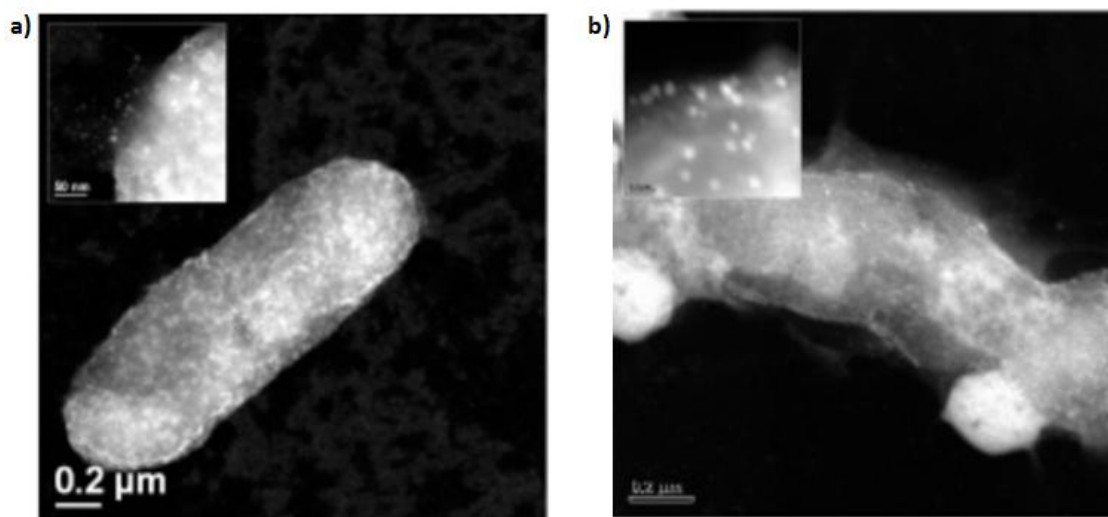


Figura 1.5: Nanopartículas de plata unidas a la membrana celular de *E. Coli* (a) y *S. typhus* (b). Figura extraída de la referencia [10].

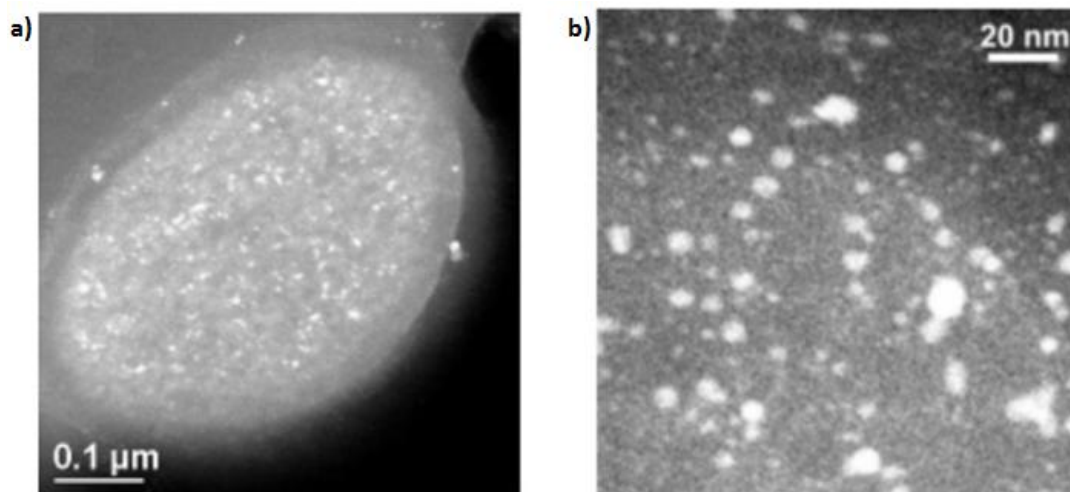


Figura 1.6: Imágenes de bacterias *E. Coli* en presencia de nanopartículas de plata tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión en campo oscuro: a) Se observa una presencia considerable de nanopartículas de plata en la membrana y el interior de una bacteria de *E. coli*. b) imagen de alta magnificación de una bacteria de *E. Coli* con nanopartículas de plata en su interior. Figura extraída de la referencia [10].

La interacción de Ag^+ fue probada con *Escherichia coli* demostrando que esta inhibe las enzimas de la cadena respiratoria, componentes citoplásmicos y ácidos nucleicos así como la permeabilidad de la membrana.^[15]

Debido a su tamaño extremadamente pequeño, además de su efecto biocida, las nanopartículas de plata pueden circular por el torrente sanguíneo, e incluso atravesar barreras inaccesibles para los medicamentos tradicionales como lo son la barrera hematoencefálica y la barrera sangre-testículo.^[12,16] Para este último caso, el depósito de nanopartículas de plata puede afectar negativamente a las células espermáticas.^[12] Dadas estas características, las nanopartículas de plata son consideradas en tratamientos de infecciones causadas por bacterias.

Las evidencias mostradas hasta el momento, apuntan a que la actividad bactericida es dependiente del tamaño, principalmente con nanopartículas de 1 a 10 nm,^[15] las cuales son capaces también de inactivar algas y virus como el de la hepatitis B y el VIH-1.^[13]

Otros estudios, muestran que las nanopartículas de plata tienen actividad antifúngica^[17], habiendo estudios en hongos patógenos de la piel. Por tal motivo se sugiere que la nanoplata es un compuesto potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas y fúngicas.^[17]

1.5 MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Actualmente existen métodos bien establecidos para obtener nanopartículas, estos son llamados métodos convencionales. Entre estos destacan el método de Turkevich, sistema de dos fases agua-sistemas orgánicos, reductores orgánicos, reducción de iones con borohidruro, etc.^[8]

1) Método de Turkevich: Inicialmente fue utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro hidrófilas por reducción de ácido cloroáurico con citrato de sodio en solución acuosa, proporcionando nanopartículas esféricas con un diámetro medio de 20 ± 1.5 nm. Más tarde, este método fue empleado

ampliamente para obtener nanopartículas de plata, reduciendo una sal de metal en condiciones desfavorables (la presencia de productos de oxidación como acetoadicarboxílico y ácido itacónico, los cuales pueden absorberse en la superficie de las nanopartículas afectando su crecimiento) para posteriormente hacer una reducción de iones metálicos con citrato. Una característica de este método es que los iones de citrato actúan como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo. Cuando este método es empleado en su forma original, las nanopartículas de plata formadas tienen un diámetro que varía de 60 a 200 nm. Sin embargo, la reducción de los iones de plata depende de la concentración de citrato y el momento de ebullición, de lo cual se observa que a bajas concentraciones de citrato se forman agregados de partículas con tamaños de 15 a 30 nm, mientras que a concentraciones intermedias se obtuvieron nanopartículas esféricas de 8 a 11 nm.^[8]

2) Sistema de dos fases agua/sistemas orgánicos: También conocido como método de Brust-Schiffrin. La idea principal de esta síntesis consiste en preparar nanopartículas a partir de reactivos separados en dos fases inmiscibles, utilizando tolueno como medio no polar y tetra-n-octilamonio bromuro como el agente de transferencia de fase. Este método permite preparar nanopartículas con diámetros promedio de 7 a 14 nm.^[8]

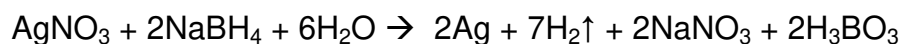
3)Agentes reductores orgánicos: La reacción de Tollens usada convencionalmente para la deposición química de recubrimientos de plata puede ser utilizada también en la formación de nanopartículas de plata. Una versión menos usual de este método implica el uso de extracto de aloe vera, el cual es responsable de la reducción amoniacal de $[Ag(NH_3)_2]OH$, haciendo posible la obtención de nanopartículas de plata esféricas de tamaños pequeños de 15.2 ± 4.2 nm.^[8]

4)Método de Borohidruro de sodio: La reducción de sales de plata con borohidruro de sodio es el método más utilizado en la síntesis de nanopartículas tanto en sistemas homogéneos como heterogéneos. Una de las primeras publicaciones en preparación de nanopartículas de plata por este método describe la solución de $AgNO_3$ a $0^\circ C$, obteniéndose nanopartículas con diámetros que van

de 1 a 10 nm. De manera general, la reducción de una solución acuosa de nitrato de plata sigue el siguiente esquema:



Si se utiliza el borohidruro de sodio como agente reductor, se presume el siguiente esquema de acción:



Dicha solución coloidal se utilizó para amplificar la señal Raman. De hecho, cabe mencionar que en el año de 1980 el interés científico de la plata ganó mayor auge a causa de sus posibles usos como soportes altamente dispersivos para mejorar la detección de moléculas orgánicas con espectroscopia Raman.^[8,18] La tabla 1.3 muestra un resumen de lo anterior.

Tabla 1.3: Resumen de los métodos convencionales para la obtención de nanopartículas de plata.

MÉTODO	CARACTERÍSTICA	TAMAÑO	FORMA	REFERENCIA
Método de Turkevich	Los iones de citrato actúan como agente reductor y estabilizador al mismo tiempo	En forma original del método de 60 a 200 nm.	-	8
		A bajas concentraciones de citrato se obtienen agregados de 15 -30 nm.	-	
		A concentraciones intermedias se obtienen nanopartículas de 8 - 11 nm.	Esférica	
Sistema de dos fases agua-sistemas orgánicos	Preparación a partir de reactivos separados especialmente en dos fases.	Diámetro promedio 7 - 14 nm.	-	8
Agentes reductores orgánicos (Método de Tollens)	Método convencional para la deposición química de recubrimientos de plata.	15.2 ± 4.2 nm.	Esférica	8
Método de Borohidruro	Es el mayormente utilizado.	Diámetro de 1 a 10 nm.	-	8, 18

1.6 RUTAS SOSTENIBLES PARA LA OBTENCIÓN DE NANOESTRUCTURAS DE PLATA CON PRODUCTOS NATURALES

Los principales métodos utilizados para la síntesis de nanopartículas son los métodos físicos y químicos, que usualmente son caros e implican un gran consumo de energía, asimismo, producen residuos peligrosos tanto para la salud humana como para el medio ambiente; por tal motivo se han buscado métodos alternativos que contribuyan a la disminución de estos. Entre algunos de estos métodos destacan los métodos biológicos, el empleo de extractos de planta e incluso plantas vivas.^[12,19]

Los métodos biológicos (biosíntesis) emplean microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, o bien plantas o partes de plantas. Entre los organismos bacterianos utilizados destacan la *Pseudomona stutzeri* AG259 (siendo esta la primera evidencia de bacterias que sintetizan nanopartículas), *Proteus mirabilis* PTCC 1710, *Psychrotolerans morganella*, entre otros.^[8,9,20,21,22,23] En el caso de hongos destacan *Humicola sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium*, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus terreus*, entre otros.^[8,22,24] Una de las razones por la cual se han utilizado a estos organismos en la síntesis de nanopartículas es debido a la secreción de proteínas, la cual se cree es la responsable de la reducción de iones de plata, a pesar de no estar completamente descifrado el mecanismo de formación de las partículas.^[12,15]

Por su parte, los extractos de plantas presentan una mayor ventaja debido a su disponibilidad, seguridad y sobre todo su carencia de toxicidad; algunos extractos de planta reductores son la hoja de magnolia, geranio, hoja de pino, entre muchas otras.^[12,13,25] La ventaja de estos métodos llamados "verdes" es la estabilidad de los coloides obtenidos a lo largo del tiempo, que se rige por la forma y tamaño de las partículas, así como del pH. Dicha estabilidad tiene mucha influencia sobre la toxicidad de las nanopartículas, y en el caso de existir agregados, la toxicidad tiende a disminuir; a pesar de todo ello varios autores discuten el uso de polisacáridos, polifenoles, agente de Tollens, reducción biológica y polioxometalato.^[13,19]

Este enfoque sustentable en la preparación de nanopartículas tiene ventajas importantes sobre la síntesis química, física y microbiana, debido a que no se necesitan procesos elaborados de cultivo y mantenimiento, productos químicos peligrosos, requerimiento de grandes cantidades de energía y purificación. Además de ser más estables y presentar una tasa de síntesis más rápida comparado con la síntesis en la que se utilizan microorganismos.^[25,26]

Por tal motivo, la síntesis de nanopartículas metálicas que utilizan extractos de plantas, son además de económicas, de gran valor para una producción a gran escala, donde los extractos de plantas actúan simultáneamente como agentes reductores y estabilizantes.^[26] La tabla 1.4 muestra una revisión general de algunos extractos empleados en estas síntesis.

Tabla 1.4: Resumen de algunos extractos utilizados en la obtención de nanopartículas de plata.

EXTRACTO DE PLANTA	TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA (nm)	MORFOLOGÍA	PICO DE ABSORCIÓN	REF
<i>Aloe Vera</i>	15.2 ± 4.2 nm	Predominantemente esféricas	410 nm	27
Pino Caqui <i>Platanus</i> <i>Magnolia</i>	15 - 500 nm	Esféricas	430 nm	19
<i>Terminolia chebula</i>	Diámetro aproximado 25 nm	_____	440 nm	20
Hemicelulosa de Bambú	8.3 - 14.8 nm	Esféricas "Nanocúbicas"	413-424 nm ~415 nm	28
Semilla <i>Jatropha curcas</i>	15 -50 nm	Esféricas	_____	22
Fruto de Papaya	Tamaño medio 15 nm	Estructura cúbica	_____	22
<i>Ficus benghalensis</i>	Rango de diámetro de 16 nm	Monodispersas y esféricas con estructura FCC	420 nm	29
<i>Azadirachta indica</i>	Inferiores a 20 nm	Forma casi esférica	417 a 444 nm	23
<i>Ocimum sanctum</i>	Diámetro de 14.31 ± 2.5 nm	Naturaleza cristalina	413 nm	30
<i>Ceratonia siliqua</i> (Algarrobó)	5 a 40 nm	Esféricas	420 nm	31

La tabla 1.5 resume algunos estudios de actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de plantas.^[32]

Tabla 1.5: Zona de inhibición por diferentes bacterias patógenas a diferentes concentraciones, utilizando nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de planta. Tabla extraída y acoplada de la referencia [32].

EXTRACTO DE PLANTA	ZONA DE INHIBICIÓN EN MM DE AGENTES BACTERIANOS PATÓGENOS											
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	50 μ l	75 μ l	100 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	12	19	25	15	17	20	20	25	30	15	17	19
<i>Syzygium cumini</i>	14	21	26	18	22	25	20	24	26	19	22	24
<i>Citrus sinensis</i>	17	21	27	13	15	18	13	15	17	12	14	16
<i>Solanum tricobatum</i>	17	26	30	7	10	12	8	10	12	14	16	18
<i>Centella asiatica.</i>	20	21	26	11	13	15	15	19	21	15	17	20

En la tabla 1.6 se muestran algunos resultados obtenidos con diferentes agentes reductores y su respectivas concentraciones mínimas inhibitorias encontradas frente a diversas bacterias.

Tabla 1.6: Nanopartículas de plata empleando diferentes agentes reductores, y la concentración mínima inhibitoria para diferentes agentes bacterianos.

PRECURSOR	TAMAÑO EN NM	MORFOLOGÍA	AGENTE MICROBIANO	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	REF
Glucosa	50 - 200 nm	Películas con partículas coloidales	<i>E. aureus</i> CCM 3953	6.75 μ g/mL	33
Galactosa	50 nm Tamaño medio	—	<i>E. aureus</i> CCM 3953	54 μ g/mL	33
			<i>S. epidermis</i> susceptible a Meticina	6.75 μ g/mL	
			<i>S. epidermis</i> resistente a Meticina	54 μ g/mL	
Maltosa	25 nm	—	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	13.5 μ g/mL	33
			<i>E. aureus</i> CCM 3953	6.75 μ g/mL	
			<i>E. coli</i> CCM 3954	3.38 μ g/mL	
			<i>S. Epidermis</i> Susceptible/ Resistente	1.69 μ g/mL	
Lactosa	35 nm tamaño medio	—	<i>S. aureus</i> CCM 3953	6.75 μ g/mL	33
			<i>S. aureus</i> MRSA	27 μ g/mL	

La tabla 1.7 resume algunos resultados encontrados en el estudio de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata frente a diferentes agentes microbianos.

Tabla 1.7: Bacterias patógenas más comunes bajo el efecto de nanopartículas de plata con diferentes características, formas y tamaños, las cuales muestran diferentes valores en el CMI.

TIPO DE AGENTE MICROBIANO	CARACTERÍSTICA DE LA PARTÍCULA	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	REF.
<i>E. coli</i> <i>V. cholerae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhus</i>	Nanopartículas de plata en forma de polvo dentro de una matriz de carbono. Las concentraciones utilizadas fueron de 0, 25, 50, 75 y 100 µg/ml. Las bacterias fueron cultivadas en solución agar Lunia - Bertina (B)	75 µg/ml para todas las bacterias. Siendo <i>V. cholerae</i> y <i>P. aeruginosa</i> más resistente que <i>E. coli</i> y <i>S. tyfus</i>	10
<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Partículas de 13.4 nm obtenidas por reducción de nitrato de plata con borohidruro de sodio como agente reductor.	< 6.6 nM para <i>E. coli</i> > 33 nm para <i>S. aureus</i>	13
<i>E. coli</i>	Nanopartículas de forma esférica con tamaño entre 5 y 40 nm	0.5 mg/L	25
<i>E. coli</i>	Nanocristales de plata cúbicos y hexagonales de 31 a 40 nm sintetizados con cortezas de <i>C. zeylanicum</i>	50 mg/L	26
<i>E. coli</i> no resistente <i>E. coli</i> resistente <i>S. aureus</i> <i>S. typhi</i>	Nanopartículas esféricas, poliédricas con rango de 10 a 15 nm, sintetizadas a partir de nitrato de plata	25 µg/ml para todos los organismos	34
<i>E. coli</i> MTCC1302	Nanopartículas monodispersas y esféricas con diámetro de 16 nm sintetizados con <i>Ficus benghalensis</i> en un tiempo aproximado de 5 min.	25 µg/ml	29
<i>E. Coli</i>	Nanopartículas esféricas formadas en 2 minutos de reacción con diámetros que oscilan entre 5 y 40 nm	* 0.5 µg/ml para nanopartículas de plata * 1.8 mg para nitrato de plata * 0.6 mg para antibiótico estándar	31

1.7 FENÓMENOS FÍSICOS ENCONTRADOS EN LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA

1.7.1 Efecto de confinamiento en la resonancia de plasmones superficiales

La interacción de la luz con superficies metálicas es todavía un fenómeno óptico poco conocido, donde bajo ciertas condiciones la luz puede viajar sobre estas superficies sin alejarse, involucrando excitaciones colectivas de los electrones libres del material. Este fenómeno fue descubierto por Rufus Ritchie en los años cincuenta del siglo pasado, y hoy en día se le conoce como plasmones superficiales (PS).^[35,36]

Iniciaremos con el concepto de plasmón o plasmones, los cuales son oscilaciones colectivas de carga libre dentro de un material conductor.^[37] Se trata de excitaciones longitudinales colectivas de un gas de electrones de conducción, o simplemente un gas fuertemente ionizado en estado de plasma, en cuyos portadores de carga libre actúa la radiación electromagnética produciendo un efecto vibratorio resonante.^[38]

Cuando se habla de PS, se hace referencia a las oscilaciones coherentes de los electrones existentes en la interfaz de dos materiales, principalmente metal - dieléctrico; o a las oscilaciones confinadas a la superficie de los materiales conductores^[36,37,39], ver figura 1.7. Sin importar el tipo de superficie metálica (esférica, cilíndrica plana o de cualquier otra forma) todas poseen PS que al estar confinados en la superficie se ven afectados por cualquier modificación que exista sobre el trayecto de los mismos.^[35]

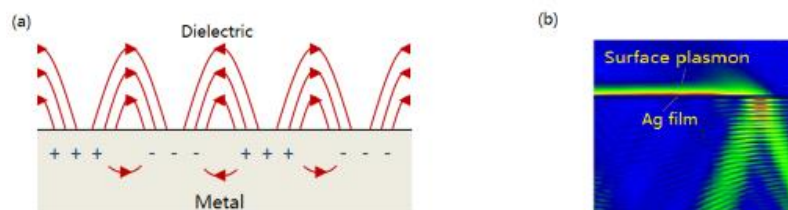


Figura 1.7: a) Representación de un plasmón superficial y b) simulación de plasmones superficiales SPs. Figura extraída de la referencia [36].

Por su parte, Gustav Mie en 1908 señaló que la interacción de la luz con nanopartículas metálicas resulta en una oscilación colectiva de los electrones libres del metal con respecto a la red cristalina de las nanopartículas en resonancia con el campo electromagnético de la luz; fenómeno que actualmente se conoce como resonancia del plasmón superficial localizado (RPSL)^[8,36,40,41]. Cuando la partícula tiene un tamaño mucho menor que la longitud de onda incidente se producen excitaciones dipolares que dependen de la forma y propiedades dieléctricas^[35,36,38,41]. Una representación de este fenómeno se muestra en las figuras 1.8 y 1.9.

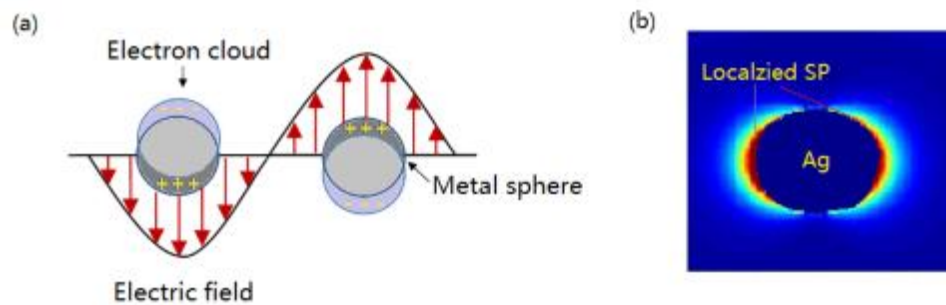


Figura 1.8: a) Interacción de la radiación electromagnética con partículas metálicas esféricas, donde la partícula es más pequeña que la longitud de onda de la radiación incidente. b) Simulación del campo eléctrico un plasmón superficial localizado. Figura extraída de la referencia [36].

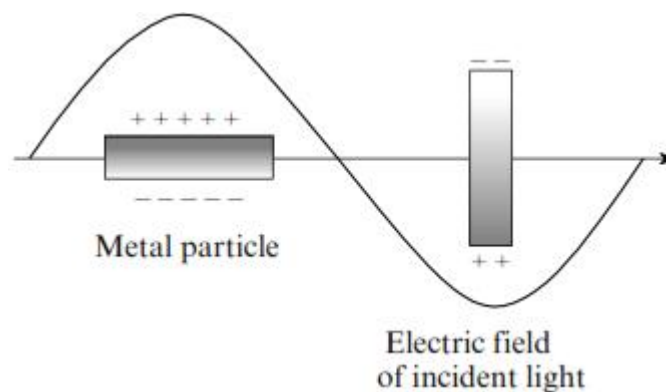


Figura 1.9: Interacción de la radiación electromagnética con partículas metálicas cilíndricas, donde la partícula es más pequeña que la longitud de onda de la radiación incidente. Figura extraída de la referencia [8].

Por su parte, los metales nobles en forma de nanopartícula, especialmente el oro (Au) y la plata (Ag), muestran propiedades ópticas únicas debido a la RPSL, siendo la plata la que muestra mayor absorbancia debido a este fenómeno.^[8,40] En el caso de la plata estas oscilaciones colectivas de los electrones en la banda de conducción son las responsables del color amarillo rojizo característico de estas nanopartículas al interactuar con la luz, misma que puede sufrir un desplazamiento hacia el rojo o el azul (rango visible) en función de los efectos de tamaño, que según la literatura revisada varía entre 375 y 420 nm ^[25,37,42]. La figura 1.10 muestra algunos cambios de coloración en nanopartículas de plata debido a su cambio de tamaño.

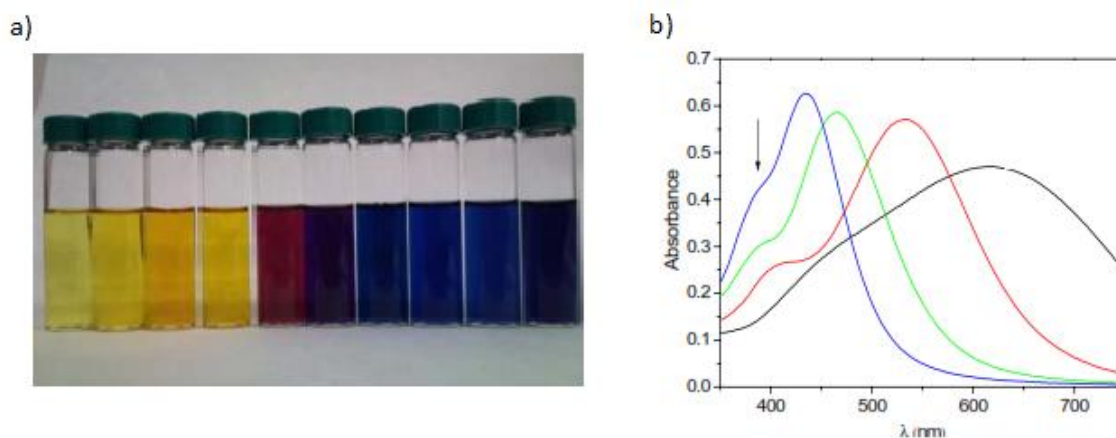


Figura 1.10: a) Serie de coloides de nanopartículas de plata mostrando diferentes tonalidades debidas al cambio de tamaño, el cual tiene una asociación directa con la RPSL. b) Algunas bandas de plasmón experimentales representativas. Figura extraída de la referencia [38].

Por su parte la RPSL dependerá del metal que se esté analizando, el cual tendrá un pico de absorción característico determinado por el tamaño, las propiedades dieléctricas del medio, la interacción y el acoplamiento entre las nanopartículas así como la forma de las mismas. Para el caso de la plata podemos decir que el tamaño de partícula puede ser predicho en base a estos picos de absorbancia cuyo máximo rondará los 400 nm para nanopartículas menores de 100 nm.^[40,42]

1.7.2 Sensores

Debido a que los PS tienen una alta sensibilidad a cualquier cambio en la interface entre la superficie metálica y el medio dieléctrico, estos son utilizados como un método óptico de detección del medio externo, el cual mide el índice de refracción de capas muy finas de material absorbido sobre un metal^[35,36,43].

La aplicación principal de los PS se encuentra en el campo de los sensores, comúnmente conocidos como sensores de RPSL, los cuales presentan una alta sensibilidad superficial, manera por la cual se pretende detectar moléculas de forma individual^[35,44]. Esta técnica se basa en que los PS pueden ser excitados por fotones incidentes en un ángulo bien definido, transformando a este fotón en un PS que dependerá del índice de refracción del absorbato, siendo la configuración Kretschman la más conocida para el caso de películas delgadas metálicas^[39,43]. La figura 1.11 muestra esquema de estos sensores^[45].

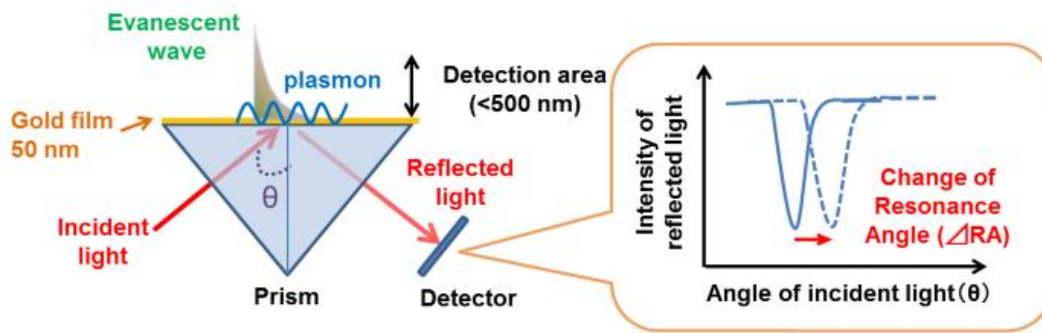


Figura 1.11: Descripción esquemática de un sensor PS. Figura extraída de la referencia [45].

Fue en la década de 1980 cuando se aplicaron técnicas de PS para el estudio de ondas evanescentes, así como para interacciones químicas y biológicas; sin embargo fue en el año de 1982 en el que se demostró la utilidad de la RPSL para desarrollar un biosensor óptico gracias a Leideberg y Nylander dando un impulso a la química de superficies y facilitando una plataforma común entre la química, la física y la biología. Posteriormente en las dos décadas siguientes esta técnica fue utilizada para la detección de analitos biológicos y químicos, así como para la vigilancia del medio ambiente y diagnóstico médico^[39,43,46].

Dentro de las aplicaciones que generan mayores expectativas se encuentran los circuitos ópticos plasmónicos, ya que presenta la ventaja de transportar señales ópticas, eléctricas o ambas,^[35] sin embargo los sensores moleculares son la principal aplicación sobre todo en el área de biosensores, los cuales se han convertido en una herramienta central de interacciones moleculares proporcionando una técnica de análisis rápida, específica y sensible^[36].

Estos biosensores son dispositivos capaces de capturar un analito específico para su análisis, con el fin de comprender su bio-composición, estructura y funcionamiento, convirtiendo una respuesta biológica en una señal eléctrica.^[36] Además estos biosensores de PS pueden ser utilizados para determinar: la cinemática de una reacción y constantes de afinidad, constantes de equilibrio en interacciones moleculares, estimación de concentraciones activas, estequiometría y mecanismos de interacción ligando receptor, caracterización de moléculas diana, productos farmacéuticos, así como detecciones a nivel femtomolar que permitan encontrar material genético en la saliva ^[43,47].

Por último, varias compañías fabrican actualmente una gran variedad de instrumentos basados en biosensores con PS. Algunos de ellos se enumeran en la tabla 1.8.

Tabla 1.8: Compañías dedicadas a la comercialización de instrumentos basados en biosensores. Tabla extraída de la referencia [43].

Company	Website
Biacore AB	http://www.biacore.com
Affinity Sensors	http://www.affinity-sensors.com
Windsor Scientific Limited	http://www.windsor-ltd.co.uk
BuoTul AG	http://www.biotul.com
Nippon Laser and Electronics Lab	http://www.nle-lab.co.jp
Texas Instruments	http://www.ti.com/spr
GWC Instruments	http://www.gwcinstruments.com
Jandratek GmbH	http://www.jandratek.de
IBIS	http://www.ibis-spr.nl
Applied Biosystems	http://www.appliedbiosystems.com

1.7.3 *Dispersión Raman Enaltecida por Superficie (SERS)*

La síntesis controlada de nanoestructuras ha abierto una infinidad de posibilidades para el diseño y construcción de futuros nanodispositivos, esto debido a sus propiedades que están fuertemente influenciadas por el método de preparación y condiciones de síntesis.^[48,49] Es por eso que la producción de nanopartículas con un control preciso en sus condiciones químicas, físicas y estructurales es de suma importancia para expandir sus aplicaciones en muchas áreas, como lo son la administración de fármacos controlada, tratamiento de imágenes, la optoelectrónica, catálisis, recolección de energía, detección química y biológica, etc.^[50,51]

Cuando la luz interactúa con la materia, esta puede ser dispersada de forma inelástica, dando como resultado una pérdida o ganancia de energía por parte de los fotones. Este fenómeno fue descubierto en 1928 y es conocido como efecto Raman, el cual ofrece una gran variedad de información sobre la estructura y la composición de la materia en base a sus vibraciones, que son como huellas digitales.^[52] A pesar de ello, este fenómeno estaba muy limitado debido a su escasa intensidad, y fue hasta la invención del láser cuando sufrió un importante avance debido a que se podía tener una luz monocromática y de una potencia mayor que las obtenidas con las diferentes técnicas de confinamiento.

En 1974, Martin Fleischmann y colaboradores reportaron una señal Raman inesperadamente alta de una monocapa de piridina absorbida sobre un electrodo rugoso de plata, dando pie al descubrimiento del fenómeno de la dispersión Raman enaltecida por superficies.^[53] No obstante, en 1977, Richard Van Duyne y David Jeanmaire, e independientemente, M. G. Albrecht y Alan Creighton confirmaron el aumento de la señal alrededor de un millón de veces en comparación con la señal a partir de moléculas de piridina en ausencia de plata, motivo por el cual se les dio el título de descubridores de tal efecto, mismo que hoy conocemos como *Dispersión Raman enaltecida por Superficies (SERS)*.^[52,54,55]

Aunque inicialmente esta técnica de mejora tuvo diferentes propuestas que trataban de responder a la incógnita del origen de este efecto, solo son

consideradas dos actualmente, el electromagnético y el químico. En el caso del químico, este se mantuvo debido a que la mejora electromagnética debería ser un amplificador no selectivo, pero las moléculas de CO y N₂ diferían en un factor de 200 en sus intensidades SERS, todo esto bajo las mismas condiciones experimentales.^[55,56]

Por ello podemos decir que SERS es una técnica fascinante debido a que puede amplificar la señal Raman en muchos órdenes de magnitud a partir de moléculas que han sido unidas a estructuras metálicas de tamaño nanométrico.^[56,57] A pesar de que el SERS se observó primeramente en plata, este efecto también es presentado por metales alcalinos así como aluminio, indio, cobre, oro entre otros.^[58] Sin embargo, de manera experimental se ha encontrado que la plata es la mejor plataforma para la detección SERS proporcionando mejoras para el análisis químico y permitiendo la detección de moléculas individuales.^[51]

Esta detección individual presenta un gran interés práctico y científico en muchos campos, como lo son la farmacología, ciencias del ambiente, química, biología y medicina.^[56] Esto debido a que la mejora en la señal Raman puede ser de $10^5 - 10^8$ ^[48,49] o incluso alcanzar valores de enaltecimiento de 10^{14} o 10^{15} en una sola nanopartícula de plata, ^[49,52] resolviendo así la estructura química de los materiales, incluso a nivel de una sola molécula. ^[52]

Por último podemos decir que el SERS tiene un gran potencial y que en sus últimos 40 años se ha consolidado fuertemente como un método espectroscópico muy poderoso capaz de explotar la interacción entre la luz, las moléculas y nanoestructuras metálicas para amplificar las señales Raman. ^[52]

1.8 MOTIVACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL TRABAJO

i) Motivación de la investigación presente

La investigación presente surge motivada por el interés creciente que suscitan las propiedades físicas y biológicas de las nanopartículas de plata, que como se ha resaltado anteriormente siguen siendo objeto de estudio, así como la necesidad de disponer de métodos de obtención de estos materiales que sean a la vez efectivos, económicamente competitivos y más amigables con el medio ambiente.

ii) Objetivo general

Estudiar rutas de síntesis de nanoestructuras de plata empleando medios de reacción biodegradables e inoocuos para el medio ambiente y la salud humana, determinando las propiedades morfológicas, microestructurales, plasmónicas y bactericidas del material resultante.

iii) Objetivos parciales

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- i) Sintetizar y estabilizar nanopartículas de plata coloidales empleando dos medios de reacción diferentes:
 - o Soluciones de ácido ascórbico (vitamina C) en agua.
 - o Extractos acuosos de chía.
- ii) Estudiar el efecto que la temperatura y altas concentraciones de agente reductor realizan sobre el tamaño, morfología, microestructura y los estados de agregación de las partículas de plata obtenidas
- iii) Estudiar los grupos funcionales de los fitoquímicos ligados a la superficie de las nanopartículas utilizando espectroscopía infrarroja y Raman
- iv) Estudiar las propiedades plasmónicas de las nanoestructuras obtenidas y compararlas con cálculos obtenidos a partir de la teoría de Mie.

- v) Estudiar la actividad antimicrobiana que las nanopartículas coloidales obtenidas tendrán frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas

iv) Hipótesis

El uso de soluciones acuosas de metabolitos, como la vitamina C, y de extractos de planta, en la preparación y estabilización de nanopartículas de plata metálica como medios de reacción, tiene como resultado nanoestructuras cuyas propiedades morfológicas y microestructurales son variables, y están correlacionadas con sus propiedades ópticas y actividades biológicas, de modo que se pueden ajustar a necesidades científicas y tecnológicas específicas.

1.9 CONTRIBUCIONES DE LA INVESTIGACIÓN PRESENTE

En esta investigación se presentan las siguientes contribuciones:

- Se ha demostrado que soluciones de vitamina C y de extractos de semillas de chía pueden jugar el papel de agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de nanopartículas de Ag.
- Se han obtenido por primera vez materiales nanocompuestos constituidos por nanocristales ultrafinos de plata embebidos por matrices nanoscópicas de vitamina C.
- Las grandes diferencias en el tamaño y estado de agregación de las partículas obtenidas con diferentes medios de reacción y concentraciones de los precursores conducen a respuestas ópticas modulables, explotables en fotónica.
- Se han estudiado las propiedades plasmónicas de las nanoestructuras de plata obtenidas y se han relacionado con el tamaño y estado de agregación de las partículas empleando la teoría de Mie.
- Todas las muestras obtenidas muestran una actividad antimicrobiana mejorada, probablemente debido a la sinergia entre su contenido de plata y los ligandos presentes en las nanopartículas (vitamina C o fitoquímicos de chía).

REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 1

- [1] Rubén, M. R. (2010). Historia de la plata: Su impacto en las antiguas civilizaciones y la sociedad moderna. *Volumen 11. Revista digital universitaria*, 11(7),1-9.
- [2] Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology* 45 (4), 1177-1183
- [3] www.silverinstitute.org
- [4] Záyago-Lau, E., & Foladori, G. (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. *Economía, sociedad y territorio*, 10(32), 143-178.
- [5] Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323-2343.
- [6] Šileikaitis, A., Prosyčevs, I., Puišo, J., Juraitis, A., & Guobienė, A. (2006). Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution. *Mater. Sci.-Medzg*, 12, 287-291.
- [7] Schaming, D., & Remita, H. (2015). Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry*, 17(3), 187-205.
- [8] Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y., & Lisichkin, G. V. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, 77(3), 233-257.
- [9] Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636-1653.
- [10] Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- [11] http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1 Pag 34
- [12] Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 32.
- [13] Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- [14] Martinez-Castanon, G. A., Nino-Martinez, N., Martinez-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(8), 1343-1348.
- [15] Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., ... & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527-534.

- [16] Ayala Núñez, N. V. (2010). *Nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- [17] Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol*, 18(8), 1482-1484.
- [18] Vejera, A. V., & Zimon, A. D. (2006). Synthesis and physicochemical properties of silver nanoparticles stabilized by acid gelatin. *Russian journal of applied chemistry*, 79(9), 1403-1406.
- [19] Song, J. Y., & Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(1), 79.
- [20] Edison, T. J. I., & Sethuraman, M. G. (2012). Instant green synthesis of silver nanoparticles using Terminalia chebula fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochemistry*, 47(9), 1351-1357.
- [21] Priyadarshini, S., Gopinath, V., Priyadharshini, N. M., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, Bacillus flexus and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232-237.
- [22] Hebbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, M. N., & Varma, R. S. (2013). Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(7), 703-712.
- [23] Tripathy, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., Prathna, T. C., & Mukherjee, A. (2010). Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(1), 237-246.
- [24] Syed, A., Saraswati, S., Kundu, G. C., & Ahmad, A. (2013). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus Humicola sp. and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 144-147.
- [25] Awwad, A. M., Salem, N. M., & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(1), 29.
- [26] Irvani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- [27] Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577-583.
- [28] Peng, H., Yang, A., & Xiong, J. (2013). Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium. *Carbohydrate polymers*, 91(1), 348-355.

- [29] Saxena, A., Tripathi, R. M., Zafar, F., & Singh, P. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. *Materials Letters*, 67(1), 91-94.
- [30] Singhal, G., Bhavesh, R., Kasariya, K., Sharma, A. R., & Singh, R. P. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(7), 2981-2988.
- [31] Awwad, A. M., Salem, N. M., & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(1), 29.
- [32] Logeswari, P., Silambarasan, S., & Abraham, J. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(3), 311-317.
- [33] Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., ... & Zbořil, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(33), 16248-16253.
- [34] Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22), 225103.
- [35] Vidal, F. J. G., & Moreno, L. M. (2008). Plasmones superficiales. *Investigación y ciencia*, 67.
- [36] Guo, X. (2012). Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. *Journal of biophotonics*, 5(7), 483-501.
- [37] Hou, W., & Cronin, S. B. (2013). A review of surface plasmon resonance enhanced photocatalysis. *Advanced Functional Materials*, 23(13), 1612-1619.
- [38] Cruz, D. A., & Rodríguez, M. C. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- [39] Chen, Y., & Ming, H. (2012). Review of surface plasmon resonance and localized surface plasmon resonance sensor. *Photonic Sensors*, 2(1), 37-49.
- [40] Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, 2(3), 107-118.
- [41] Jensen, T. R., Malinsky, M. D., Haynes, C. L., & Van Duyne, R. P. (2000). Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(45), 10549-10556.
- [42] Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), 255102.
- [43] Pattnaik, P. (2005). Surface plasmon resonance. *Applied biochemistry and biotechnology*, 126(2), 79-92.

- [44] Homola, J., Yee, S. S., & Gauglitz, G. (1999). Surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54(1-2), 3-15.
- [45] Yanase, Y., Hiragun, T., Ishii, K., Kawaguchi, T., Yanase, T., Kawai, M., ... & Hide, M. (2014). Surface plasmon resonance for cell-based clinical diagnosis. *Sensors*, 14(3), 4948-4959.
- [46] Singh, P. (2016). SPR biosensors: Historical perspectives and current challenges. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 229, 110-130.
- [47] Ermini, M. L., Mariani, S., Scarano, S., & Minunni, M. (2014). Bioanalytical approaches for the detection of single nucleotide polymorphisms by Surface Plasmon Resonance biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 28-37.
- [48] Andhariya, N., Pandey, O. P., & Chudasama, B. (2013). A growth kinetic study of ultrafine monodispersed silver nanoparticles. *RSC Advances*, 3(4), 1127-1136.
- [49] Tiwari, V. S., Oleg, T., Darbha, G. K., Hardy, W., Singh, J. P., & Ray, P. C. (2007). Non-resonance SERS effects of silver colloids with different shapes. *Chemical Physics Letters*, 446(1), 77-82.
- [50] Santhoshkumar, T., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C., ... & Kamaraj, C. (2011). Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbonucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors. *Parasitology research*, 108(3), 693-702.
- [51] Bastus, N. G., Merkoci, F., Piella, J., & Puentes, V. (2014). Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. *Chem. Mater*, 26(9), 2836-2846.
- [52] Kneipp, K. (2007). Surface-enhanced Raman scattering. *Physics Today*, 60(11), 40-46.
- [53] Fleischmann, M., Hendra, P. J., & McQuillan, A. J. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2), 163-166.
- [54] Kneipp, K., Moskovits, M. & Kneipp, H. (Editores) (2006). Surface-enhanced Raman scattering: Physics and Applications. *Springer*.
- [55] Campion, A., & Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27(4), 241-250.
- [56] Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1997). Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Physical review letters*, 78(9), 1667.
- [57] Rycenga, M., Camargo, P. H., Li, W., Moran, C. H., & Xia, Y. (2010). Understanding the SERS effects of single silver nanoparticles and their dimers, one at a time. *The journal of physical chemistry letters*, 1(4), 696-703.
- [58] Leopold, N., & Lendl, B. (2003). A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(24), 5723-5727.

CAPÍTULO 2

Marco teórico

2.1 RESONANCIA DE PLASMONES SUPERFICIALES: TEORÍA DE MIE

En 1908, Gustav Mie publicó su artículo "*Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen; von Gustav Mie*" (consideraciones sobre la óptica de los medios turbios, especialmente soluciones coloidales; por Gustav Mie) en el cual calculó los efectos de la dispersión de la luz por pequeñas partículas de oro partiendo de la teoría electromagnética clásica.^[1,2]

Para ello utilizó las ecuaciones de Maxwell resolviendo este sistema de ecuaciones diferenciales parciales para el problema de una partícula metálica envuelta en un medio dieléctrico.^[3] Con estos resultados se explicó el cambio de color de los coloides de oro con el diámetro de las partículas, y que posteriormente se interpretó en términos de resonancia de plasmones superficiales.^[1]

Para describir este problema físico, Gustav Mie partió de las ecuaciones de Maxwell:^[4]

$$\nabla \cdot \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = \rho_l(\mathbf{r}, t) \quad (2.1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = 0 \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} \quad (2.3)$$

$$\nabla \times \mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{J}_l(\mathbf{r}, t) + \frac{\partial \mathbf{D}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \quad (2.4)$$

donde ρ_l es la densidad de carga y \mathbf{J}_l la densidad de corriente asociada a los electrones libres o de conducción.^[5]

Dado que una onda arbitraria puede ser construida como una superposición de ondas planas, se considera una onda plana incidente, que debe ser armónica y satisfacer las ecuaciones de Maxwell (ecuaciones 2.1 a 2.4), para ello se toman las siguientes condiciones de frontera:^[3,5]

$$\hat{\mathbf{n}} \cdot [\mathbf{D}_2(\mathbf{r}, t) - \mathbf{D}_1(\mathbf{r}, t)]_{frontera} = \sigma_1 \quad (2.5)$$

$$\hat{\mathbf{n}} \cdot [\mathbf{H}_2(\mathbf{r}, t) - \mathbf{H}_1(\mathbf{r}, t)]_{frontera} = 0 \quad (2.6)$$

$$\hat{\mathbf{n}} \times [\mathbf{E}_2(\mathbf{r}, t) - \mathbf{E}_1(\mathbf{r}, t)]_{\text{frontera}} = 0 \quad (2.7)$$

$$\hat{\mathbf{n}} \times [\mathbf{H}_2(\mathbf{r}, t) - \mathbf{H}_1(\mathbf{r}, t)]_{\text{frontera}} = \mathbf{K}_1 \quad (2.8)$$

donde $\hat{\mathbf{n}}$ es el vector unitario normal a la superficie, σ_1 la densidad de carga y \mathbf{K}_1 la densidad de corriente, ambos asociados a la superficie frontera.

Se parte del hecho de que el campo electromagnético se encuentra en un medio homogéneo e isotrópico, por lo cual debe satisfacer las siguientes ecuaciones^[6,7]:

$$\nabla^2 \vec{\mathbf{E}} + k^2 \vec{\mathbf{E}} = \mathbf{0} \quad \nabla^2 \vec{\mathbf{H}} + k^2 \vec{\mathbf{H}} = \mathbf{0} \quad (2.9)$$

siempre y cuando la divergencia de ambos campos sea cero, es decir:

$$\nabla \cdot \vec{\mathbf{E}} = 0 \quad \nabla \cdot \vec{\mathbf{H}} = 0 \quad (2.10)$$

entonces la constante k tendrá la siguiente equivalencia

$$k^2 = \omega^2 \epsilon \mu \quad (2.11)$$

lo cual nos indica que $\vec{\mathbf{E}}$ y $\vec{\mathbf{H}}$ no son independientes, y su relación es por medio del rotacional de la forma siguiente:

$$\nabla \times \vec{\mathbf{E}} = i\omega\mu\vec{\mathbf{H}} \quad \nabla \times \vec{\mathbf{H}} = -i\omega\epsilon\vec{\mathbf{E}} \quad (2.12)$$

Con el objetivo de encontrar una solución a las ecuaciones 2.9 se proponen dos vectores auxiliares $\vec{\mathbf{H}}_0$ y $\vec{\mathbf{E}}_0$, los cuales tendrán divergencia nula y que además estarán vinculados por medio del rotacional. Para esto, definimos $\vec{\mathbf{H}}_0$ como sigue:

$$\vec{\mathbf{H}}_0 = \nabla \times (\vec{\mathbf{c}}\psi) \quad (2.13)$$

Donde $\vec{\mathbf{c}}$ es un vector piloto. De las propiedades vectoriales y sustituyendo en la ecuación 2.9 tenemos^[7]:

$$\nabla^2 \vec{\mathbf{H}}_0 + k^2 \vec{\mathbf{H}}_0 = \nabla \times [\nabla^2 \psi + k^2 \psi] \quad (2.14)$$

por tanto, $\vec{\mathbf{H}}_0$ debe satisfacer la ecuación de onda vectorial, y ψ debe ser una solución de la ecuación de onda escalar, es decir:

$$\nabla^2 \psi + k^2 \psi = 0 \quad (2.15)$$

Ahora introducimos al vector \vec{A} , que estará vinculado con el vector \vec{H} por medio del rotacional del modo siguiente:

$$k\vec{A} = \nabla \times \vec{H} \quad \text{ó} \quad \vec{A} = \frac{\nabla \times \vec{H}}{k} \quad (2.16)$$

el cual además de satisfacer la ecuación de onda tendrá divergencia nula

$$\nabla^2 \vec{A} + k^2 \vec{A} = 0 \quad (2.17)$$

de esta manera, hemos definido nuestros nuevos vectores \vec{H} y \vec{A} para que cumplan con las propiedades del campo electromagnético, reduciendo los cálculos a encontrar soluciones a la ecuación de onda ψ en una forma escalar, y esta función escalar será generadora de los vectores armónicos \vec{H} y \vec{A} .^[6,7]

Si consideramos simetría esférica podemos reemplazar al vector piloto \vec{A} por el vector de posición \vec{r} , es decir $\vec{A} = \vec{r}$. Por tanto, \vec{H} será tangencial al radio de la esfera $r = a$ (figura 2.1^[8]), esto debido a que

$$\vec{r} \cdot \vec{H} = 0 \quad (2.18)$$

ψ debe ser solución de la ecuación de onda escalar; en coordenadas esféricas tenemos:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial \psi}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial \psi}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \phi^2} + k^2 \psi = 0 \quad (2.19)$$

Resolvemos esta ecuación por medio del método de separación de variables escribiendo ψ como una solución de la forma:

$$\psi(r, \theta, \phi) = R(r)\Theta(\theta)\Phi(\phi) \quad (2.20)$$

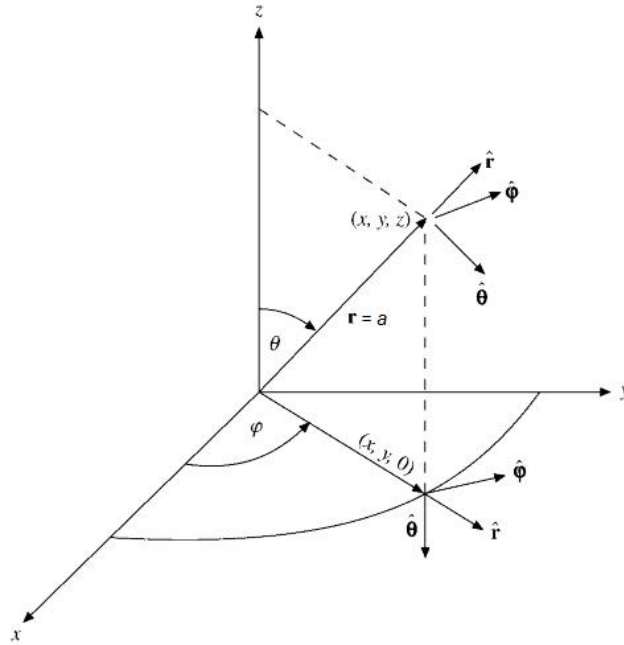


Figura 2.1: Coordenadas polares esféricas con centro en una partícula de radio $r = a$. Figura extraída de la referencia [8].

Esta separación de variables nos lleva a las siguientes ecuaciones lineales independientes:

$$\frac{d^2\Phi}{d\phi^2} + m^2\Phi = 0 \quad (2.21)$$

$$\frac{1}{\sin\theta} \frac{d}{d\theta} \left(\sin\theta \frac{d\Theta}{d\theta} \right) + \left[n(n+1) - \frac{m^2}{\sin^2\theta} \right] \Theta = 0 \quad (2.22)$$

$$\frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dR}{dr} \right) + [k^2 r^2 - n(n+1)] R = 0 \quad (2.23)$$

siendo m y n constantes de separación determinadas por las condiciones de frontera que debe cumplir ψ .

La ecuación 2.21 tiene las siguientes soluciones para m :

$$\Phi_n \begin{cases} \Phi_{par} = \cos(m\phi) \\ \Phi_{impar} = \sin(m\phi) \end{cases} \quad (2.24)$$

Las soluciones de la ecuación 2.22 son los polinomios de Legendre de grado n y orden m , siendo $n = m, m + 1 \dots$ [8]

$$\int_{-1}^1 P_n^m(\beta) P_n^m(\beta) d\beta = \delta_{n'n} \frac{2}{2n+1} \frac{(n+m)!}{(n-m)!} \quad (2.25)$$

donde:

$$\beta = \cos(\theta)$$

$$\delta_{n'n} = \text{delta de Kronecker}$$

$$P_n = \text{Polinomios de Legendre}$$

Finalmente para la ecuación 2.23 tenemos que las soluciones son las funciones de Bessel J_ν y Y_ν de primera y segunda clase respectivamente, y de orden $\nu = n + \frac{1}{2}$, mismas que son linealmente independientes. Estas soluciones son:

$$j_n(\rho) = \sqrt{\frac{\pi}{2\rho}} J_{n+\frac{1}{2}}(\rho) \quad (2.26)$$

$$y_n(\rho) = \sqrt{\frac{\pi}{2\rho}} Y_{n+\frac{1}{2}}(\rho) \quad (2.27)$$

y que al ser tomadas como un complejo en su parte real e imaginaria, se obtienen las funciones Bessel esféricas, que son las llamadas funciones de Hankel esféricas.^[7]

$$h_n^{(1)} = j_n(\rho) + iy_n(\rho) \quad (2.28)$$

$$h_n^{(2)} = j_n(\rho) - iy_n(\rho) \quad (2.29)$$

Entonces, la función generadora escalar ψ puede representarse como una función par o impar de la siguiente forma:

$$\begin{cases} \psi_{par\ m\ n} = \cos(m\phi) P_l^m(\cos(\theta)) z_n(kr) \\ \psi_{impar\ m\ n} = \sin(m\phi) P_l^m(\cos(\theta)) z_n(kr) \end{cases} \quad (2.30)$$

Dando como resultado que nuestros armónicos esféricos \vec{Y}_{lm} y \vec{Z}_{lm} generados por estas funciones tomen la forma:^[6,7]

$$\begin{cases} \vec{Y}_{lm} = \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} \times \psi_{par\ m\ n} & \text{y} & \vec{Z}_{lm} = \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi}} \times \psi_{impar\ m\ n} \\ \vec{Y}_{lm} = \frac{\sqrt{2l+1}}{k} \times \psi_{par\ m\ n} & \text{y} & \vec{Z}_{lm} = \frac{\sqrt{2l+1}}{k} \times \psi_{impar\ m\ n} \end{cases} \quad (2.31)$$

Ahora, si consideramos una partícula esférica y hacemos incidir sobre esta una onda plana polarizada en la dirección x :^[7]:

$$\vec{E}_i = E_0 e^{ikr \cos\theta} \hat{e}_x \quad (2.32)$$

Podemos entonces obtener la solución expandiendo esta onda plana en armónicos esféricos para los campos \mathbf{E} y \mathbf{H} incidente (\vec{E}_i, \vec{H}_i) y dispersado (\vec{E}_s, \vec{H}_s) los cuales tomarían la forma:^[7]

$$\begin{cases} \vec{E}_i = E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (\vec{M}_{\text{impar } 1n} - i \vec{N}_{\text{par } 1n}) \\ \vec{H}_i = -\frac{k}{w\mu} E_0 \sum_{n=1}^{\infty} i^n \frac{2n+1}{n(n+1)} (\vec{M}_{\text{impar } 1n} - i \vec{N}_{\text{par } 1n}) \end{cases} \quad (2.33)$$

$$\begin{cases} \vec{E}_s = \sum_{n=1}^{\infty} E_n (ia_n \vec{L}_{\text{par } 1n} - b_n \vec{M}_{\text{impar } 1n}) \\ \vec{H}_s = \frac{k}{w\mu} \sum_{n=1}^{\infty} E_n (ib_n \vec{M}_{\text{impar } 1n} + a_n \vec{N}_{\text{par } 1n}) \end{cases} \quad (2.34)$$

donde a_n y b_n son los coeficientes de dispersión, los cuales se expresan como^[5]:

$$a_n = \frac{n\psi_n(mx)\psi'_n(x) - \psi_n(x)\psi'_n(mx)}{m\psi_n(mx)\xi'_n(x) - \xi_n(x)\psi'_n(x)} \quad (2.35)$$

$$b_n = \frac{\psi_n(mx)\psi'_n(x) - m\psi_n(x)\psi'_n(mx)}{\psi_n(mx)\xi'_n(x) - m\xi_n(x)\psi'_n(mx)} \quad (2.36)$$

siendo:

$$m = \frac{r_p}{n_n} \quad \text{y} \quad x = \frac{2\pi r_0}{\lambda}$$

De igual forma ψ_n y ξ_n son las funciones Ricatti-Bessel, que se definen como:

$$\psi_n(x) = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} J_{n+\frac{1}{2}}(x) \quad (2.37)$$

$$\xi_n(x) = \sqrt{\frac{\pi x}{2}} \left[J_{n+\frac{1}{2}}(x) + iY_{n+\frac{1}{2}}(x) \right] \quad (2.38)$$

Por último, las funciones primadas ψ'_n y ξ'_n se definen como:

$$\psi'_n(x) = \psi_{n-1}(x) - \frac{n}{x}\psi_n(x) \quad (2.39)$$

$$\xi'_n(x) = \xi_{n-1}(x) - \frac{n}{x}\xi_n(x) \quad (2.40)$$

Finalmente estas ecuaciones permiten estimar las secciones eficaces σ_{dis} , σ_{ext} y σ_{abs} , las cuales se obtienen por medio de las series: ^[5,9,10,11]

$$\sigma_{dis} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (2.41)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)Re(a_n + b_n) \quad (2.42)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{dis} \quad (2.43)$$

y que se encuentran dadas en función del material de la partícula, el diámetro de partícula, el medio y la longitud de onda de la radiación incidente.

REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 2

- [1] Hergert, W., & Wriedt, T. (Eds.). (2012). *The Mie Theory: basics and applications* (Vol. 169). Springer.
- [2] Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der physik*, 330(3), 377-445.
- [3] Bohren, C. F., & Huffman, D. R. (2008). *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons.
- [4] Jackson, J. D., & Fox, R. F. (1999). Classical electrodynamics. *American Journal of Physics*, 67(9), 841-842.
- [5] Criado, C. L., Rodríguez, D. C., Torres, R. A. R., Juárez, B. P. S., & Resénder, R. M. (2013). Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro.
- [6] Santillán, J. M. J. (2013). *Estudio de las propiedades ópticas de materiales nanoestructurados y aplicaciones* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- [7] Videla, F. (2011). *Desarrollo de técnicas de espectroscopía de scattering óptico y de resonancia plasmónica para la determinación de tamaño de micro y nanopartículas* (Doctoral dissertation, Facultad de Ingeniería).
- [8] Arfken, G. B., & Weber, H. J. (2005). *Mathematical methods for physicists international student edition*. Academic press.
- [9] Baffou, G. (2012). Mie theory for metal nanoparticles.
- [10] Tribelsky, M. I., & Luk'yanchuk, B. S. (2006). Anomalous light scattering by small particles. *Physical review letters*, 97(26), 263902.
- [11] Young, D., Garza, M., Cantú, M., & Perez, P. (2013). Factores de eficiencia definidos por dispersión de Mie ante partículas y factores ambientales. *Revista Mexicana de Física*, 59(1), 69-76.

CAPÍTULO 3

Técnicas de caracterización

3.1 INTRODUCCIÓN

La radiación electromagnética es una onda que no necesita medio alguno para transmitirse, lo cual le permite viajar en el vacío, algo que no sucede en otros fenómenos ondulatorios como el sonido, donde se necesita un medio.

Sin embargo, el modelo ondulatorio aplicado a la radiación electromagnética falla al explicar fenómenos asociados a procesos de absorción o emisión de energía radiante, para esto se acude a un modelo corpuscular donde esta radiación se ve como un flujo de partículas discretas llamadas fotones, cuya energía es proporcional a la frecuencia de radiación. Estos aspectos onda-corpúsculo de la radiación no son excluyentes, sino que son complementarios.^[1]

Un parámetro de interés para caracterizar su comportamiento ondulatorio es la longitud de onda λ , que multiplicada por la frecuencia en ciclos por segundo, proporciona la velocidad de propagación de la onda v_i .^[2]

$$v_i = \nu \lambda_i \quad (3.1)$$

Además, esta radiación, tiene asociada una energía definida por:^[2]

$$E = h \nu \quad (3.2)$$

Por otra parte, la longitud de onda y la frecuencia se ven relacionadas por la ecuación^[2]:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (3.3)$$

De las ecuaciones anteriores se deduce que para longitudes de onda más cortas se tienen energías más altas y viceversa.

Esta longitud de onda es utilizada para clasificar la radiación electromagnética, ya que el espectro abarca gran cantidad de ellas. La figura 3.1 muestra esta clasificación.^[1]

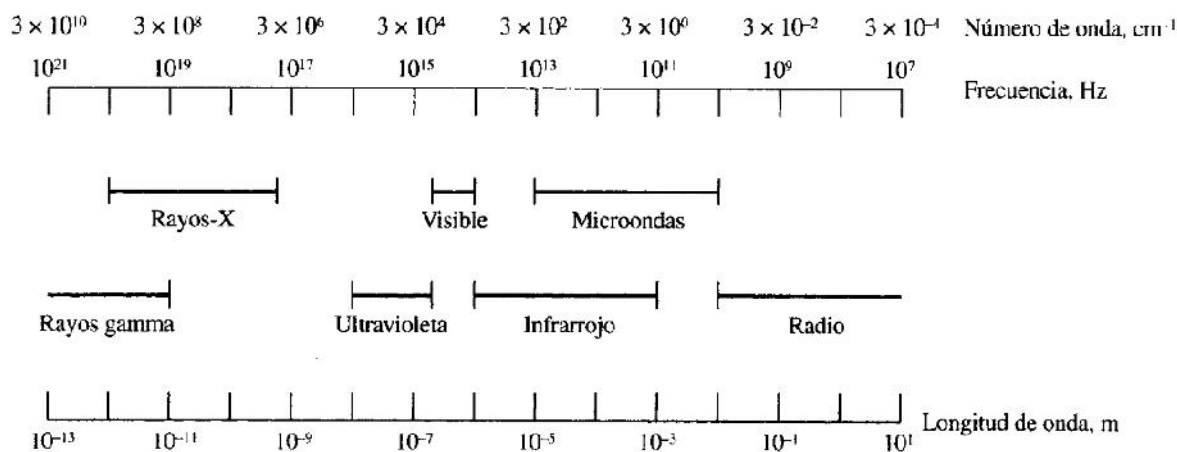


Figura 3.1: Regiones del espectro electromagnético, clasificados según su longitud de onda, frecuencia y número de onda. Figura extraída de la referencia [1]

Cabe mencionar que el número de onda, es muy utilizado en la espectroscopia infrarroja.

Esta radiación, al interactuar con la materia, es la causante de procesos como reflexión, dispersión, absorción, fluorescencia y fosforescencia (absorción y reemisión), entre otros.^[2]

Algunas de estas longitudes son utilizadas para obtener información de una muestra, entre ellas, las utilizadas en esta tesis fueron:

1. Difracción de Rayos X y sus técnicas
2. Ultravioleta visible
3. Infrarrojo

Esto dentro de las técnicas llamadas espectroscópicas, donde una luz "monocromática" interactúa con la muestra.

3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los rayos X (RX) fueron descubiertos por Wilhelm Roentgen en 1895, quien además describió algunas de sus propiedades según sus observaciones,^[3] no

obstante, varias de ellas no pudieron ser observadas en su momento debido a su pequeña longitud de onda, la cual se encuentra en el rango de los angstroms (Å).^[4] De este modo, Roentgen no realizó experimentos de interferencia y difracción debido al tamaño de la longitud de onda de los rayos X, que es del orden de los diámetros atómicos. Esta información fue utilizada posteriormente por el físico Max Von Laue en el año de 1912 al emplear el arreglo regular de los átomos de un cristal como una red de difracción 3D natural para los rayos X. Por este descubrimiento recibió el premio Nobel en 1914, habiendo demostrado el carácter ondulatorio de los rayos X al ser difractados por medio de cristales.^[3]

Los rayos X son radiación electromagnética de longitud de onda corta producido por el frenado de electrones de energía elevada o por transiciones electrónicas, y se obtienen de cuatro formas diferentes:^[1]

1. Por bombardeo de un blanco metálico (llamados rayos x primarios), como el mostrado en la figura 3.2
2. Utilizando una fuente radioactiva, la cual es conocida como radiación gamma.
3. Por exposición de una sustancia a un haz primario de RX, para generar un haz secundario de fluorescencia de RX (llamados rayos x secundarios).
4. A partir de una fuente sincrotrón

Estos rayos, pueden producir espectros continuos o discretos. A la radiación continua se le denomina radiación blanca o Bremsstrahlung que es radiación de frenado, por otra parte, la λ del rayo X, puede depender del potencial de aceleración V y ser independiente del blanco, siendo esta el resultado de las colisiones entre el haz de electrones y los átomos del material, de esta forma, en cada colisión, el electrón frena y se produce un fotón de energía de RX.

Por otra parte, existe una forma de obtener rayos X, llamados característicos, los cuales tienen una longitud de onda específica determinada por el material. En estos, un electrón primario "arranca" un electrón de alguna de las capas, dejando un hueco que puede ser llenado por un electrón de capas más externas, y justo cuando deja su orbital para llenar la otra capa se desprende un

fotón de rayos X, que tendrá una energía igual a la diferencia entre la energía que el electrón tenía en su órbita original y la órbita final. [1]

Como la energía de ligadura es distinta para cada elemento, a este tipo de radiación se le llama característica porque es característica del elemento blanco, de esta forma, la longitud de onda permite identificar el elemento, y la intensidad de emisión cuantifica la cantidad presente. [1]

Las figura 3.2 muestra la obtención de rayos X por bombardeo, mientras que la figura 3.3 muestran su difracción sobre un cristal. [4]

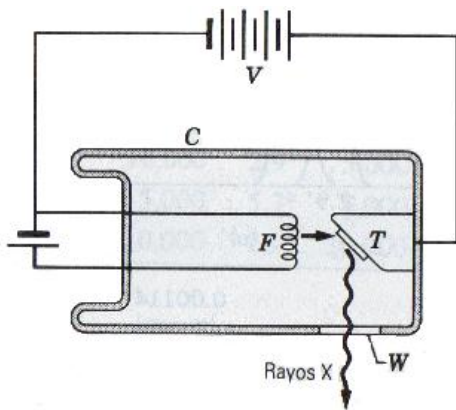


Figura 3.2: Generación de rayos X cuando los electrones de un filamento calentado, F, acelerados mediante una diferencia de potencial, V, chocan con un blanco metálico, T, dentro de una cámara evacuada, C. La ventana W es transparente a los rayos X. Figura extraída de la referencia [4].

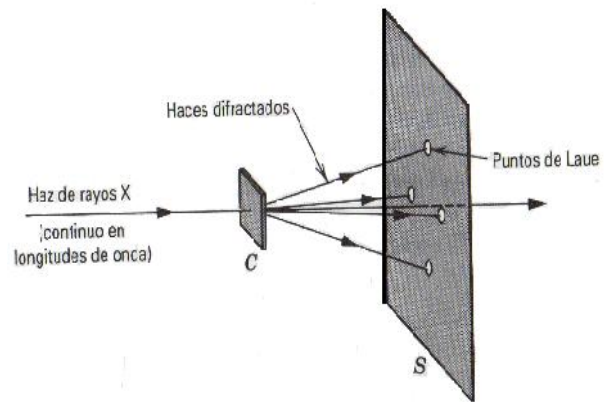


Figura 3.3: Un haz de rayos X choca con un cristal C. Aparecen haces difractados intensos en ciertas direcciones, formando un patrón de Laue sobre la película fotográfica S. Figura extraída de la referencia [4].

Un año más tarde, W. H. Bragg y su hijo Lawrence Bragg recibieron el premio nobel al perfeccionar los conceptos de Von Laue para la difracción de rayos X (DRX) en cristales. [3] Bragg partió de la idea de que una red tridimensional no difracta luz monocromática a cualquier ángulo arbitrario y que éste se verá reforzada constructivamente solo cuando una longitud de onda λ encuentre partes separadas una distancia d y a un cierto ángulo θ .

Utilizando esta idea, la cual se representa gráficamente en la figura 3.4, [5] Bragg determinó que la radiación incidente es dispersada por los planos

crystallográficos determinados por los índices de Miller $h k l$, y de esta manera llegó a la ecuación:

$$\delta = 2d \sin \theta = n\lambda \quad (3.4)$$

donde

δ = Diferencia de camino óptico

d = Distancias perpendicular entre planos

θ = Angulo de incidencia o ángulo rasante

λ = Longitud de onda

n = Orden de la reflexión

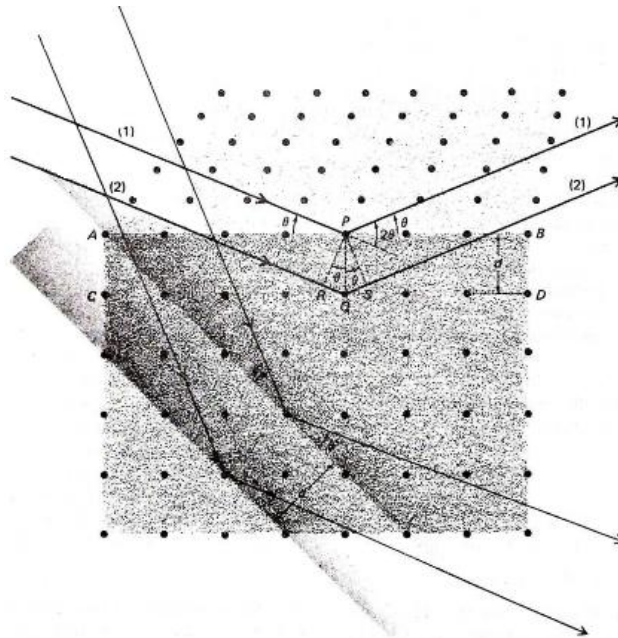


Figura 3.4: Vista exagerada de las reflexiones de Bragg por varios planos en un cristal. Figura extraída de la referencia [3].

Por otra parte cabe destacar que la distancia interplanar d se relaciona con las dimensiones de la celda unitaria según la simetría cristalina del material.^[4]

Los rayos X son clasificados en:

- **Suaves:** asociados a las capas menos energéticas L, M, N, etc.
- **Duros:** asociados a la capa de mayor energía K, como lo muestra la figura 3.5.^[3]

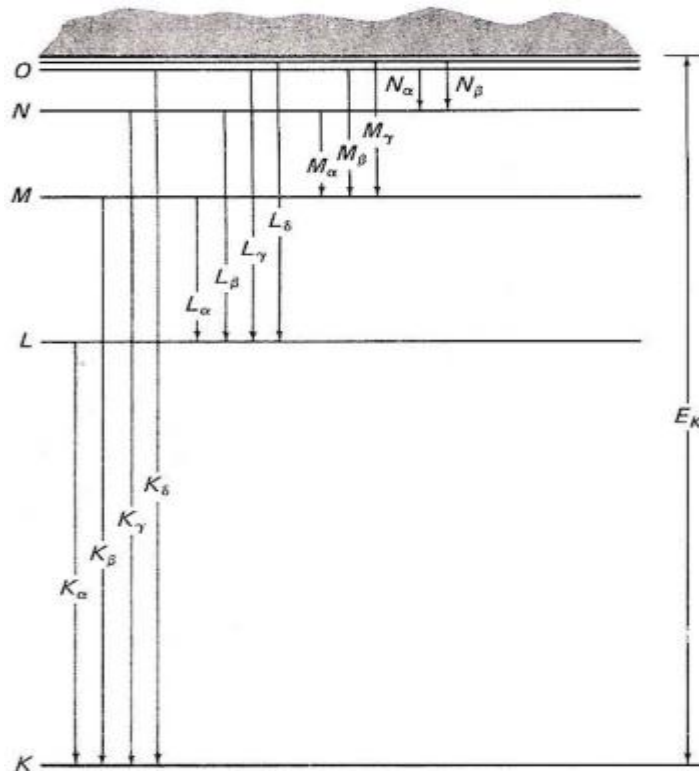


Figura 3.5: Transiciones electrónicas para las capas cercanas al núcleo, que dan lugar a los espectros característicos de los rayos X. Figura extraída de la referencia [3].

Cuando el haz de electrones no interactúa de manera directa con los electrones del blanco, estos lo hacen con el campo coulombiano produciendo los Rayos X de Bremsstrahlung, que es una radiación emitida por los electrones al experimentar una deceleración.^[3] La figura 3.6 muestra un esquema de la emisión de RX por medio de este fenómeno.

La interacción del haz de electrones con el blanco se grafica en un plano que representa la intensidad como función de la longitud de onda y que a su vez

depende de la diferencia de potencial aplicada. La figura 3.7 muestra un espectro de rayos X para la plata a modo de ejemplo.

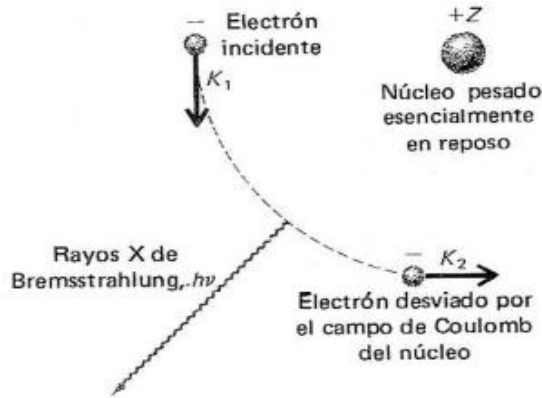


Figura 3.6: Radiación Bremsstrahlung producido por la aceleración de un electrón en un campo coulombiano. Figura extraída de la referencia [3].

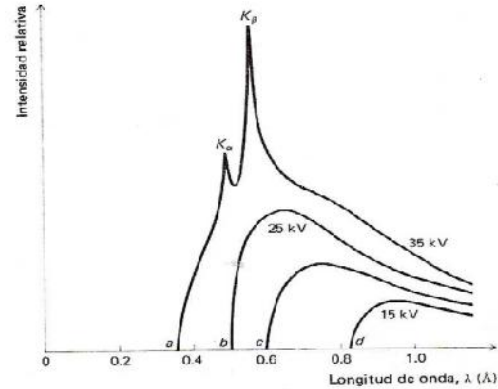


Figura 3.7: Espectro de rayos X de la plata, en este se muestran los espectros Bremsstrahlung y característicos. Figura extraída de la referencia [3].

Actualmente los rayos X tienen sus aplicaciones sirviendo para la detección de objetos en organismos como oficinas de correos, aplicaciones médicas, aplicándose para el diagnóstico y combate de enfermedades.^[5] Esto debido a sus cuatro propiedades útiles que son:^[5]

- Penetrar en materia sólida
- Provocar fluorescencia en ciertos compuestos químicos
- Ionizar los átomos
- Afectar una placa fotográfica

La difracción de rayos X es una herramienta que muestra los patrones de difracción de los cristales, a partir de los cuales se puede inferir su disposición atómica.^[4] Debido a esto, muchas propiedades físicas de los cristales pueden ser investigadas con gran exactitud, utilizando diferentes técnicas basadas en la interacción de los rayos X con la muestra.

Dentro de los tres métodos principales para la obtención de un patrón de difracción, tenemos los siguientes:^[6]

- Método Roentgenográfico o de Rayos X
- Método Electronográfico
- Método Neutronográfico

Para la elaboración de esta tesis únicamente se utilizó el método de Rayos X o Roentgenográfico (Llamado así en honor a su descubridor); a continuación mencionaremos sus características generales, y tres de sus principales técnicas.

De manera general, el método de Rayos X consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre un cristal para que interaccione con su red cristalina, dando como resultado un patrón de difracción, que a manera general es una distribución de la densidad electrónica caracterizada por la función de coordenadas $\rho(x, y, z)$, dado que esta distribución es periódica en el volumen del cristal, su representación puede hacerse en forma de una serie de Fourier de la siguiente manera.^[6]

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_c} \sum_{hkl=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} \cos 2\pi (hx + ky + lz - \alpha_{xyz}) \quad (3.5)$$

donde

$\rho(x, y, z)$	→	Valor de la densidad electrónica en el cuerpo del cristal
V_c	→	Volumen de la celda elemental
hkl	→	Índices cristalográficos en los que se produce reflexión
α_{xyz}	→	Fase de la onda reflejada
F_{hkl}	→	Amplitud estructural

Esta fórmula está escrita para el caso general, y los datos pueden obtenerse a partir de un patrón de difracción de Rayos X, entre las cuales destacan las siguientes técnicas:

- Método de Laue

- Método del cristal giratorio
- Método del goniómetro de rayos X
- Método de Polvo cristalino (Método de Debye – Scherrer)

MÉTODO DE LAUE: Históricamente fue el primer método de difracción empleado y fue propuesto por Max Von Laue, este método consiste en hacer incidir un haz de rayos X compuesto de todas las longitudes de onda sobre un monocristal fijo y del cual emergerán haces que representarán la simetría del cristal.^[6,7] Para este método existen dos variantes que son: *Método de Laue por Transmisión* y *Método de Laue por Retroreflexión*.

Método de Laue por transmisión: En este método, la película fotográfica es ubicada detrás de la muestra, tal como se observa en la figura 3.8.^[6,8]

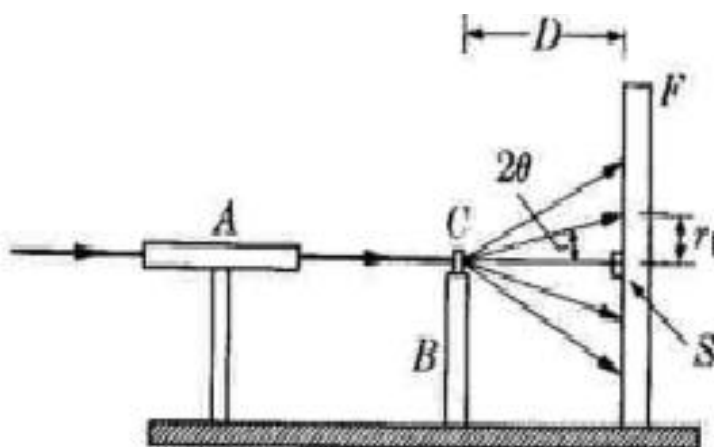


Figura 3.8: Esquema del método de Laue por transmisión. Figura extraída de la referencia [8].

De la geometría observada en la figura 3.8 se concluye lo siguiente:

$$\operatorname{Tg} (2\theta) = \frac{r_1}{D} \quad (3.6)$$

donde:

$r_1 \rightarrow$ Distancia entre el haz difractado y el haz transmitido

$D \rightarrow$ Distancia de la muestra a la película

Cabe mencionar que en el método de transmisión la muestra no debe tener demasiado espesor, ya que esto evitaría la difracción.

Método de Laue por Retro-reflexión: En este método la película fotográfica es ubicada entre la fuente de rayos X y la muestra, como se observa en la figura 3.9. [8]

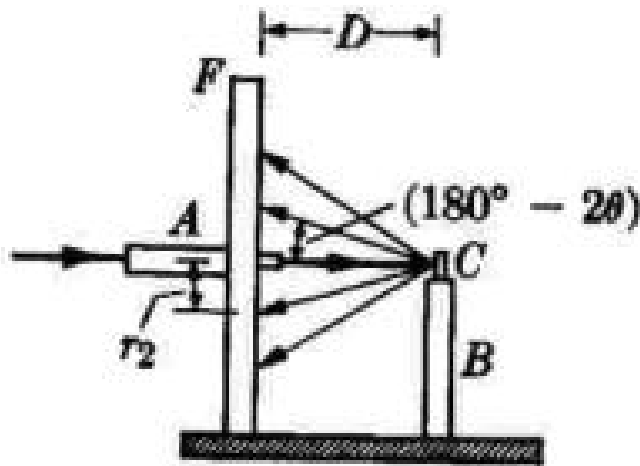


Figura 3.9: Esquema del método de Laue por retroreflexión. Figura extraída de la referencia [8]

De la figura 3.9 también podemos observar la siguiente geometría:

$$\text{Tg} (180 - 2\theta) = \frac{r_2}{D} \quad (3.7)$$

donde:

$r_2 \rightarrow$ Distancia entre el centro de la película y el haz difractado

$D \rightarrow$ Distancia de la muestra a la película

Aquí a diferencia del método anterior, no existe restricción alguna sobre el espesor de la muestra.

MÉTODO DEL CRISTAL GIRATORIO: En esta técnica se utiliza una radiación monocromática de longitud de onda λ determinada. El cristal se hace girar alrededor de un eje, cuya dirección se halla por el método de Laue.

Se parte de un cristal previamente estudiado de forma macroscópica con el objetivo de conocer su sistema cristalino y la posición de sus tres ejes principales. A continuación se monta la muestra en una cámara cilíndrica de forma perpendicular al haz incidente, como se muestra en la figura 3.10, posteriormente se hace girar el cristal hacia cada uno de sus ejes y se toma un diagrama para cada uno de ellos, obteniéndose así un diagrama para cada eje cristalino.^[9]

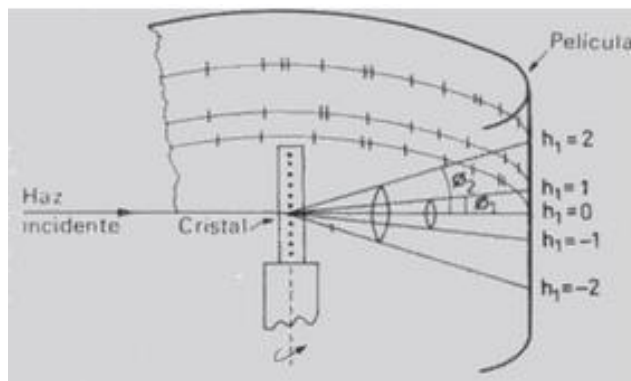


Figura 3.10: Esquema del método de cristal giratorio.
Figura extraída de la referencia [9]

Este método permite calcular los valores de a , b y c sin la necesidad de indexar reflexiones.

MÉTODO DE POLVO CRISTALINO: En este método, propuesto por P. Debye y P. Scherrer en el año de 1916, la muestra es pulverizada finamente para formar partículas cristalinas orientadas arbitrariamente. Además de esto, el haz de RX se hace girar durante la exposición de la muestra, el método se basa en el hecho de que cada sustancia en estado cristalino tiene un difractograma de RX característico.

En la cámara de polvo (figura 3.11) se hace pasar un haz monocromático de RX que pasa a través de un colimador el cual interacciona con la muestra colocada en el centro. Al tiempo en que los haces son registrados en una película fotográfica delgada.

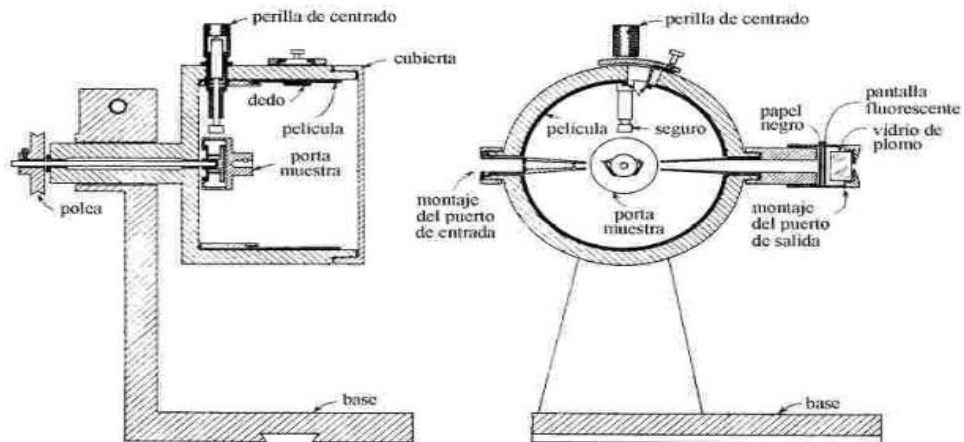


Figura 3.11: Cámara de Polvo Cristalino de Debye - Scherrer. Figura extraída de la referencia [8].

La geometría del método se muestra en la figura 3.12.

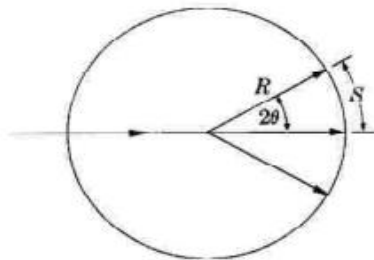


Figura 3.12: Geometría del método de polvo cristalino (Debye - Scherrer). Figura extraída de la referencia [8].

Del cual se obtiene la siguiente relación:

$$S = 2\theta R \quad (3.8)$$

donde

$S \rightarrow$ Es la distancia media sobre la película desde la línea de difracción.

$R \rightarrow$ Es el radio de la cámara.

La información que puede obtenerse de un difractograma de polvos es:

- a) Espaciado interplanar
- b) Índices de Miller de las reflexiones
- c) Dimensiones de celda y tipo de red
- d) Intensidad relativa de las difracciones
- e) Identificación cualitativa de los compuestos cristalinos
- f) Análisis cuantitativo de mezclas cristalinas
- g) Determinación del tamaño del cristal a partir de la anchura del pico de difracción entre otros.

Por su parte, Scherrer propuso la ecuación:

$$L = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.9)$$

en el año de 1918 para el cálculo de los tamaños de los cristales (L) por medio de una longitud de onda (λ) proveniente de una DRX, y donde beta (β) es la anchura del pico del perfil de difracción a la mitad de la altura máxima resultante del pequeño tamaño de los cristallitos expresado en radianes, por su parte theta (θ) es el ángulo de difracción o ángulo de Bragg. Por último, el factor de forma (K) conocida también como constante de Scherrer, la cual está relacionada con la forma de los cristallitos, puede tomar valores desde 0.62 hasta 2.08, sin embargo generalmente se toma como 0.9.

En esta investigación se empleó un difractómetro X'pert Pro X-ray (PANanalytical) usando radiación Cu K_{α} ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

3.3 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA - VISIBLE

La espectroscopia ultravioleta - visible, también llamada espectrofotometría UV-Visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (ultravioleta cercano e

infrarrojo cercano), esta es una técnica complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que se caracteriza por tener la energía suficiente para realizar transiciones electrónicas de sistemas conjugados y además ofrecer información acerca de la longitud de onda y estructura de la parte molecular.^[10,11]

Estas transiciones electrónicas debidas a ganancia o pérdida de energía entre orbitales atómicos se realiza en cantidades discretas llamadas cuantos, como producto de las interacciones entre materia y energía.^[10]

La materia, que en general está integrada por moléculas; sin que importe su disposición, se encuentran en constante movimiento de traslación, rotación y vibración. Dicho movimiento molecular está asociado a la energía.^[10]

En cada estado electrónico existen varios niveles vibracionales, a su vez, en cada nivel vibracional, hay diversos niveles rotacionales^[10] tal como se puede observar en la figura 3.13.^[2]

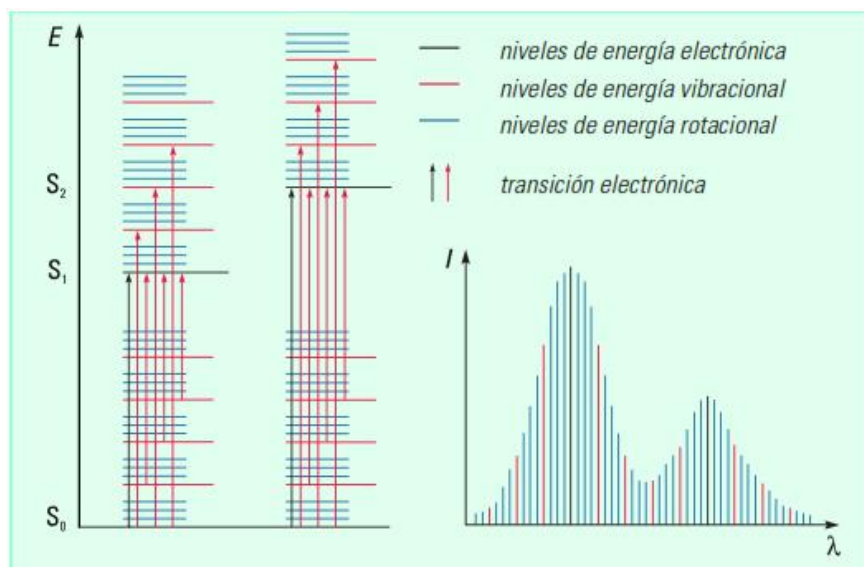


Figura 3.13: La figura muestra las transiciones electrónicas, y además los niveles vibracionales y rotacionales dando como resultado los espectros UV-Visible que observamos. Figura extraída de la referencia [2].

En base a lo anterior, podemos decir que la molécula tiene una energía total dada por:

$$E_{Total} = E_{Electronica} + E_{Vibracional} + E_{rotacional} \quad (3.10)$$

donde, estas energías tienen el siguiente orden:

$$E_{Electronica} > E_{Vibracional} > E_{rotacional} \quad (3.11)$$

de esta manera la molécula, solo tomará la energía que realice algún cambio en cualquiera de estos estados.

Dicha energía tiene una longitud de onda característica requerida para mover a un electrón desde un nivel de energía inferior a uno superior. La figura 3.14, muestra un ejemplo de estas transiciones electrónicas^[2].

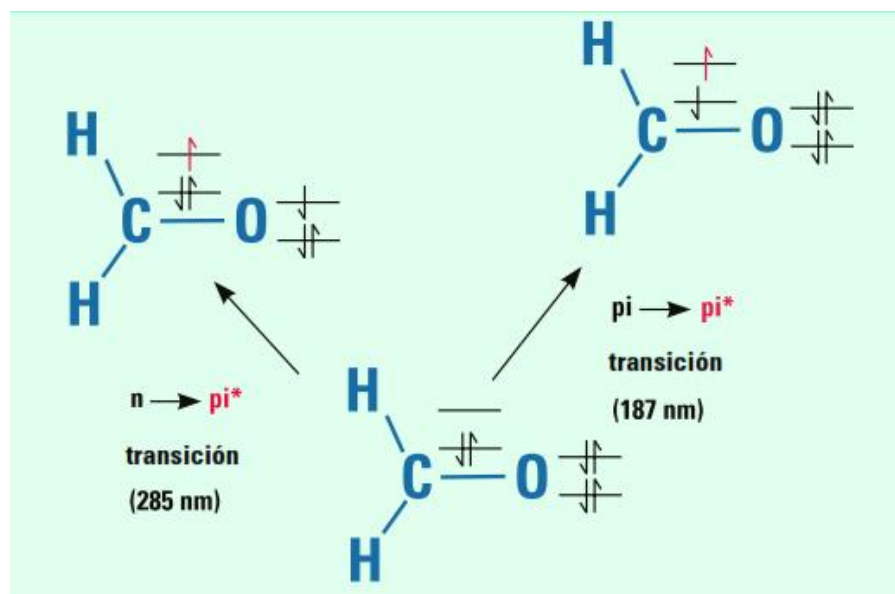


Figura 3.14: Diferentes transiciones electrónicas en un formaldehído, la cual depende de la energía. Figura extraída de la referencia [2].

En la figura 3.14, se observan también transiciones electrónicas propias de la técnica, estas son: $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, dichas transiciones están ordenadas en orden creciente según su energía asociada en que fueron enunciadas, donde las transiciones más observadas son las $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. La figura 3.15 muestra el orden de dichos enlaces. ^[2]

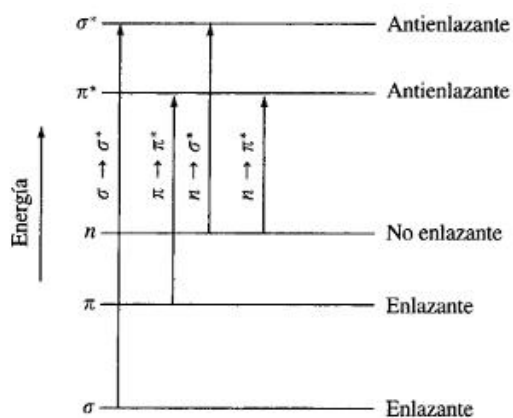


Figura 3.15: Niveles de energía electrónica de orbitales moleculares. Figura extraída de la referencia [1].

Estas transiciones entre fotones y la materia (muestra) son debidas a la potencia del haz incidente (P_0), el cual es atenuado hasta (P) cuando pasa a través de la muestra, donde la potencia de ambos haces se relacionan formando un nuevo concepto llamado Transmitancia (T), que es simplemente la fracción de radiación incidente que se transmite a través de la solución, dicha relación está dada por:^[2]

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (3.12)$$

que en muchos casos se relaciona en forma porcentual como:^[2]

$$\%T = \left(\frac{P}{P_0}\right) \times 100 \quad (3.13)$$

Sin embargo, en UV-Visible se utiliza el concepto absorción que es una medida de la longitud de onda que pasa a través de una muestra, dicha absorción está relacionada con la Transmitancia por medio de la ecuación.^[11]

$$A = -\text{Log} \left(\frac{P}{P_0}\right) = -\text{Log} T \quad (3.14)$$

esta absorción o absorbancia de la muestra es también proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la luz incidente, la cual es expresada por la ley de Lambert - Beer como:

$$A = abc \quad (3.15)$$

esta proporcionalidad es debida a:

- Una constante que es propiedad de la sustancia, así como la longitud de onda de medida.
- La longitud de paso óptico a través de la cual la luz viaja hacia la muestra.
- La concentración de la sustancia que absorbe la luz.

Esta ecuación, también es conocida como ley de Beer, puede deducirse a partir de un análisis a la figura 3.16, la cual nos da una idea general de la misma.^[11]

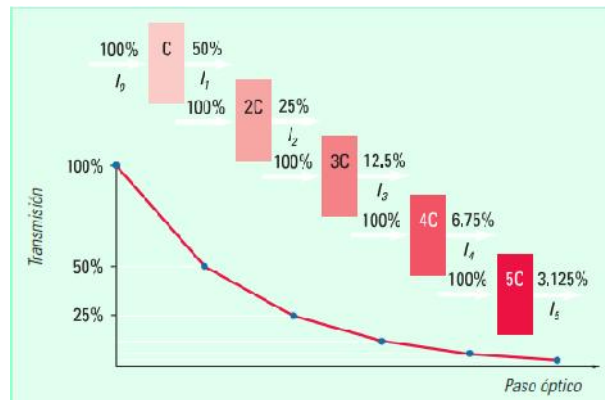


Figura 3.16: Atenuación de un haz de luz al pasar sobre una muestra en diferentes concentraciones. Figura extraída de la referencia [2].

Finalmente, para realizar un análisis UV-Visible se realizan dos medidas de la cantidad de luz absorbida; en la primera se mide un blanco, con una intensidad del blanco P_0 , que se asociará a la situación en la que la concentración del material a analizar es cero; posteriormente se realiza la segunda medida cuando la concentración es desconocida, la cual se denomina con una intensidad P .^[11]

La medición final se obtiene comparando la medida de las muestras con la medida del blanco, esta comparación implica la relación $\frac{P}{P_0}$, todo realizado bajo las mismas condiciones instrumentales (longitud de onda, geometría, etc.).^[11] De esta forma se obtienen las graficas comunes de un análisis UV-Visible.

Con estas consideraciones, la ley de Lambert-Beer, también conocida como ley de Beer, se puede expresar como:^[1]

$$A = -\text{Log } T = \text{Log} \left(\frac{P_0}{P} \right) = \epsilon bc \quad (3.16)$$

donde

A → Absorbancia

T → Transmitancia

P_0 → Potencia de entrada

P → Potencia de salida

Tal como se observa en la ecuación anterior, la absorbancia es proporcional a la concentración de la sustancia que absorbe la luz incidente.^[11] Por esta razón podemos escribir la absorbancia con la expresión (3.15).

Esta relación, puede explicarse a partir de la consideración de un bloque de material absorbente (sólido, líquido o gas), como el mostrado en la figura 3.17:

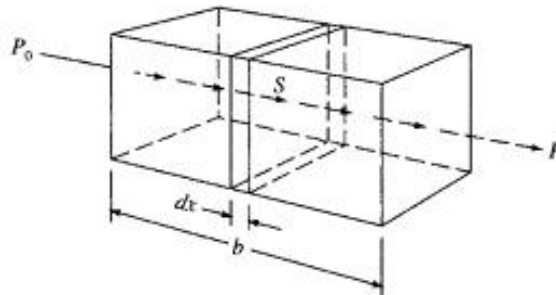


Figura 3.17: Representación inicial para la deducción de la ley de Beer. Figura extraída de la referencia [1].

Tal como se observa en la figura 3.17, el haz de radiación monocromática P_0 choca de manera perpendicular a la superficie del bloque, posteriormente pasa a través de una longitud b de material, que contiene n cantidad de átomos, iones ó moléculas absorbentes; dando una radiación P ($P < P_0$) de salida como resultado de la absorción.^[1]

Esta forma general de la ley de Beer, se puede deducir también, a partir de las figuras 3.18 a la 3.21. En la figura 3.18 observamos un haz incidente P_0 , el cual disminuye su intensidad a P_1 al pasar por un bloque de espesor x ; sin importar las condiciones que propician la atenuación, esta intensidad P_1 puede ser

expresada como un número k veces el haz incidente P_0 ; donde $0 \leq k \leq 1$. Si a continuación se coloca un nuevo bloque con las mismas condiciones que el primero, como el que se muestra en la figura 3.19, observamos que el haz saliente del primer bloque (P_1) incide a través del segundo bloque, y sale de él con una intensidad P_2 ($P_2 < P_1$); de igual manera que en el primer caso, P_2 puede ser expresado como k veces el haz incidente P_1 . Entonces, de manera general y en base a las figuras 3.18 y 3.19 podemos obtener las siguientes relaciones:^[11]

$$P_2 = kP_1 = k(kP_0) = k^2P_0 \quad k < 1 \quad (3.17)$$

Lo anterior puede ser observado en la figura 3.20.

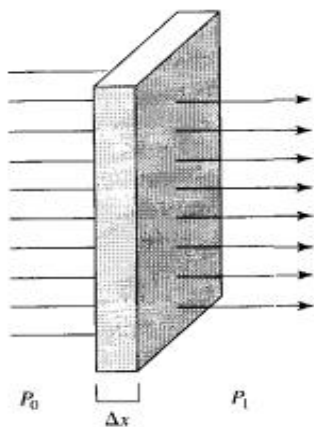


Figura 3.18: Absorción de un haz incidente P_0 a través de un bloque de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].

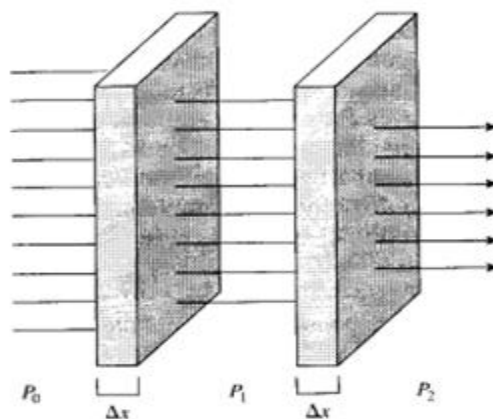


Figura 3.19: Dos bloques de las mismas condiciones superpuestos al paso de un haz incidente. Figura extraída de la referencia [11].

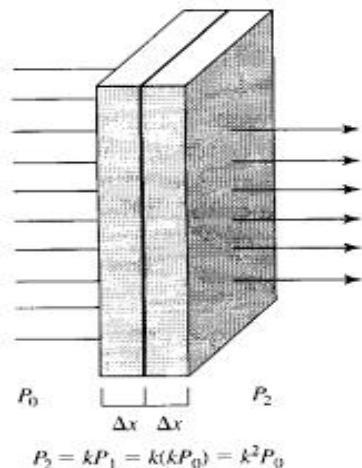


Figura 3.20: Interacción de un haz incidente a través de dos bloques de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].

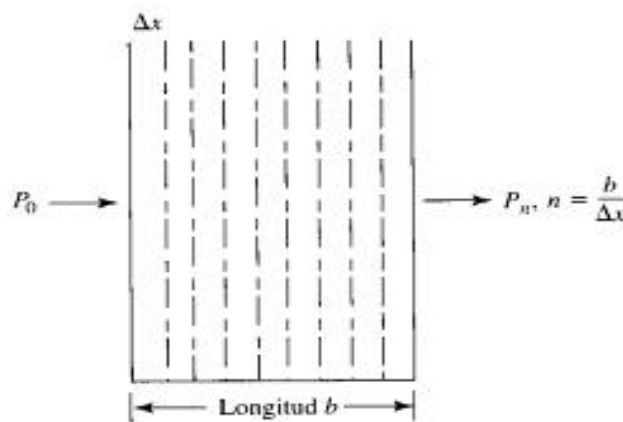


Figura 3.21: La longitud b de la muestra es representada con n cantidad de bloques de espesor x . Figura extraída de la referencia [11].

Si se piensa ahora en una muestra con longitud de paso óptico b el cual sea utilizado en un análisis, entonces podremos ajustar lo antes visto como:

$$b = n \Delta x \quad (3.18)$$

o bien como

$$n = \frac{b}{\Delta x} \quad (3.19)$$

De lo anterior, y apoyándonos en la figura 3.21 podemos deducir que:

$$P_n = k^n P_0 = k^{b/\Delta x} P_0 \quad (3.20)$$

Simplificando, tenemos:

$$\text{Log} \left(\frac{P_n}{P_0} \right) = \frac{b}{\Delta x} \text{Log} (k) \quad k < 1 \quad (3.21)$$

pero como $\text{Log} (k)$ y Δx son constantes

$$- \text{Log} \left(\frac{P_n}{P_0} \right) = \alpha b \quad (3.22)$$

Donde α es una constante positiva y b la longitud de paso óptico total. Esta es la razón por lo que se define la absorbancia como $\text{Log} \left(\frac{P_0}{P} \right)$. Lo que indica que la absorbancia cambia de manera lineal con la longitud de paso óptico. ^[11] Por otra parte, la constante α puede ser expresada como $\alpha = ac$, lo cual nos conduce a la ya conocida ley de Lambert -Beer

$$A(\text{adimensional}) = a \left(\frac{L}{\text{gr cm}} \right) b(\text{cm}) c \left(\frac{\text{gr}}{L} \right) \quad (3.23)$$

O también, podemos expresarlo en unidades distintas:

$$A(\text{adimensional}) = \varepsilon \left(\frac{L}{\text{mol cm}} \right) b(\text{cm}) c \left(\frac{\text{mol}}{L} \right) \quad (3.24)$$

Las medidas de espectroscopía UV-Visible realizadas en esta investigación se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60s en un rango espectral con longitudes de onda entre 300 y 1000 nm.

3.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La región infrarroja (debajo del rojo) del espectro electromagnético, corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo de las frecuencias visibles, y por encima de las frecuencias de microondas.^[10] Esta radiación abarca un número de onda comprendido entre 12800 y 10 cm^{-1} , que corresponde a longitudes de onda entre 0.78 a $1000\mu\text{m}$.^[1]

Debido a que los fotones IR pueden ocasionar que los grupos de átomos vibren con respecto a los enlaces que los conectan;^[10] esta espectroscopia se utiliza para analizar características vibracionales de moléculas, estructuras cristalinas y cristales.^[11] Dentro de estas vibraciones pueden distinguirse dos casos.^[1]

- 1) **Tensión:** La cual supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos. Figura 3.22a.
- 2) **Flexión:** Se caracterizan por cambios en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: *Balanceo*, *Tijereteo*, *Aleteo* y *Torsión*. Figura 3.22b.

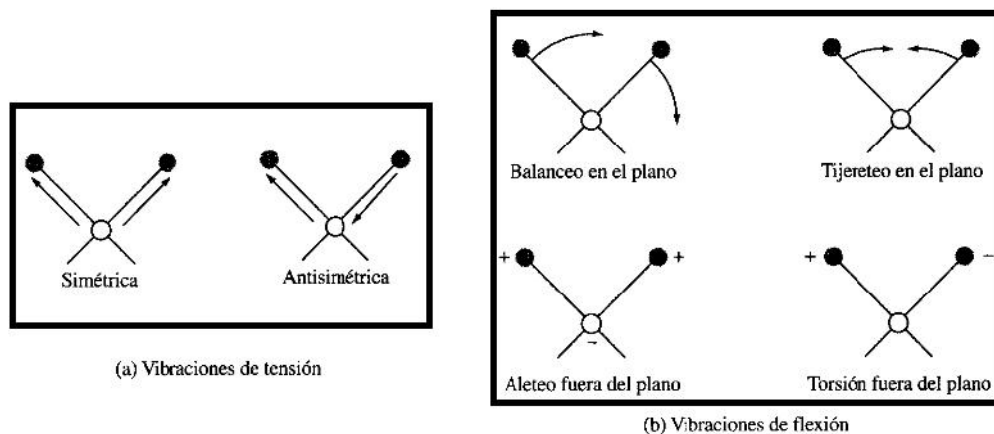


Figura 3.22: Se indican los dos tipos de vibraciones moleculares, a) Tensión y b) Flexión; + Indica movimiento del plano de la pagina hacia el lector , - Indica movimiento del plano de la pagina alejándose del lector. Figura extraída de la referencia [1].

Normalmente, los comportamientos vibracionales se pueden estudiar considerando el oscilador armónico, de modo que su frecuencia de vibración molecular se calcula con la expresión:^[1]

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1+m_2)}{m_1 m_2}} \quad (3.25)$$

donde:

$k \rightarrow$ Constante de fuerza de enlace químico, que es una medida de su rigidez.

$\nu_m \rightarrow$ Frecuencia vibracional del modelo clásico.

Sin embargo, la naturaleza cuántica de estas vibraciones no aparecen en la ecuación anterior, no obstante, se pueden deducir estas ecuaciones de onda de la mecánica cuántica cuyas soluciones para la energía potencial tienen la forma:^[1]

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) h\nu_m \quad (3.26)$$

donde:

$h \rightarrow$ Constante de Planck

$\nu \rightarrow$ Número cuántico vibracional, que solo puede tomar valores enteros positivos (incluyendo el cero)

En la región infrarroja, la absorción resulta a partir de los modos vibracionales en las moléculas.^[1] Sin embargo, esta espectroscopia se divide en tres categorías que son:

- 1) Infrarrojo cercano
- 2) Infrarrojo medio
- 3) Infrarrojo lejano

Cada una de las cuales tiene un intervalo, como lo muestra la tabla 3.1

Tabla.3.1: Regiones del espectro infrarrojo. Tabla extraída de la referencia [1].

Región	Intervalo de longitud de onda (λ), μm	Intervalo de número de onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Intervalo de frecuencias (ν), Hz
Cercano	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Medio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Lejano	50 a 1 000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
La más utilizada	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Infrarrojo Cercano

La instrumentación utilizada aquí, es muy similar a la de la espectroscopía UV-Visible, variando principalmente los disolventes, esto debido a que no todos muestran transparencia en todo el intervalo; algunos disolventes se muestran en la figura 3.23.

Dentro de esta espectroscopia, se utilizan las medidas de reflexión difusa y transmisión, aunque la reflectancia difusa es la más utilizada.

En espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano la muestra sólida es pulverizada e irradiada con una longitud de onda de entre 1 y 2.5 μm o 1000 y 4000 cm^{-1} . Su aplicación principal es la determinación de proteínas, humedad, almidón, aceite, lípidos y celulosas en productos agrícolas. [1]

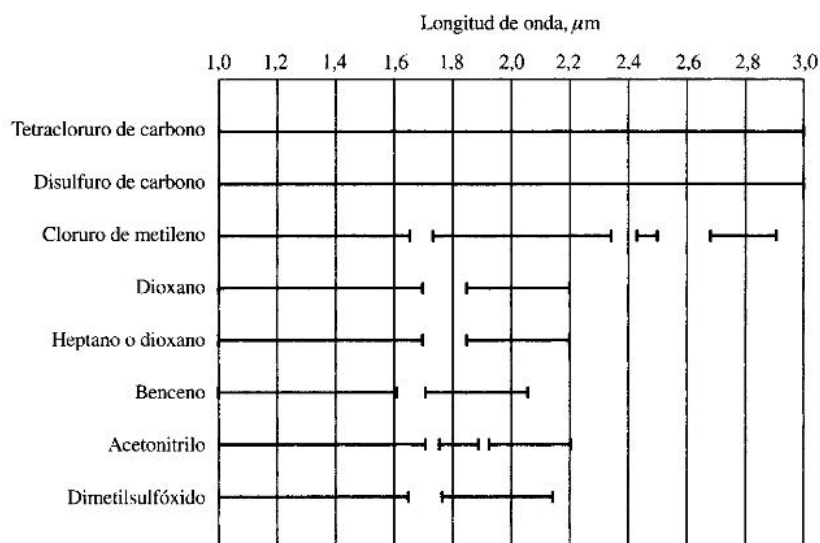


Figura 3.23: Disolventes utilizados en espectroscopia de infrarrojo cercano. Las líneas continuas indican una transparencia satisfactoria para emplearlos con cubetas de 1 cm. Figura extraída de la referencia [1].

Infrarrojo Medio

Es la región más utilizada de las tres categorías, siendo el principal intervalo entre 670 y 4000 cm^{-1} ; se emplea para análisis cualitativo y cuantitativo, empleando espectros de absorción, reflexión o emisión.^[1]

Dentro del infrarrojo medio, la espectrometría de absorción y reflexión, son la principal herramienta para determinación estructural de especies orgánicas y bioquímicas. Sin embargo, la manipulación de la muestra es la parte más difícil; pero las diferentes técnicas para cada uno de los diferentes estados de la muestra permiten obtener resultados satisfactorios.^[1]

A diferencia del infrarrojo cercano, aquí no existe disolvente que sea transparente en toda la región de infrarrojo medio, algunos disolventes utilizados en estudios de compuestos orgánicos se muestran en la figura 3.24.

Otro punto importante, son las cubetas utilizadas, las cuales son mucho más estrechas que las empleadas en ultravioleta y visible (de 0.1 a 1 mm). Estas cubetas son desmontables y con espaciadores de teflón que permiten la variación de camino óptico. Un ejemplo de este tipo de cubetas se muestra en la figura 3.25.

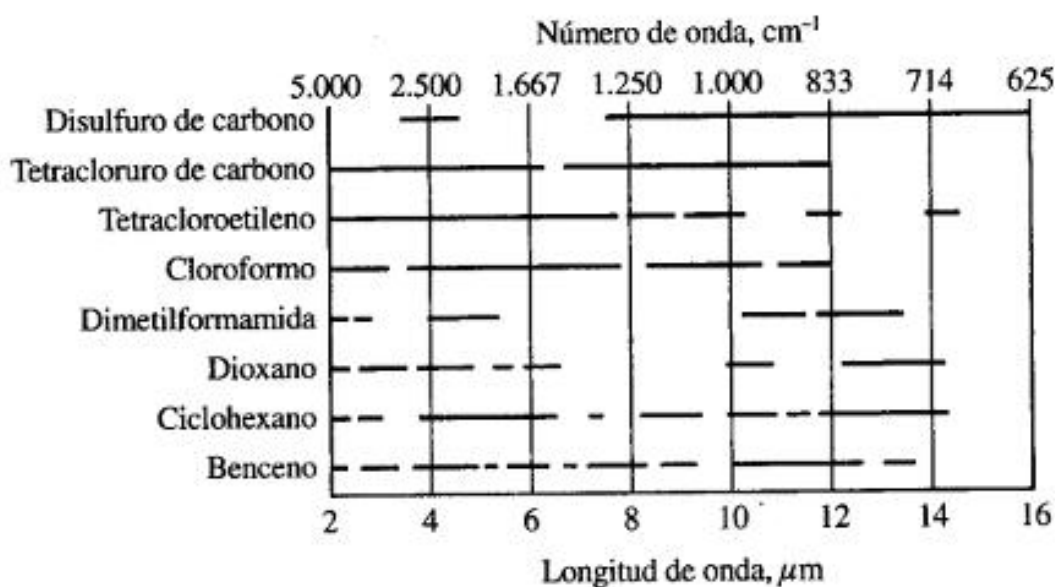


Figura 3.24: Disolventes utilizados en la región del infrarrojo medio. Las líneas horizontales indican las regiones útiles. Figura extraída de la referencia [1].

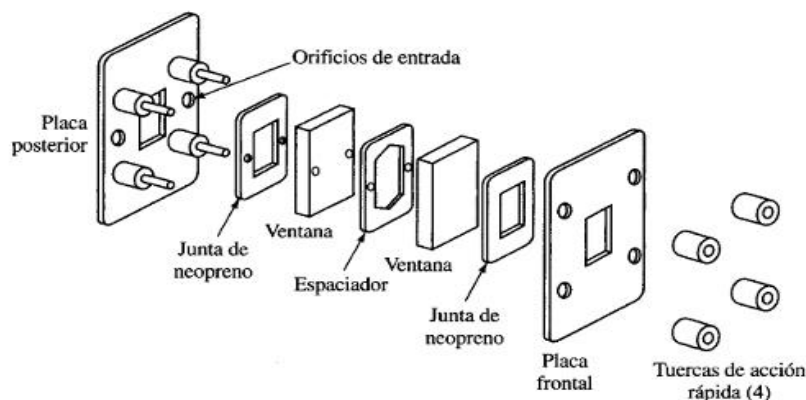


Figura 3.25: Vista aumentada de una cubeta de infrarrojo desmontable para muestras líquidas, la cual dispone de espaciadores de teflón con grosor de 0.015 a 1 mm. Figura extraída de la referencia [1].

Las diferentes técnicas aquí empleadas, se realizan sobre *líquidos*, *sólidos*, *"pastillas"* y *suspensiones*. Siendo la técnica de pastilla la empleada en la elaboración de esta tesis.

La técnica de pastilla, es una de las más populares, y consiste en la formación de pastillas de KBr (bromuro de potasio), aunque pueden utilizarse otros haluros metálicos. Se inicia pulverizando un miligramo o menos de la muestra, la cual se mezcla con aproximadamente 100 mg de polvo de KBr desecado. Posteriormente, la mezcla es compactada con un troquel especial a una presión entre 700 y 1 000 kg/cm² hasta obtener un disco transparente. Al ser analizado, los espectros resultantes, estos presentan bandas entre 3450 y 1640 cm⁻¹ debidas a la humedad absorbida. Motivo por el cual se recomienda hacer una preparación en vacío.^[1]

Infrarrojo Lejano

Tiene utilidad en el estudio de compuestos inorgánicos, proporcionando información sobre las energías reticulares de cristales y de energías de transición de materiales semiconductores. Algunos de los compuestos que absorben principalmente en esta parte del espectro son los formados por átomos ligeros, siempre que las moléculas presenten momentos dipolares permanentes.^[1]

El espectrómetro empleado en la tesis presente fue un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier modelo Nicolet 510, y las muestras se midieron en pastillas KBr.

3.5. RAMAN

La parte fundamental de toda espectroscopia radica en la interacción de un haz de radiación electromagnética con un blanco cuyas características deseamos determinar.^[12]

Debido a efectos de esta interacción, el haz saliente del blanco tendrá una pequeña diferencia con respecto del haz incidente. En principio, esta diferencia será debida a las modificaciones realizadas sobre la estructura del blanco en cuestión (figura 3.26).^[12,13]

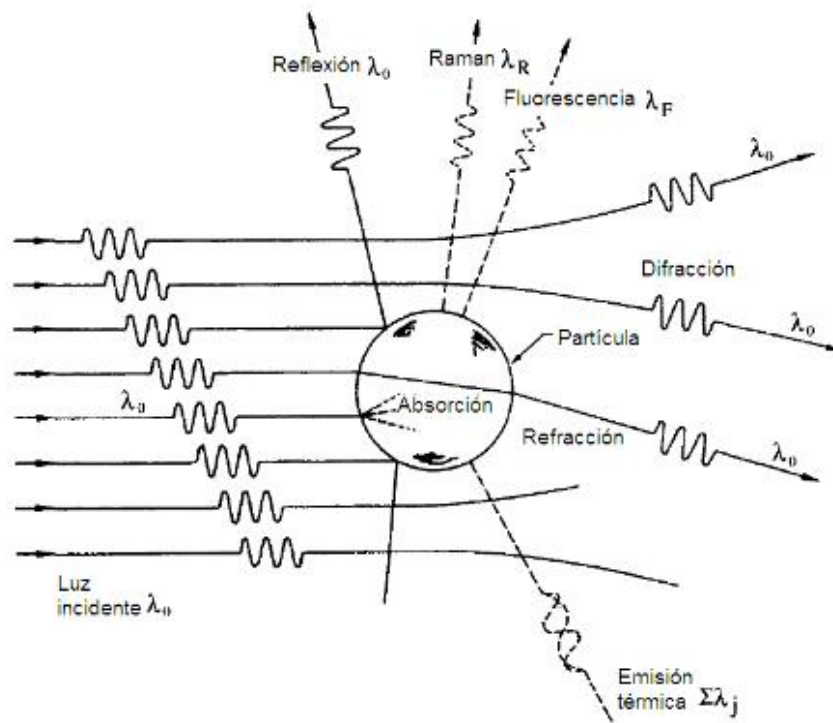


Figura 3.26: Interacción de un haz con una partícula. Figura extraída de la referencia [13]

Sin embargo, la diferencia entre las longitudes de onda saliente y entrante no fue descubierta hasta 1928 por el físico C.V. Raman (figura 3.27), y se conoce como efecto Raman en su honor, quien además observó que el desplazamiento entre estas longitudes era dependiente de la estructura del blanco, siendo esta una característica particular de cada sustancia, semejante a una huella dactilar.^[1,14]



Figura 3.27: Chandrashekhara Venkata Raman (1888-1970)

Si el blanco en estudio cuenta con un modelo general, podrá obtenerse información cuantitativa asociado a los procesos internos a partir de las modificaciones del haz entrante.^[12]

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica capaz de proporcionar información molecular del material que estemos analizando, ya sea orgánico o inorgánico, permitiendo así la identificación del mismo. El principio sobre el cual se sustenta este efecto es la dispersión (desviación de la luz de su dirección original), más concretamente sobre la dispersión inelástica, mismo que puede definirse de manera microscópica como una excitación de la nube electrónica debido al fotón incidente.^[12,15,16]

Dentro del fenómeno de dispersión existen dos tipos:^[12]

- 1) **Dispersión elástica:** Conocida también como dispersión Rayleigh, en la cual las frecuencias del fotón incidente y del fotón emitido son iguales, dando como resultado una variación de energía nula.^[15, 16]
- 2) **Dispersión inelástica:** En esta, la molécula se encuentra en un estado rotacional o vibracional distinto al original debido a la interacción del haz incidente con la molécula, mismo que se traduce a una pérdida o ganancia de energía.^[15]

- a) Si la dispersión es debida a una pérdida de energía, el efecto se le conoce como *dispersión Raman - Stokes*.^[12,15]
- b) Si la dispersión es debida a una ganancia de energía, el efecto se le conoce como *dispersión Raman Anti-Stokes*.^[12,15]

La figura 3.28 resume esquemáticamente estos dos tipos de dispersión de la luz, además de la dispersión Rayleigh.

En el efecto Raman, la energía proveniente del haz incidente, no es suficiente para producir una excitación en la molécula a un nivel electrónico más alto, sin embargo, si lo es para cambiar su estado vibracional, tal como se muestra en la figura 3.29.^[12]

Por otra parte, cabe mencionar que la población de estados excitados, será mucho menor que la del estado básico, dando como resultado mayoritario una ganancia de energía, mismo que se traducirá a una mayor intensidad en el efecto Raman-Stokes.^[12]

La mayoría de moléculas se encontrarán en un estado de mínima energía y, de forma cuantitativa, esta población de moléculas queda determinada por la distribución de Maxwell-Boltzmann:^[12,15]

$$\frac{N_i}{N_0} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (3.27)$$

donde:

N_i = Número de moléculas en el estado de energía E_i .

N_0 = Número de moléculas en el estado de energía E_0 .

k_B = Constante de Boltzmann.

T = Temperatura en grados kelvin.

ΔE = Diferencia de energía entre los estados E_i y E_0 .

Por lo anterior, se puede observar que las líneas Anti-Stokes incrementan cuando se eleva la temperatura.^[12]

A pesar de esto, la intensidad de las líneas Raman son extremadamente débiles en comparación con la intensidad debida al efecto Rayleigh, ya que solo una pequeña fracción de los fotones es dispersado de forma inelástica. La relación

de la intensidad Raman es del orden de 10^{-5} a 10^{-6} veces la intensidad de las líneas Rayleigh,^[11,12,14] razón por la cual esta técnica tuvo muchas limitantes en sus inicios.

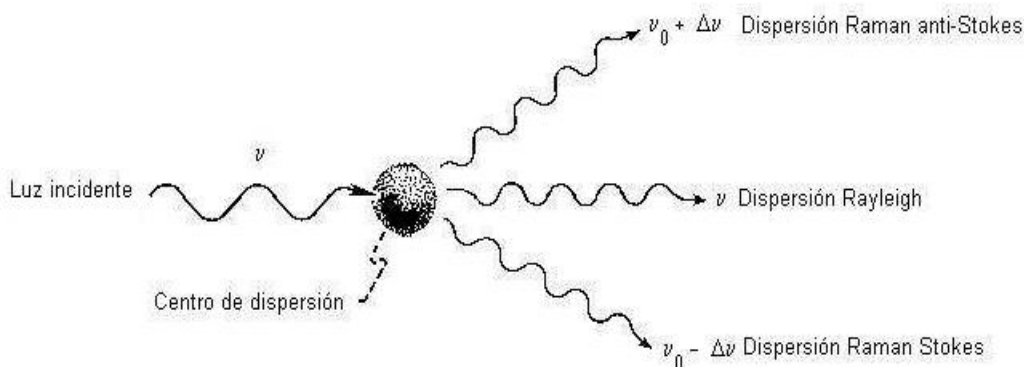


Figura 3.28: Representación esquemática de la dispersión de la luz por una partícula. Figura extraída de la referencia [12].

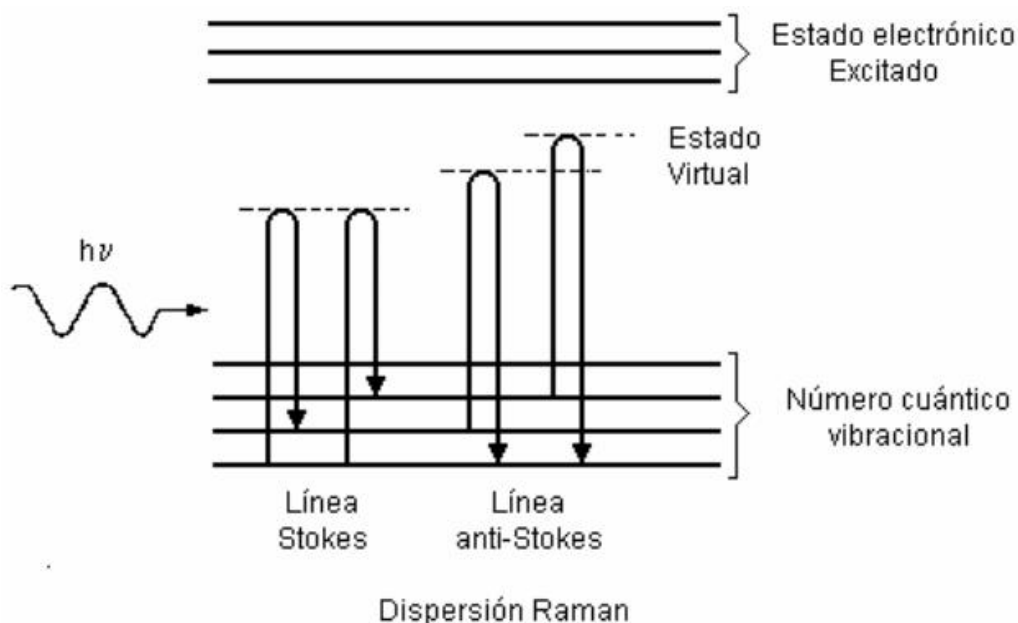


Figura 3.29: La energía proveniente del haz incidente no es suficiente para llegar a un estado electrónico excitado, pero sí para realizar un cambio de estado vibracional. Además se muestra la diferencia entre una línea *Raman Stokes* y *Raman Anti-Stokes*. Figura extraída de la referencia [12].

Actualmente, esta técnica espectroscópica ha evolucionado significativamente respecto a su descubrimiento debido a los avances tecnológicos, mismos que han permitido que hoy en día tenga una gran cantidad de aplicaciones, entre las que destacan:^[14]

- Aplicaciones biomédicas.
 - ✓ Estudios in-vivo e in-vitro de la piel
 - ✓ Identificación de cáncer (mama, piel, oral, cuello uterino, colon - rectal)
 - ✓ Estudio de huesos
 - ✓ Dientes
 - ✓ Aterosclerosis intra-coronaríá
 - ✓ Estudios en el ojo (cornea y fluidos)
- Aplicaciones forenses. Sus ventajas, no contacto y carácter no destructivo de la muestra.
- Aplicaciones farmacéuticas
- Aplicaciones poliméricas
- Aplicaciones en nanotecnología
- Aplicaciones en semiconductores
- Aplicaciones en materiales extraterrestres

El efecto Raman se basa en la dispersión inelástica, en la que un cambio de frecuencias es debido a cambios de energía según la ecuación:^[15]

$$\Delta E = h\Delta\nu \quad (3.28)$$

donde:

h = Constante de Planck.

ν = Frecuencia de la luz incidente.

En la figura 3.30 se representa un espectro Raman en el cual el eje de las abscisas está dado en términos del número de onda, mismo que se relaciona con la longitud de onda por medio de la siguiente expresión:^[1,12,15]

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (3.29)$$

donde:

λ = Longitud de onda de la luz incidente.

Regularmente, en espectroscopia se utiliza esta magnitud en unidades de cm^{-1} .^[11,15]

Es importante resaltar que la magnitud de los desplazamientos en un espectro Raman son independientes de la longitud de onda de excitación, es decir, si una molécula es excitada con una fuente de luz verde (514.5 nm o 19436 cm^{-1}) o luz azul (488 nm o 20492 cm^{-1}), obtendremos líneas Raman a los mismos números de onda ($\Delta\tilde{\nu}$).^[1, 12]

Para comprender el modelo ondulatorio de la dispersión Raman, se considera un haz de radiación cuya frecuencia es ν_{ex} , el cual incide con un blanco. Esta radiación producirá un campo eléctrico descrito por la ecuación:^[1]

$$E = E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) \quad (3.30)$$

donde

E_0 = Amplitud de la onda

Al llevarse a cabo la interacción entre la nube electrónica de enlace del blanco con el campo eléctrico de la radiación incidente, se produce un momento dipolar m que viene dado por la ecuación:^[1]

$$m = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) \quad (3.31)$$

donde

α = Medida de la deformación del enlace (Polarizabilidad).

En el caso de la dispersión Raman, esta polarizabilidad α deberá tener una variación en función de la distancia entre núcleos, de acuerdo con la siguiente ecuación:^[1]

$$\alpha = \alpha_0 + (r + r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (3.32)$$

donde

α_0 = Polarizabilidad de enlace a una distancia de equilibrio internuclear.

r_{eq}, r = Separación internuclear en un instante dado.

Este cambio en la separación internuclear tiene una variación con respecto de la frecuencia de vibración ν_v , según la ecuación:^[1]

$$r + r_{eq} = r_m \cos(2\pi \cdot \nu_v \cdot t) \quad (3.33)$$

donde

r_m = Separación internuclear máxima, en relación con la posición de equilibrio.

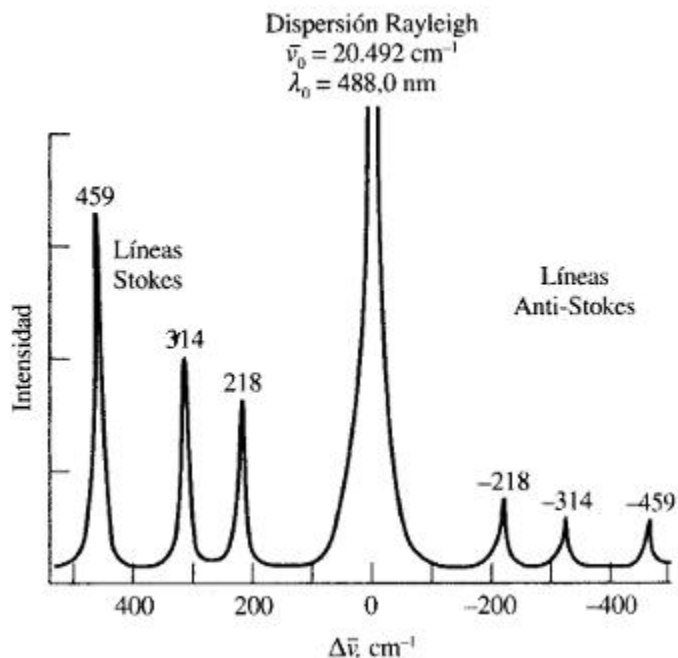


Figura 3.30: Espectro de dispersión Rayleigh de CL_4 excitado con una fuente láser de $\lambda_0 = 488 \text{ nm}$ ($\nu_0 = 20\,492 \text{ cm}^{-1}$). Figura extraída de la referencia [1].

Al combinar las ecuaciones (3.32) y (3.33) se llega a:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right) r_m \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_v \cdot t) \quad (3.34)$$

Entonces una expresión para el momento dipolar m queda como: ^[1]

$$m = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) + E_0 r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right) \cos(2\pi \cdot \nu_v \cdot t) \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) \quad (3.35)$$

Aplicando la identidad trigonométrica siguiente:

$$\cos(x) \cos(y) = \frac{[\cos(x+y) + \cos(x-y)]}{2} \quad (3.36)$$

tendremos que el momento dipolar m queda:^[1]

$$m = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi \cdot \nu_{ex} \cdot t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi \cdot (\nu_{ex} - \nu_v) t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi \cdot (\nu_{ex} + \nu_v) t] \quad (3.37)$$

En la ecuación anterior, cada una de los términos representa los diferentes tipos de dispersiones:

1. El primer término representa la dispersión Rayleigh, que tiene lugar a una frecuencia de excitación ν_{ex} .
2. El segundo término corresponde a las frecuencias Stokes ($\nu_{ex} - \nu_v$)
3. El tercer término corresponde a las frecuencias Anti -Stokes ($\nu_{ex} + \nu_v$)

Por su parte, la espectroscopía *Raman moderna* consta de tres componentes principales:^[14]

1. **Fuente láser:** La cual se caracteriza por ser monocromática, direccional y tener la misma fase, constituyendo así una emisión coherente. Siendo las fuentes más comunes los mostrados en la tabla 3.2.^[14, 17]
2. **Sistema de iluminación**
3. **Espectrómetro adecuado:** Actualmente el más utilizado es el espectrómetro Raman de transformada de Fourier, cuyo esquema se muestra en la figura 3.31.^[14]

Tabla 3.2: Fuentes láser más comunes en espectroscopia. Tabla extraída de la referencia [1]

Tipo de fuente	Longitud de onda, nm
Ion argón	488,0 o 514,5
Ion criptón	530,9 o 647,1
Helio/neón	632,8
Láser de diodos	782 o 830
Nd/YAG	1.064

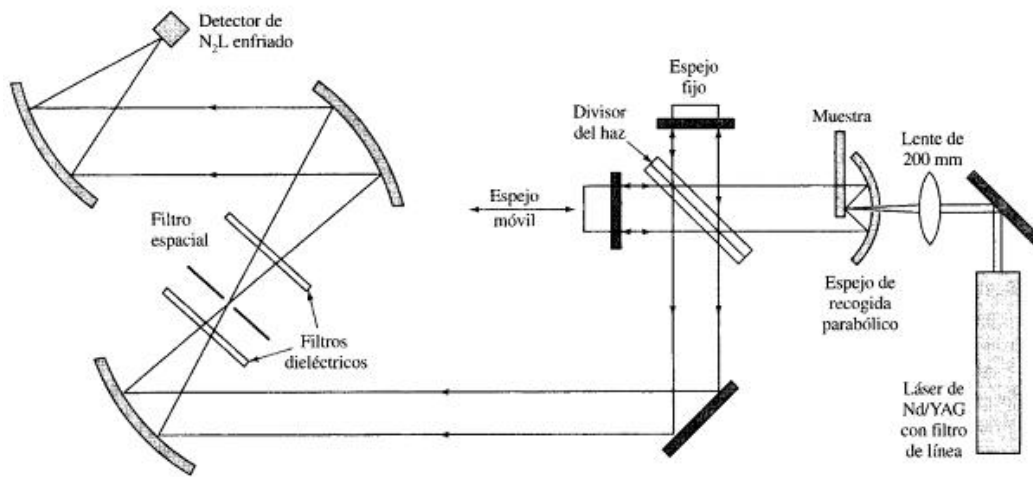


Figura 3.31: Representación esquemática de la óptica de un espectrómetro Raman- FT. Figura extraída de la referencia [1].

3.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopia se descubrió a finales del siglo XVI, pero fue hasta el año de 1931 cuando *Ernst Ruska* y colaboradores presentaron el primer microscopio electrónico de transmisión; posteriormente, en el año de 1965, salió al mercado el microscopio electrónico de Barrido, cuyos fundamentos fueron propuestos por *Knoll* ya en 1935.

Para poder llegar a desarrollar microscopios electrónicos (ME), tuvieron que surgir varias teorías, de la cual la más importante fue propuesta por *De Broglie* en el año de 1924 quien postuló que un haz de electrones tiene asociada una longitud de onda.^[3]

$$\lambda = h/mv \quad (3.38)$$

donde

h = constante de Planck

m = masa

v = velocidad de las partículas.

De esta forma, si un haz de electrones se acelera mediante una diferencia de potencial, adquiere una energía cinética, teniendo las siguientes relaciones:

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = eV \quad (3.39)$$

$$V = \left(\frac{2eV^{\frac{1}{2}}}{m} \right) mv = (2eVm)^{\frac{1}{2}} \quad (3.40)$$

$$\lambda = \frac{h}{(2eVm)^{\frac{1}{2}}} \quad (3.41)$$

$$\lambda = 0.1 \left(\frac{150}{V} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.42)$$

Posterior a esto, en el año de 1926, *Hermann* presentó el diseño de una lente electromagnética, la cual hace posible enfocar un haz de electrones y de esta manera establece las bases de la óptica electrónica. Las figuras 3.32 - 3.34, muestran una serie de lentes electromagnéticas y sus equivalentes ópticos.^[18]

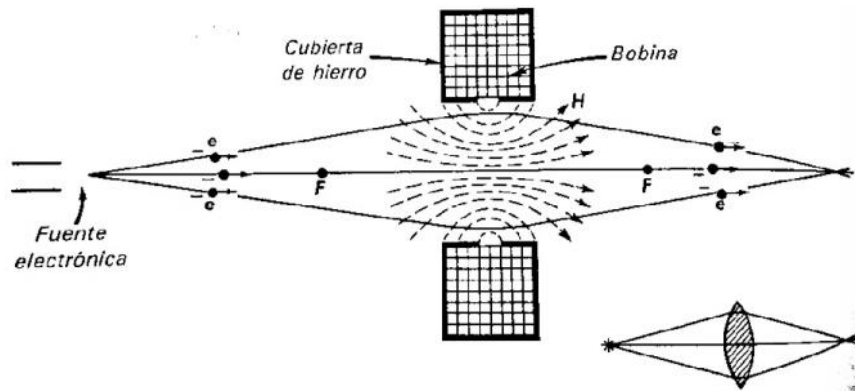


Figura 3.32: Lente magnética para electrones, y su análogo óptico. Figura extraída de la referencia [18].

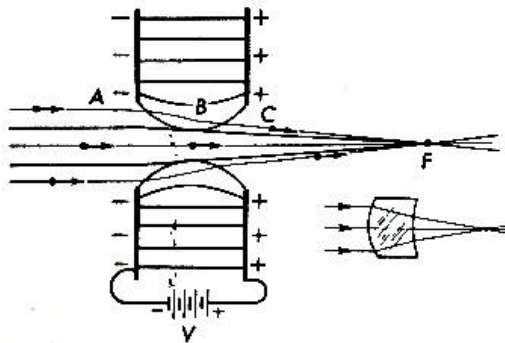


Figura 3.33: Lente electromagnética de doble abertura, y su análogo óptico. Figura extraída de la referencia [18].

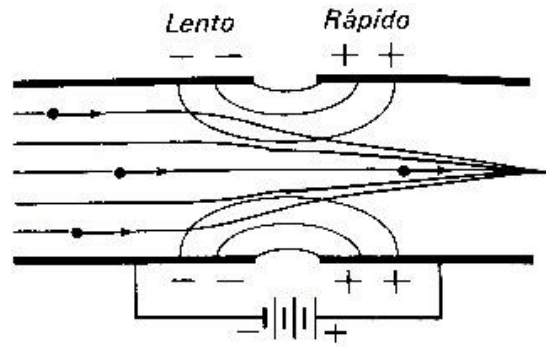


Figura 3.34: Lentes electrónicas simétricas. Figura extraída de la referencia [18].

La figura 3.35, muestra de manera general, los principios de las lentes electromagnéticas y su equivalente óptico.

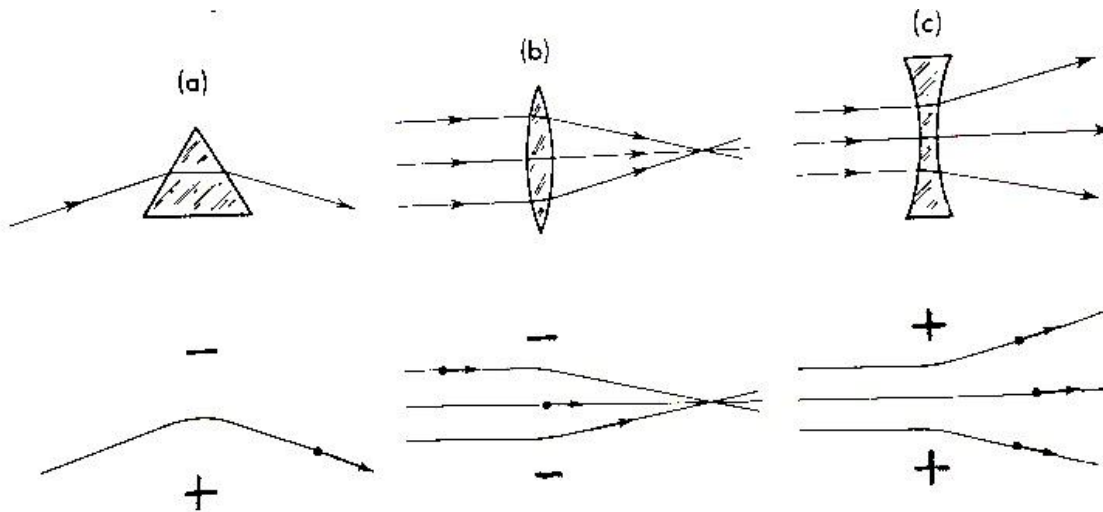


Figura 3.35: Comparación de la óptica electrónica con la luminosa. Figura extraída de la referencia [18].

En la figura 3.36 se compara el principio del microscopio óptico con el microscopio electrónico, siendo fácil apreciar su similitud de funcionamiento.

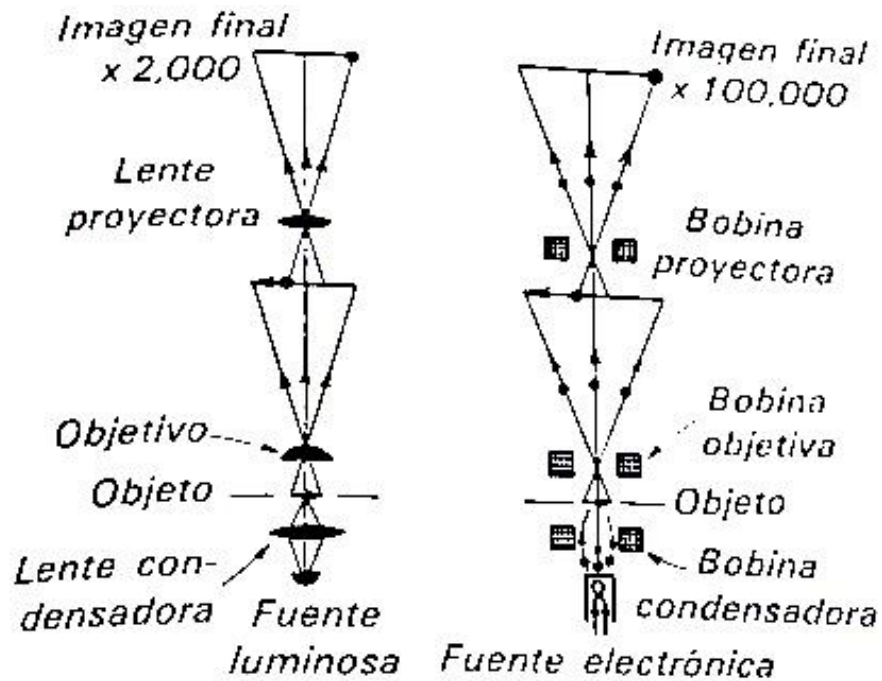


Figura 3.36: Comparación del microscopio óptico con el electrónico. Figura extraída de la referencia [18]

En microscopia electrónica, se utiliza un haz de electrones. Es por ello que es crucial identificar las posibles interacciones existentes entre el haz de electrones y la muestra (Figura 3.37).

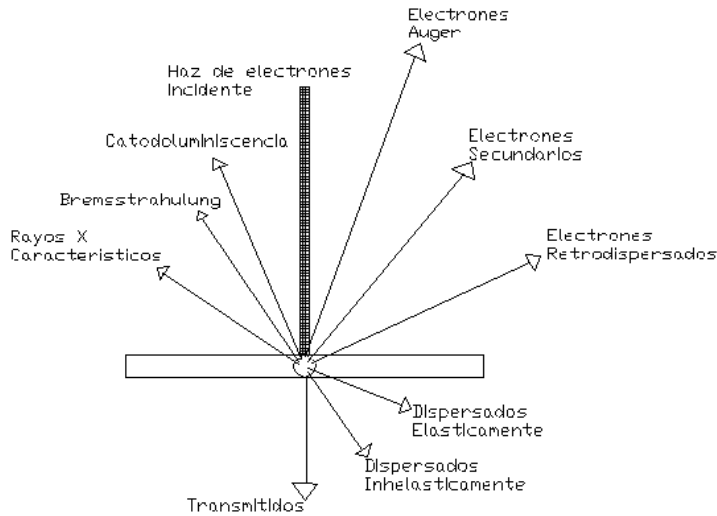


Figura 3.37: Interacción del haz con la muestra.

En la figura 3.38 se muestran las formas de interacción del haz con los electrones.

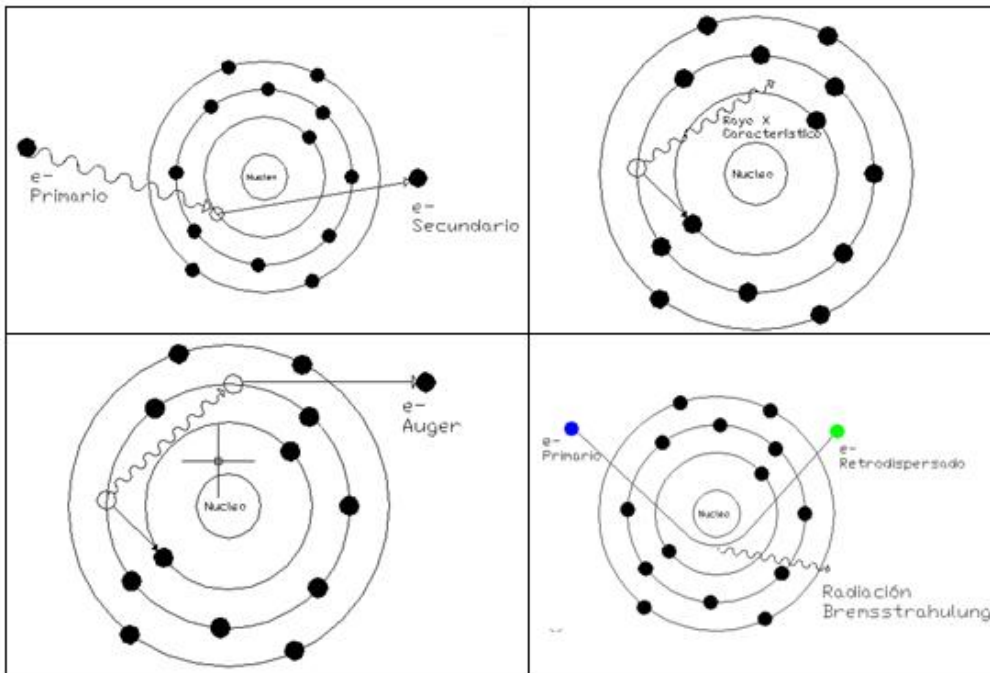


Figura 3.38: Formas de interacción entre los electrones del haz y los electrones que conforman el átomo de las diferentes muestras.

En la tabla 3.3 haremos una breve descripción de cada una de las interacciones electrón/muestra identificadas.

La figura 3.39 muestra un diagrama de la configuración experimental empleada para la toma de imágenes con un MET convencional, en esta, todos los haces tanto transmitidos como difractados que salen de la muestra se combinan para formar una imagen en la pantalla de visualización. Una imagen puede estar formada únicamente con los electrones que pasan a través de un punto en el plano focal posterior. Lo que distingue a los puntos situados en el plano focal posterior es que todos los rayos que entran en un punto dado, han sido dispersados por la muestra en el mismo ángulo.^[17]

Tabla 3.3: Descripción general de cada uno de los nombres, así como el fundamento y aplicación de cada una de las diferentes interacciones electrón muestra.

NOMBRE	FUNDAMENTO	APLICACIÓN
Electrones Secundarios	Son electrones que se desprenden de la muestra al interactuar con un electrón incidente.	Proporcionan información tridimensional de la muestra, principalmente de su superficie.
Rayos X Característicos	Es la energía que se libera al llenar la vacante de un electrón con otro	Da información de la composición de la muestra
Electrones Auger	Un electrón primario arranca un electrón de la capa K, posteriormente un electrón de la capa L llena la vacante desprendiendo energía, esta es transmitida a otro electrón y es desprendido, a este último se le conoce como electrón <i>Auger</i> .	Da información de la composición de la muestra, dado que provienen de RX característicos.
Electrones Retrodispersados	Se producen por la desaceleración del electrón primario incidente, que al sentir la fuerza de atracción del núcleo, este es reflejado.	Informa sobre la composición de la muestra. Dando zonas claras y oscuras, con mayor y menor Z, respectivamente.
Radiación Bremsstrahlung	Al producirse un electrón retrodispersado, se libera un fotón debido a la conservación de la energía, este es llamado Radiación Bremsstrahlung	No proporciona información dado que no interactúa con la muestra.
Transmitidos (No dispersados)	Son electrones que atraviesan la muestra limpiamente sin interactuar con ella. Son inversamente proporcionales al grosor de la muestra.	Dan información del tamaño y morfología de la muestra

Dispersados Elásticamente	Son electrones desviados de su trayectoria original por los átomos de la muestra sin pérdida alguna de energía y posteriormente transmitidos a través de la muestra	En materiales cristalinos dan detalle de la estructura espacial de los átomos de la muestra. Son esenciales para obtener alta resolución
Dispersados Inelásticamente	Son electrones desviados de su trayectoria original por los átomos de la muestra con pérdida de energía, siendo posteriormente transmitidos o bien dispersados. Si son dispersados por segunda vez, forman líneas llamadas de Kikuchi.	Son utilizados en espectroscopia de pérdidas de energía de electrones, que proporcionan información de los elementos presentes en la muestra como la naturaleza de su enlace.

Otros modos de medida de MET empleados en la presente investigación son los siguientes:

Campo Claro: En esta técnica, la imagen se forma a partir del haz transmitido el cual no ha sufrido dispersión, esto se logra colocando una apertura en el plano focal posterior, permitiendo únicamente el acceso a los electrones que no han sido difractados, ver figura (3.40). En consecuencia, la imagen es oscura sobre un fondo brillante.^[14]

Campo Oscuro: En esta técnica son utilizados los electrones dispersados en la formación de la imagen, la cual se logra moviendo una apertura colocada en el plano focal, de tal forma que solo permita la entrada de electrones dispersados, además deberá especificarse la difracción en particular con la que se configura la imagen, ver figura 3.41; a esta técnica se le conoce también como campo oscuro sucio. Sin embargo, existen otra técnica para obtener una imagen de campo oscuro de alta resolución, esto se logra inclinando el haz incidente un ángulo de $2\theta_B$, el cual es el ángulo de difracción o de Bragg, a ésta se le conoce también como “Campo oscuro axial”, la figura 3.42 representa la configuración del microscopio asociada. En ambas imágenes de campo oscuro aparecen las partículas brillantes sobre un campo oscuro.^[17]

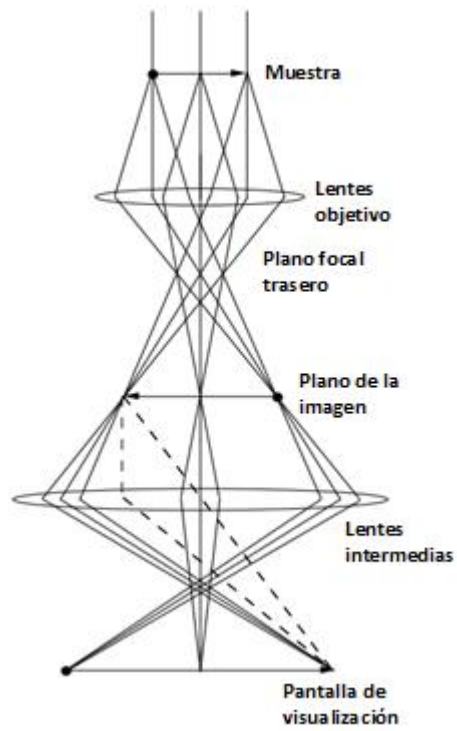


Figura 3.39: Camino de rayos para la formación de imagen.

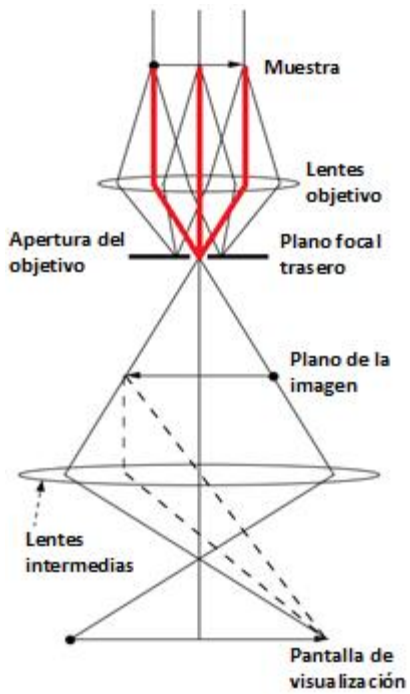


Figura 3.40: Formación de imágenes de campo brillante.

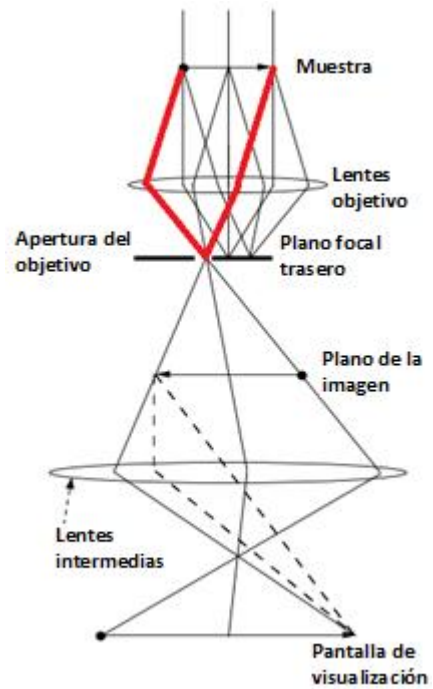


Figura 3.41: Formación de imágenes de campo oscuro.

Difracción de electrones de área selecta (DEAS). La figura 3.43 muestra el diagrama de rayos para la fabricación de un patrón de difracción en MET. En ésta se coloca una segunda abertura, llamada “abertura intermedia”, posicionada en el plano de la imagen de la lente objetivo, para de esta forma confinar un patrón de difracción en un área seleccionada. Sin embargo para llegar a esta técnica, primero examinamos la muestra en modo imagen, hasta encontrar un área de interés, posteriormente se inserta la segunda abertura, situándola sobre el área de interés deseada; esta técnica nos permite conocer varios aspectos importantes, como por ejemplo si el material es un monocristal, policristal o simplemente se trata de un material amorfo.^[17]

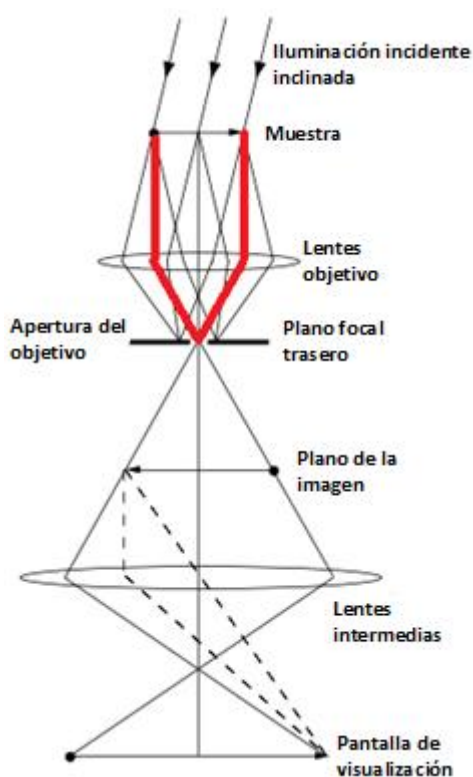


Figura 3.42: Diagrama para obtener un campo oscuro axial.

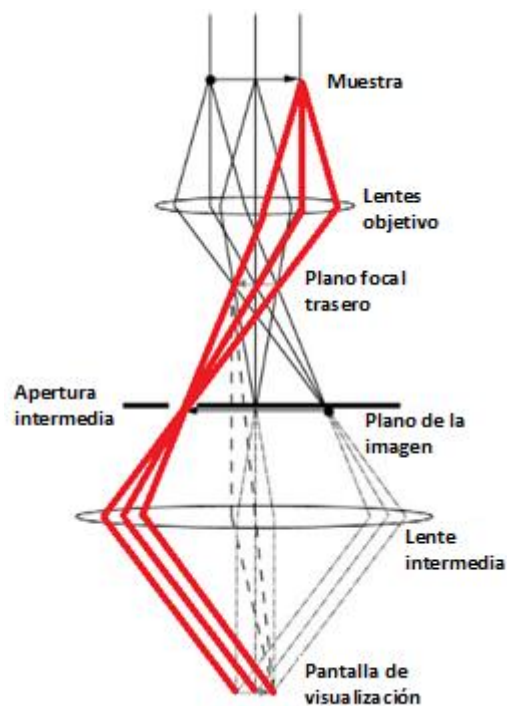


Figura 3.43: Difracción de electrones de área selecta (DEAS).

Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDEX): Esta técnica no pertenece propiamente a la MET, no obstante, muchos microscopios electrónicos de transmisión cuentan con un espectrómetro de EDEX acoplado. Esta técnica utiliza la información obtenida por los rayos X que pueden acceder a la superficie del material desde profundidades elevadas, permitiendo analizar muestras muy pequeñas o bien estudiar áreas pequeñas de muestras mayores. Esta técnica es de mucha importancia en la caracterización de materiales sólidos, permitiendo determinar los elementos presentes de forma cualitativa, pero si queremos saber de forma cuantitativa se necesita un análisis de rayos X emitidos por segundo. El fundamento de esta técnica se resume en la figura 3.44.

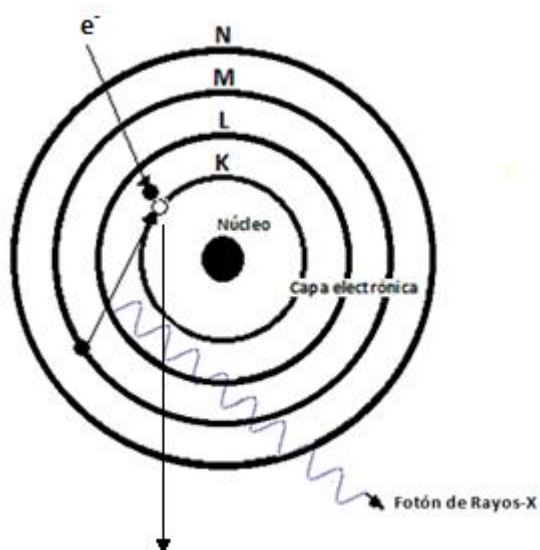


Figura 3.44: Fundamento teórico para la técnica EDEX.

MET de alta resolución (METAR): en esta técnica, la muestra es iluminada mediante un haz paralelo de electrones, los cuales son difractados por los átomos, los cuales forman los haces de Bragg y son propagados en diferentes direcciones. Dicha interacción produce un cambio en la amplitud y la fase. Posteriormente los haces difractados son enfocados en un plano focal posterior formando el patrón de difracción (espacio recíproco). Este espacio está relacionado con el espacio real por medio de la transformada de Fourier para el caso de la difracción de

Fraunhofer. En resumen, una imagen de METAR está formada con la interferencia de los haces de Bragg reflejados.^[14]

3.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS

La actividad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas y estudiadas en esta investigación se probó contra *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Los ensayos de difusión radial (EDR) se realizaron usando una densidad de bacteria de 0.6 unidades de densidad óptica para ambas cepas. Estos ensayos se llevaron a cabo por separado en placas de Petri de 100x15 mm con 20 ml de medio de agar nutriente y se inocularon con cada una de las cepas bacterianas. Se colocó una alícuota de 20 μ l de las suspensiones coloidales acuosas de los nanocompuestos con una concentración de plata de 2 mg/l en el centro de cada placa. Todas las preparaciones se incubaron durante 24h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se midieron las áreas de inhibición del crecimiento para establecer el efecto antibacteriano de las nanoestructuras sintetizadas.

Los ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevaron a cabo mediante diluciones en serie para inhibir el crecimiento visible de microorganismos después de la incubación. Los cultivos se incubaron en placas de 96 pocillos utilizando como medio caldo triptona de soja a 37°C durante 24 horas. Las muestras se probaron contra ambas cepas bacterianas con diluciones de 1:200 a 1:0.15. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se registró la absorbancia de los pocillos a 540 nm con un espectrómetro UV-visible. La concentración mínima para la inhibición del crecimiento se estimó por referencia a cada control positivo de la cepa.

REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 3

- [1] Douglas, S. A., Holler, F. J., & Nieman, T. (2001). Principios de análisis instrumental. Quinta edición, Ed..
- [2] Owen, T. (2000). Fundamentos de la espectroscopia UV-visible moderna (conceptos básicos). *Alemania, Agilent Technologies*.
- [3] Acosta, V., Cowan, C. L., & Graham, B. J. (1975). *Curso de física moderna*.
- [4] Halliday, D., Resnick, R., & Krane, K. S. (1994). *Física: Volumen 2*. Compañía Editorial Continental.
- [5] White, H. E. (1984). *Física moderna* (No. 530 W43Y 1972).
- [6] Pavlov, P. V., & Jojlov, A. F. (1987). *Física del estado sólido*. Rubiños-1860.
- [7] Brown, F. C. (1970). *Física de los sólidos*. Reverté.
- [8] Quiñones M. (2009). *Difracción de rayos x 1: un enfoque experimental*. Universidad Nacional del Callao. Perú
- [9] Peña, M. D., & Muntaner, A. R. (1980). *Química física*. Editorial Alhambra.
- [10] Wade, L. G. (2011). Química Orgánica (vol. 1 y 2). *Editorial Pearson*.
- [11] Rubinson, K. A., & Rubinson, J. F. (2000). *Análisis instrumental*. Pearson educación, SA.
- [12] Pérez, J. L., Murillo, R., & Gómez, R. (2005). Espectroscopia Infrarroja y Raman. *línea*. <http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/EsRaman.pdf>. Consultado el, 4.
- [13] Tejeda Martínez, A., & Gómez Azpeitia, G. (2015). *Prontuario solar de México*.
- [14] Ramos, J. C., Luna, A. E. V., & Lima, C. M. O. (2005). Espectroscopia Raman y sus aplicaciones. *spectroscopy*, 36, 1059-1067.
- [15] Cano, V. G., & Márquez, J. O. (2014). *Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones*.
- [16] Gómez Osuna, L. (2011). *Aplicación de la espectroscopia Raman al estudio analítico de fármacos*.
- [17] Goodhew, P. J., Humphreys, R. and Beanland R. *Electron Microscopy and Analysis*, Taylor & Francis Inc, London and New York, 3rd edn, 2001.
- [18] White, H. E. (1984). *Física moderna* (No. 530 W43Y 1972).

CAPÍTULO 4

Resultados y Discusión

4.1 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BACTERICIDA MEJORADA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ULTRAFINAS EMBEBIDAS EN MATRICES NANOSCÓPICAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

4.1.1 Resumen

En esta primera parte de este capítulo se introduce un método sencillo de síntesis de matrices nanoscópicas de ácido ascórbico que embeben y estabilizan núcleos nanoscópicos cristalinos de plata, uniformes en tamaño, con un diámetro de 3.3 ± 1.5 nm. El procedimiento de preparación consiste en la reducción de iones Ag^+ procedentes de la solución de nitrato de plata en agua mediante soluciones acuosas de ácido ascórbico con concentraciones superiores a las exploradas en otros estudios, y que fueron previamente calentadas a 70°C . Los nanocompuestos resultantes muestran una morfología alargada con longitudes de 120 a 200 nm, y anchos entre 30 y 70 nm, presentando núcleos nanoscópicos de plata metálica en su interior. Las propiedades morfológicas, microestructurales y espectroscópicas del material nanoestructurado obtenido se investigaron mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X y espectroscopias infrarroja y UV-visible. Por otra parte, se encontró que este material muestra una actividad antimicrobiana mejorada contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

4.1.2 Método de síntesis empleado

En primer lugar, se disolvieron 2.115 g de ácido ascórbico en 30 ml de agua doblemente destilada con agitación a 70°C durante 1 hora. Posteriormente, la solución resultante se mezcló con 30 ml de una solución acuosa de nitrato de plata (0.04 M) a 70°C . La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 30 minutos antes de enfriarse a temperatura ambiente. Después, la mezcla se centrifugó y se filtró varias veces para eliminar el exceso de ácido ascórbico y agregados de

partículas más grandes. Estos procesos de purificación y selección de tamaño dieron un rendimiento de síntesis final de aproximadamente 10%. Este rendimiento fue calculado como la relación del contenido de plata en la muestra final, determinado por espectrofotometría de absorción atómica, y la cantidad de plata empleada en la síntesis.

4.1.3 Estudios morfológicos y microestructurales

Las propiedades morfológicas, composicionales y microestructurales de las muestras obtenidas empleando ácido ascórbico (vitamina C) se estudiaron mediante diversas técnicas asociadas a la microscopía electrónica de transmisión.

Las imágenes de MET de campo brillante (figuras 4.1a y 4.1b), y de campo oscuro (figura 4.1c), ambas de bajos aumentos, revelan que las muestras están formadas por estructuras nanoscópicas constituidas por una matriz orgánica, presumiblemente de ácido ascórbico, que embebe a nanopartículas inorgánicas muy finas y uniformes, la mayoría con diámetros menores que 5 nm. En las imágenes de MET de campo brillante (figuras 4.1a y 4.1b), las nanopartículas inorgánicas aparecen como manchas o puntos oscuros, mientras que las matrices de ácido ascórbico, que tienen una baja absorción de electrones, aparecen como manchas de color gris ligeramente más oscuro que la tonalidad del fondo de la imagen, la cual es debida al carbón que recubre a la rejilla de cobre. En las imágenes de MET de campo oscuro, los dominios difusos de color gris claro representan las matrices de ácido ascórbico que embeben a las nanopartículas cristalinas que aparecen como puntos brillantes. A partir de estas imágenes se observa claramente que los nanocompuestos presentan una morfología alargada con longitudes de 120 a 200 nm, y anchos de 30 a 70 nm.

Las figuras 4.1d-i son imágenes de MET convencional de altos aumentos de los nanocompuestos donde se observa claramente que éstos contienen pequeños núcleos o partículas. La medición del diámetro de más de 100 nanopartículas permitió estimar el diámetro medio y la desviación estándar obteniendo 3.3 ± 1.5 nm. La figura 4.2 muestra la distribución de tamaños obtenida haciendo análisis estadísticos de estas mediciones, también se representa la

distribución acumulativa asociada. La distribución de tamaños se ajustó a una función tipo log-normal dada por la siguiente expresión:

$$f(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi\omega x}} e^{-\frac{\ln^2(x/x_c)}{2\omega^2}} \quad (4.1)$$

donde A es una constante de normalización y x_c y ω son el valor central y la desviación estándar log-normal, respectivamente. Los valores obtenidos en el mejor ajuste fueron $d_m = 3.2 \pm 0.2 \text{ nm}$ y $\omega = 0.41 \pm 0.6$, con un parámetro de corrección $R^2 = 0.91847$.

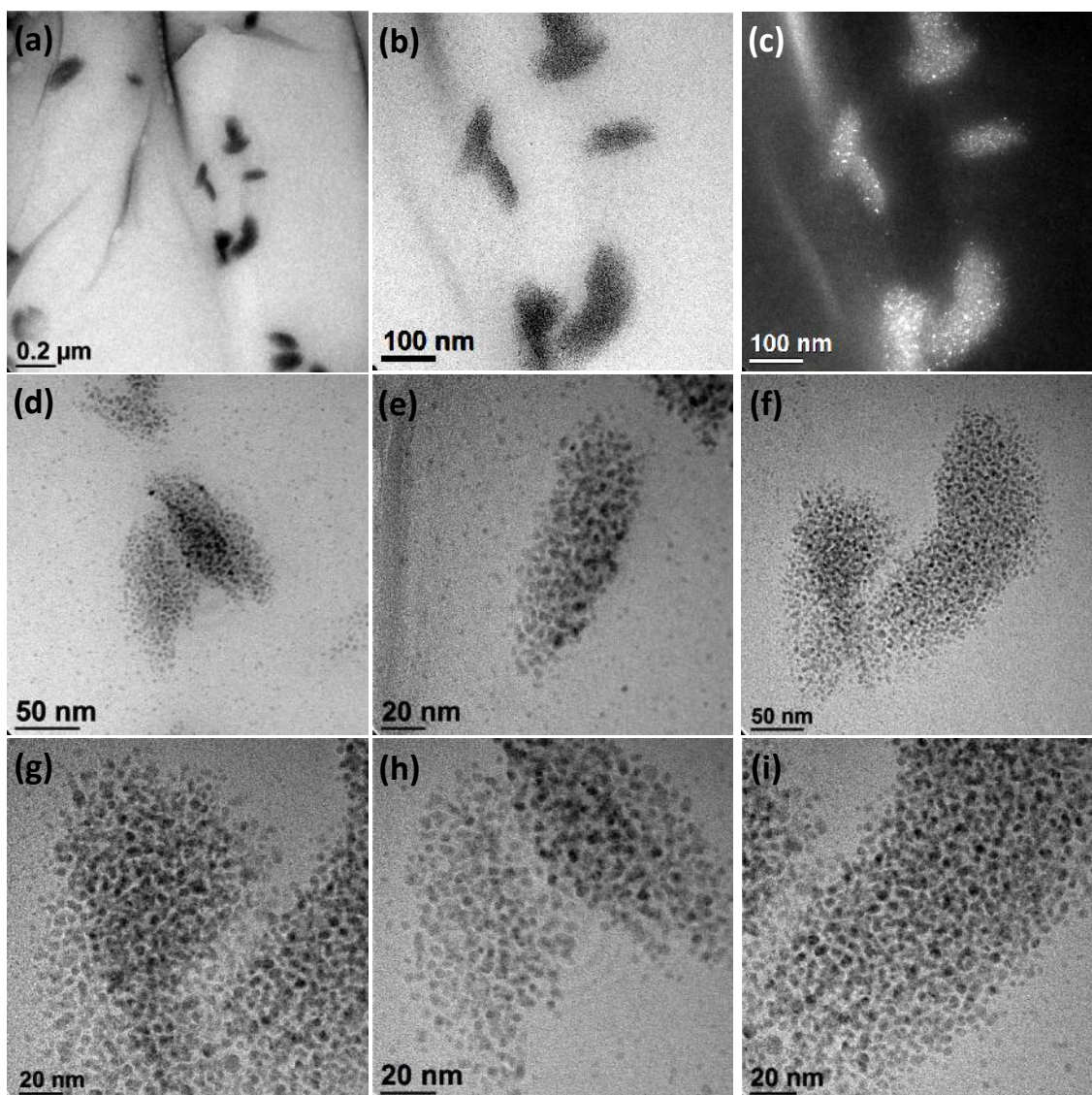


Figura 4.1: a) y b) Imágenes de MET de campo brillante de bajos aumentos. c) Imagen de MET de campo oscuro de bajos aumentos. d)-i) Imágenes de MET convencional de altos aumentos.

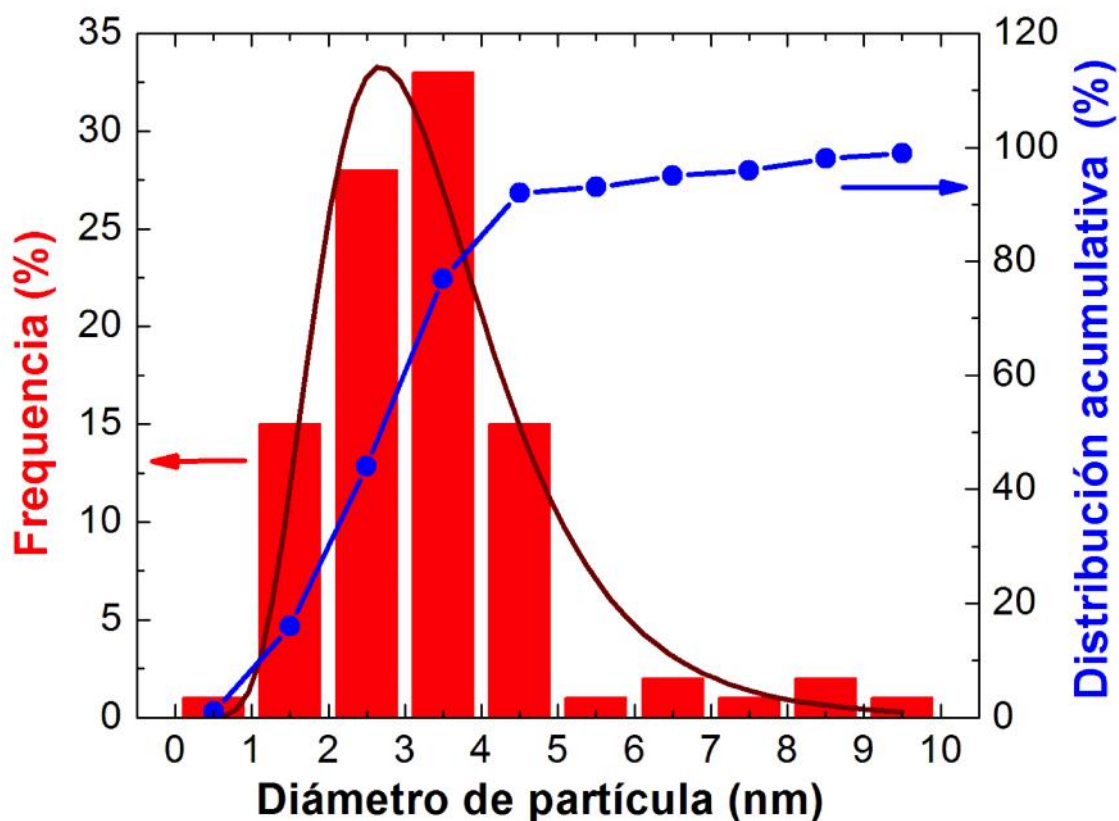


Figura 4.2: Distribución de tamaños de los núcleos de plata encontrados dentro de las matrices de ácido ascórbico. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa.

El espectro EDEX (figura 4.3) confirma que el producto final está constituido principalmente por plata debido a los nanocristales observados en las imágenes MET. También se detecta la presencia de C y O debido a la presencia del ácido ascórbico (aunque el pico de C observado podría provenir parcialmente del carbono que recubre a la rejilla MET empleada como substrato). La presencia esperada de H contenido en la vitamina C no se detecta debido a las limitaciones de esta técnica para detectar los elementos de la tabla periódica más ligeros. El pico observado asociado a la presencia de Cu se debe al cobre de la rejilla MET.

Además, se detecta una traza de Si, la cual atribuimos tentativamente a una pequeña cantidad de Si adsorbida, proveniente del material de vidrio de los recipientes empleados durante la síntesis.

Las imágenes MET de alta resolución (figuras 4.4.a y 4.4.b) confirmaron que las nanopartículas inorgánicas embebidas en las matrices orgánicas son nanocristales de plata. En concreto, se observan en estas imágenes franjas asociadas a planos cristalográficos cuyo espaciado reticular corresponde a la estructura cúbica centrada en las caras (ccc) de la plata metálica ^[1]. La figura 4.4.c muestra un patrón de difracción de electrones de la muestra formada por nanocristales de plata ultrafinos embebidos en ácido ascórbico. Los anillos de difracción observados se pueden indexar como reflexiones de los planos cristalográficos (111), (200), (220) y (311) de la plata metálica ccc, respectivamente.

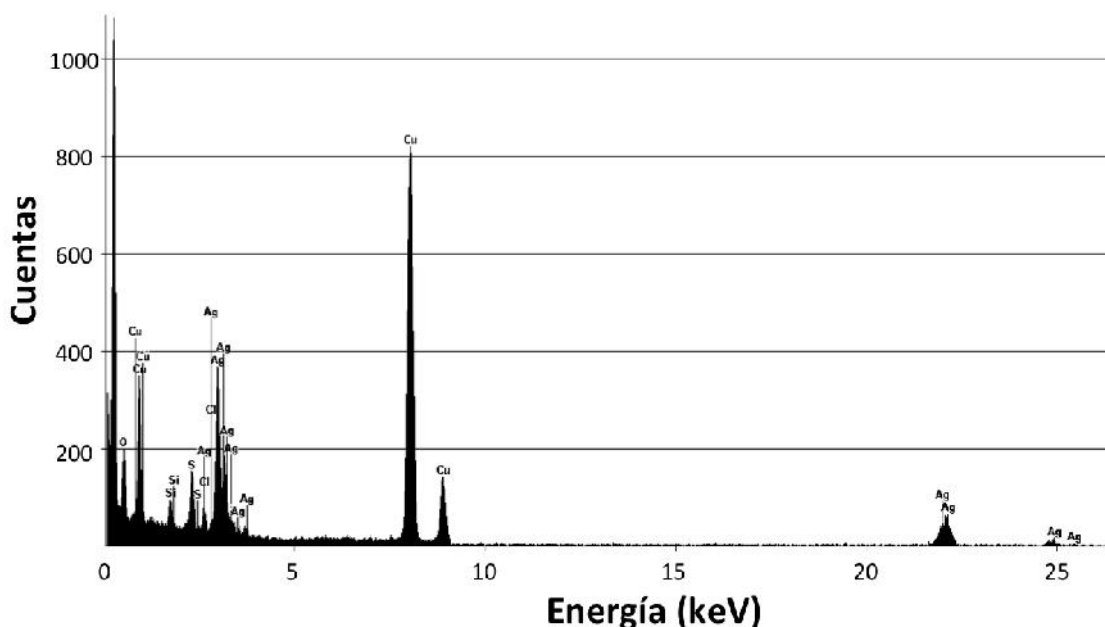


Figura 4.3: Espectro EDEX de las nanoestructuras de plata / vitamina C.

La figura 4.5 muestra el patrón de difracción de rayos X obtenido para las nanoestructuras de plata/vitamina C. En este patrón se observan claramente dos picos de difracción notablemente anchos. El pico más intenso, observado a

ángulos 2θ comprendidos entre 10° y 27.3° , es debido al sustrato de vidrio empleado en las medidas. El segundo pico observado a ángulos 2θ comprendidos entre 30° y 44° está asociado, en acuerdo con las observaciones en las imágenes MET de alta resolución y los patrones de difracción de electrones, a la difracción de los planos cristalográficos $\{111\}$ de la plata metálica (estructura cúbica centrada en las caras, grupo espacial $Fm\bar{3}m$, JCPDS fichero No. 04-0783). El ancho de este pico es consistente con el tamaño ultrafino de los núcleos de plata. El tamaño de cristal a lo largo de la dirección $[111]$ estimado empleando la ecuación de Scherrer es de 0.7 ± 0.2 nm.

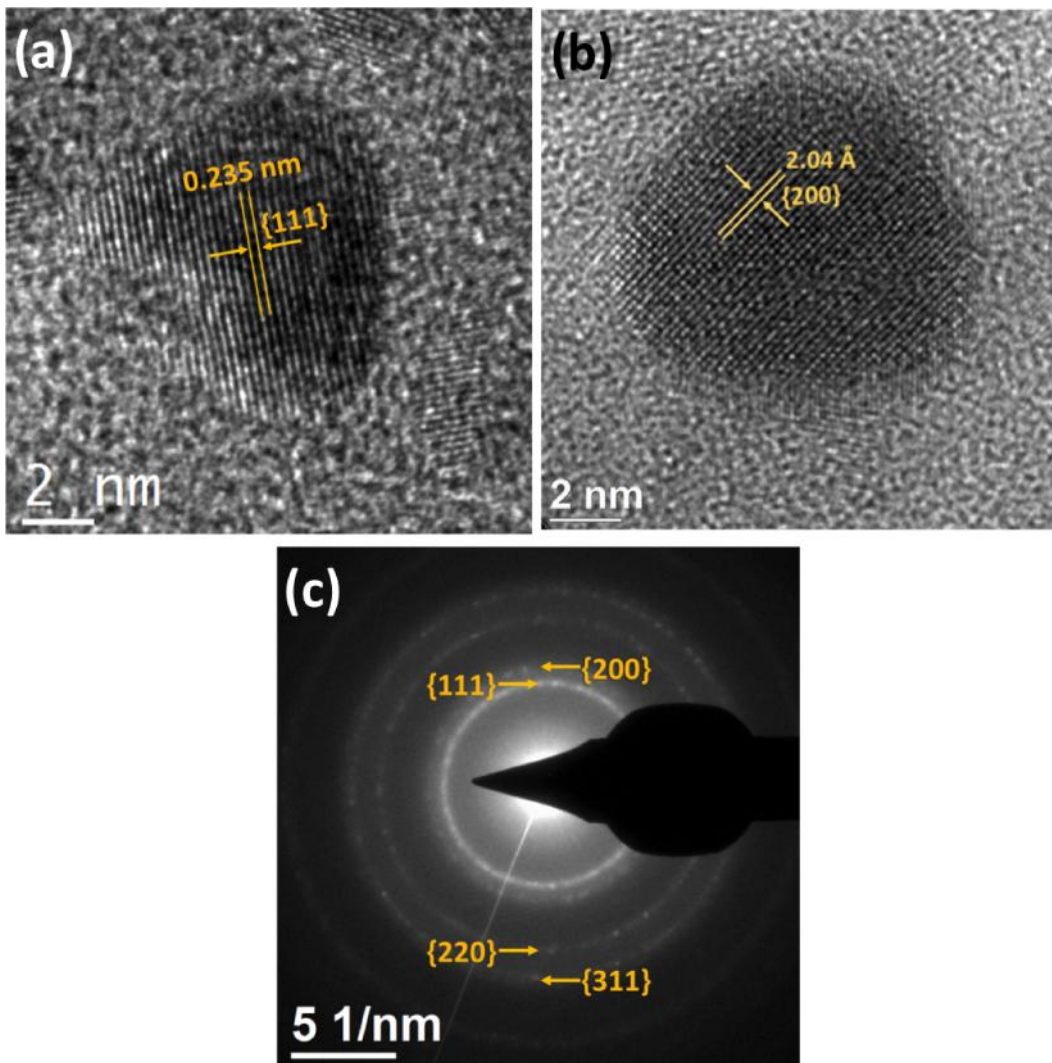


Figura 4.4: a) y b) Imágenes de microscopía electrónica de alta resolución de núcleos cristalinos de plata embebidos en vitamina C. **XXXXXXXXXX** c) Patrón de difracción de electrones de área selecta.

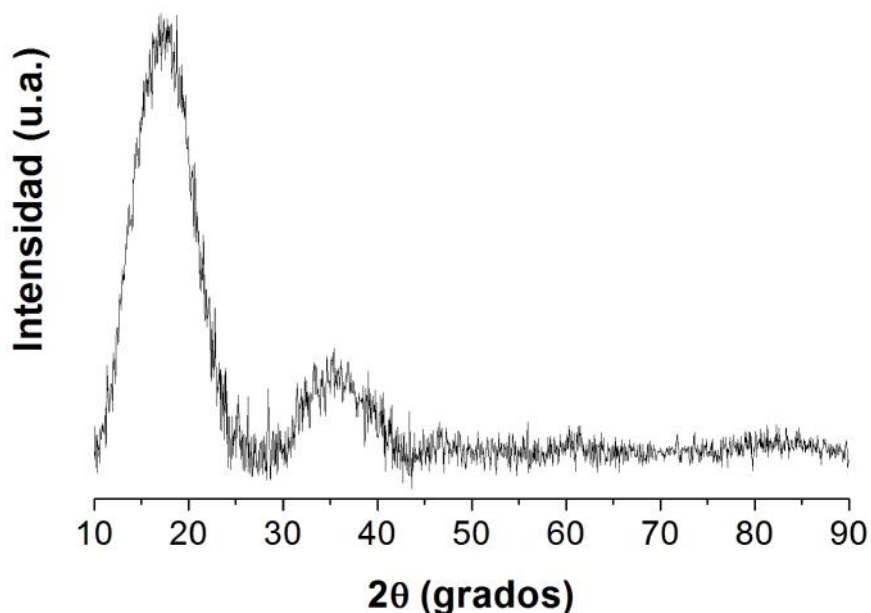


Figura 4.5: Patrón de difracción de rayos X de las nanoestructuras plata/ácido ascórbico.

4.1.4 Propiedades ópticas

La figura 4.6 muestra el espectro UV-visible de la suspensión coloidal de nanoestructuras de Ag/ácido ascórbico en agua junto al espectro UV-visible del ácido ascórbico puro (disuelto en agua). En ambos espectros se observa una fuerte absorción en el rango UV. En el espectro de las nanoestructuras híbridas no se observa claramente una banda de extinción debido a la excitación dipolar de plasmón característica de las partículas nanométricas de plata ^[2,3]. La aparente ausencia de esta banda de plasmones se debe a la pequeña absorción de los núcleos de plata debido a su tamaño ultrafino. Para ilustrar este comportamiento, en la figura 4.7.a se presentan las secciones eficaces de extinción calculadas mediante la teoría de Mie de partículas esféricas de plata de diferentes tamaños, embebidas en agua, en función de la longitud de onda. En la figura 4.7.b se grafica la evolución del máximo de la sección eficaz de las curvas anteriores en función del tamaño de partícula. Se observa que la sección eficaz de extinción, y por tanto la absorbancia de las partículas de plata de pocos nanómetros, es varios órdenes

de magnitud menor que la correspondiente a partículas con diámetros mayores a 10 nm.

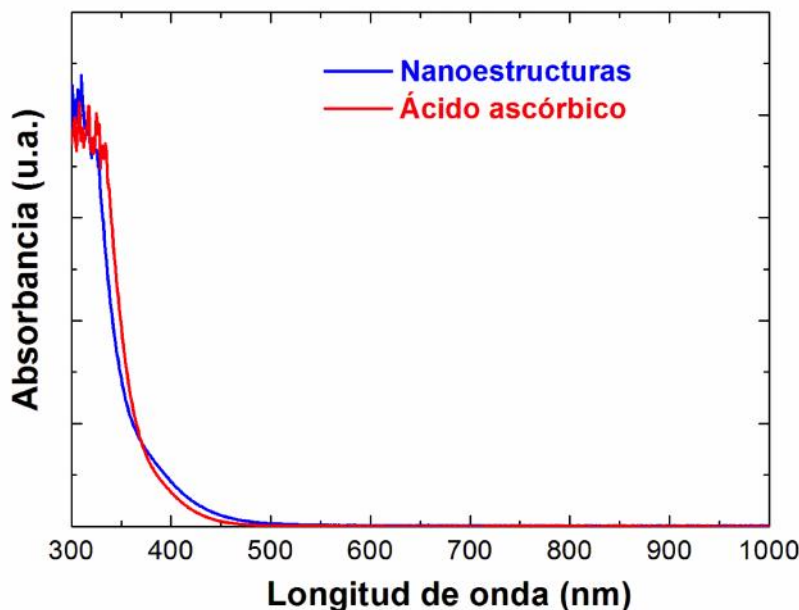


Figura 4.6: Espectros UV-visible de ácido ascórbico puro disuelto en agua bidestilada y de suspensiones de nanoestructuras de Ag/ácido ascórbico en agua.

Las pequeñas variaciones entre los espectros mostrados en la figura 4.6 podrían atribuirse a una pequeña absorción de luz debido a la presencia de núcleos de Ag. Para corroborar esta hipótesis, se substrajo al espectro de las nanoestructuras de plata/ácido ascórbico el espectro obtenido para el ácido ascórbico puro, obteniendo el espectro mostrado en la figura 4.7 (curva roja). Se observa una banda de extinción cuyo máximo coincide con el simulado empleando la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas con un diámetro de 3.3 nm. No obstante, el ancho y forma de este pico difiere del esperado por la teoría de Mie, siendo más ancho y asimétrico. También se simuló el espectro mediante la teoría de Mie considerando partículas de plata esféricas no interactuantes con una distribución de tamaños igual a la observada para los núcleos de plata determinada mediante microscopía electrónica de transmisión (figura 4.8). Este espectro presenta un pico de extinción cuya forma, máximo y ancho coincide con el estimado para nanopartículas de diámetro 3.3 nm, por lo que las diferencias

observadas con el espectro de los núcleos de plata no se deben a su distribución de tamaños, si no que se atribuyen a desviaciones de la forma esférica y a interacciones entre los campos ópticos de las nanopartículas no considerados en las simulaciones, además de las propias limitaciones de la teoría de Mie.

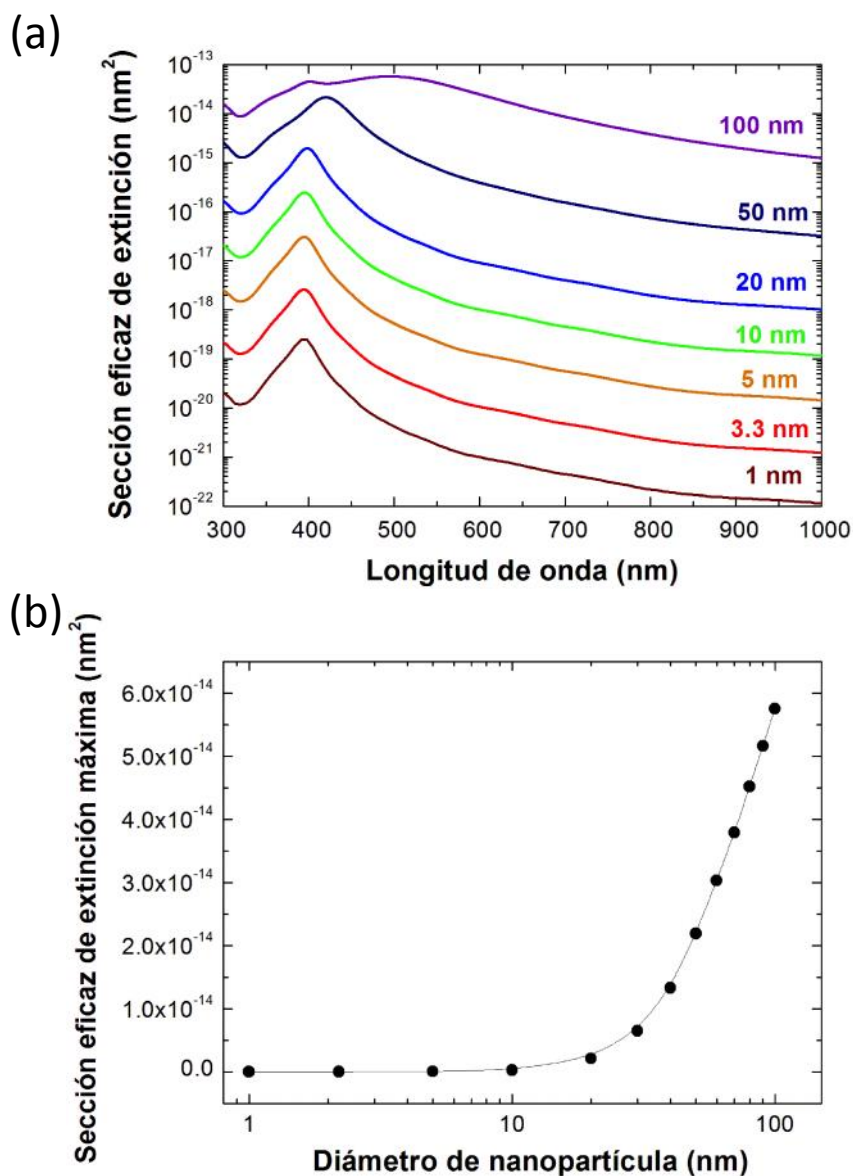


Figura 4.7: a) Valores calculados mediante la teoría de Mie de las secciones eficaces de extinción de nanopartículas de plata esféricas en agua (índice de refracción $n=1.333$), como funciones de la longitud de onda de la radiación incidente y el diámetro de partícula. b) Evolución del máximo de la sección eficaz de extinción de nanopartículas de plata esféricas en agua con el diámetro de la partícula.

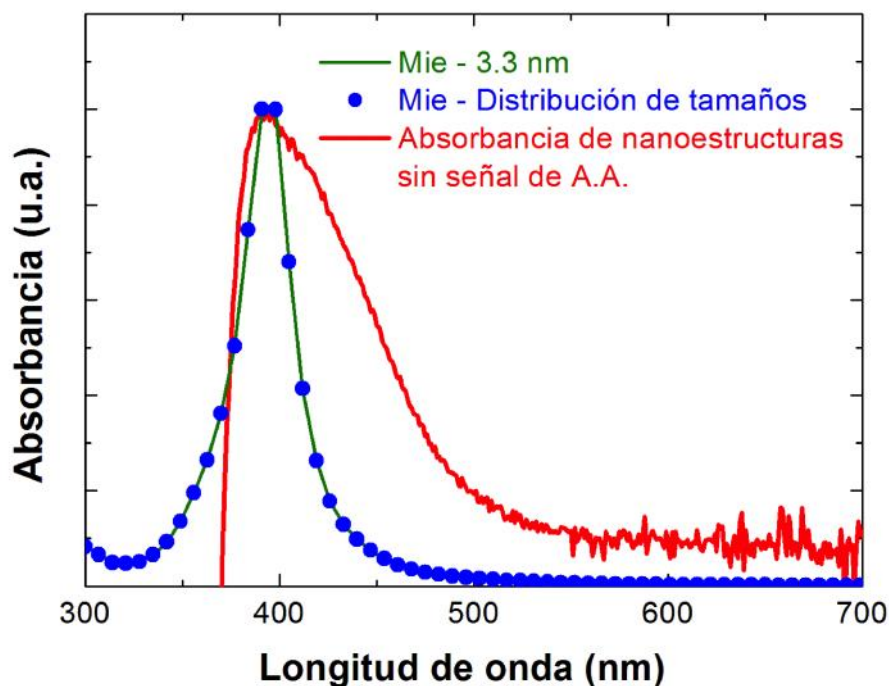


Figura 4.8: Espectro UV-visible obtenido al substrar al espectro de las nanoestructuras de plata/ácido ascórbico la absorbancia medida para el ácido ascórbico puro. Se compara este espectro con los espectros simulados aplicando la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas de diámetro de 3.3 nm en agua y para partículas de plata (no interactuantes) esféricas considerando la distribución de diámetros de la figura 4.2.

4.1.5. Espectroscopia infrarroja

El espectro infrarrojo obtenido para las estructuras híbridas de plata/ácido ascórbico, mostrado en la figura 4.9, presenta bandas de absorción características del ácido ascórbico ligeramente desplazadas. Este espectro puede compararse con el espectro del ácido ascórbico reportado en la referencia [4], el cual se presenta en la figura 4.10.a, así como las bandas y asignaciones reportadas en la referencia [5], resumidas en la figura 4.10.b. La banda de absorción intensa y ancha que se extiende en el rango de número de ondas de 3750 cm^{-1} a 2750 cm^{-1} es característica de la vibración del estiramiento del grupo OH. El pico alrededor de 2953 cm^{-1} se puede asignar a vibraciones de estiramiento CH. La banda intensa con un máximo a 1751 cm^{-1} corresponde al modo de vibración de estiramiento de C=O en el anillo de lactona [5]. La contribución a 1628 cm^{-1} podría

deberse a las vibraciones de estiramiento C=C, y los máximos a 1399 cm^{-1} y 1341 cm^{-1} se asocian a las vibraciones de flexión de CH_2 y C-O-H. Las vibraciones C-O-C y C-O-H producen picos poco intensos observados en el rango desde 1134 cm^{-1} hasta 1046 cm^{-1} . Estas bandas aparecen desplazadas con respecto a los picos de absorción reportados para el ácido ascórbico libre ^[4,5], lo que confirma que las moléculas de ácido ascórbico están ligadas a los núcleos de plata.

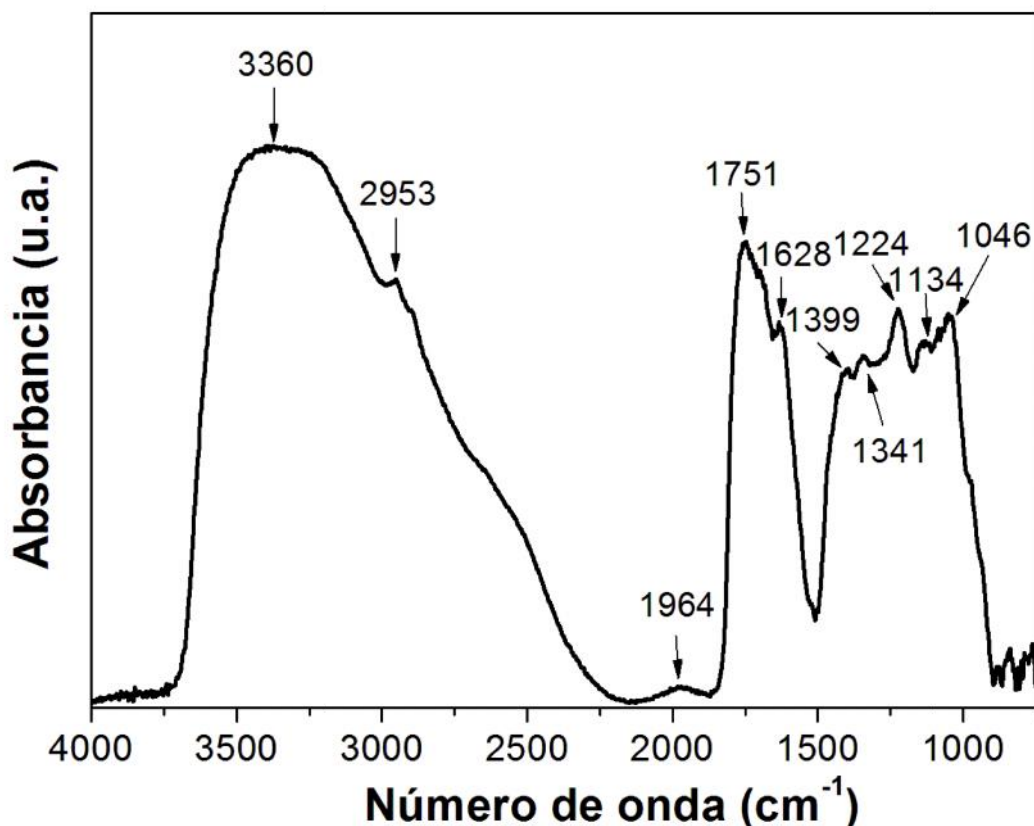


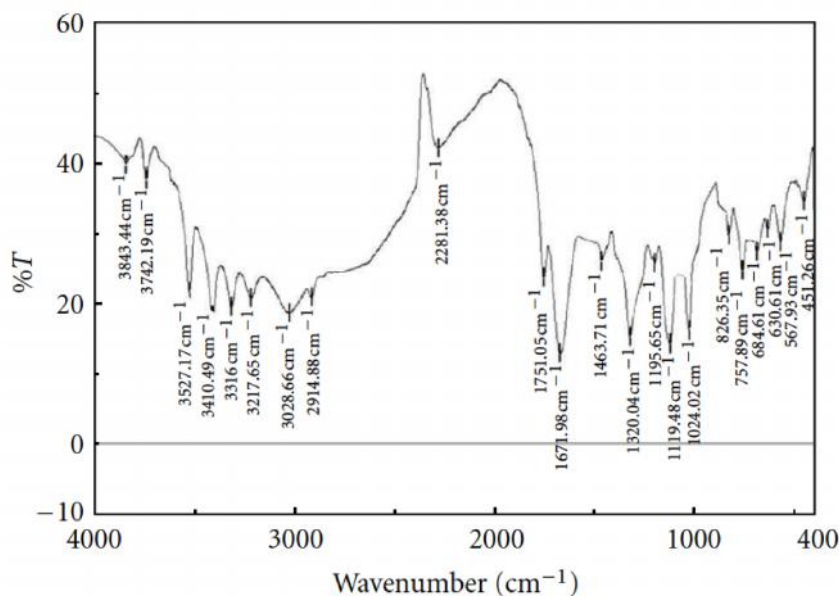
Figura 4.9: Espectro infrarrojo de las nanoestructuras de plata/ácido ascórbico.

4.1.6. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos revelaron que las nanopartículas de Ag ultrafinas embebidas en matrices nanoscópicas de ácido ascórbico exhiben una actividad antimicrobiana mejorada tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Las figuras 4.10.a y 4.10.b son fotografías tomadas de los ensayos de

difusión radial. Estas imágenes muestran claramente zonas de inhibición que indican una actividad bactericida significativa de las nanoestructuras contra ambos tipos de bacterias.

(a)



(b)

Table 1
Spectral data^a (cm⁻¹) and band assignments

IR	Raman	SERS	Assignments
3626 s, 3410 s, 3315 s, 3216 s			OH stretching
3030 sbr, 2917 m, 2907 m	3004 w, 2919 s, 2879 wsh	3144 s, 2949 m	CH stretching
1764 s	1758 w	1788 s	C=O stretching
1675 vvs	1661 vvs	1684 vs	C=C ring stretching
1487 m, 1468 w	1484 m		CH bending
1463 w	1452 w		CH bending, CH ₂ scissoring
1389 m, 1364 m	1371 w	1386 vvs	CH ₂ wagging, C—O—H bending
1322 s	1323 s		CH bending (wagging)
1277 s			C—O—C stretching
1246 m	1258 s	1268 s	C—O—H bending (twisting)
1222 s, 1199 s	1193 w		C—C(=O)—O stretching
1142 vs, 1121 vs, 1113 vs	1113 s		C—O—C stretching
1077 m, 1055 m, 1046 m	1081 w, 1048 m		C—O—C stretching and C—O—H bending
1027 vvs			C—O—H bending
990 s	984 w	960 m	C—H and O—H bending
871 w, 821 m	871 m, 823 m	872 m	C—C ring stretching
757 s, 722 w	742 sh	782 m	OH out-of-plane deformation
686 w	693 m, 621 s, 581 w, 564 m	562 s	OH out-of-plane deformation/C—C ring stretching
	468 w, 452 w	455 s	C—O in-plane deformation
		149 s	Ag · · O stretching

^a v, very; w, weak; m, medium; s, strong; sh, shoulder; b, broad.

Figura 4.10: a) Espectro infrarrojo del ácido ascórbico reportado en la referencia [4]. b) Tabla reportada en la referencia [5], con los datos espectrales correspondientes a la espectroscopia infrarroja, Raman y SERS correspondientes al ácido ascórbico.

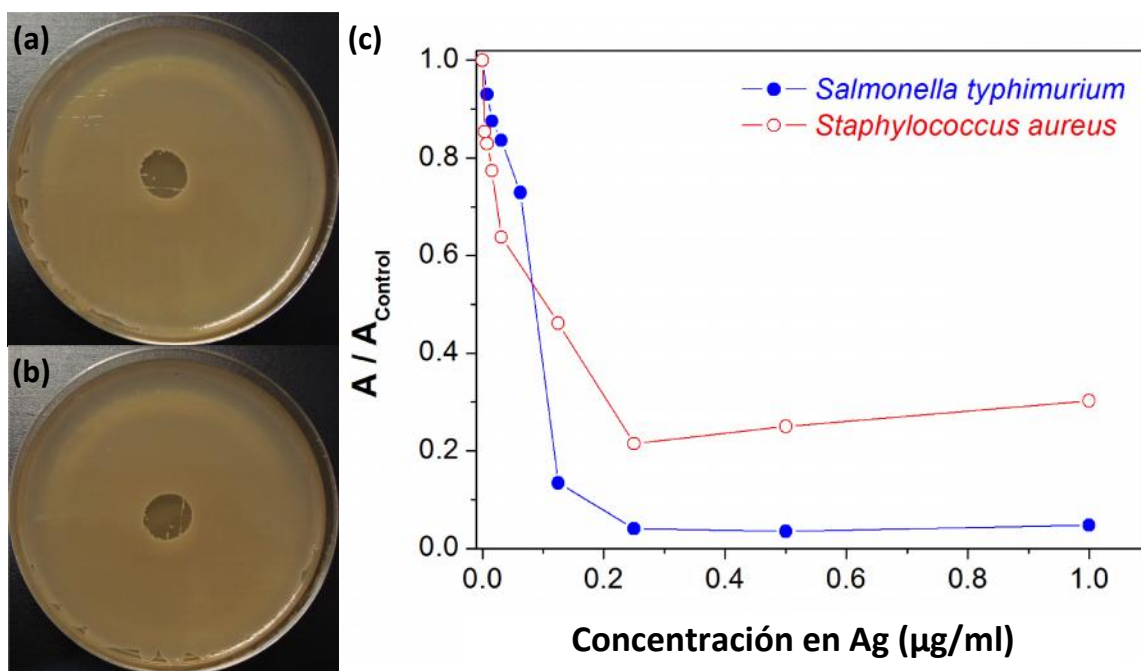


Figura 4.11: Fotografías de (a) *S. typhimurium* y (b) *S. aureus* incubadas en placas de agar durante 24h a 37 °C en presencia de una alícuota de 20 μl del coloide de las nanopartículas de Ag ultrafinas embebidas en ácido ascórbico, con una concentración de plata de 2 mg /l. c) Relación entre los valores de absorbancia del pocillo de cultivo incubado y el control de cepa positiva en experimentos llevados a cabo con *S. typhimurium* y *S. aureus*, respectivamente, en función del contenido de plata presente en el pocillo de cultivo.

Con el fin de determinar las CMI de plata en forma de nanopartículas ultrafinas contra *S. typhimurium* y *S. aureus*, se registró la absorbancia, A , de los pocillos de cultivo incubados obtenida a una longitud de onda de 540 nm en función de la cantidad de plata en forma de nanoestructuras inyectada en los experimentos. Estos valores de absorbancia se muestran en relación con la absorción de la cepa de control positivo, A_{control} , en la figura 4.10.c. En esta figura se observa que la relación A/A_{control} disminuye rápidamente para contenidos de plata de décimas de $\mu\text{g/ml}$. De hecho, de acuerdo con estas mediciones UV-visibles, la viabilidad celular tanto de *S. typhimurium* y *S. aureus* disminuye hasta alcanzar aproximadamente el 4% y el 21%, respectivamente, para

concentraciones de Ag de 0.25 g/ml. Estos resultados implican valores de CIM más bajos que los encontrados en la literatura para nanopartículas de Ag [6-8]. Estos valores bajos se deben al tamaño extremadamente reducido de los núcleos de Ag que los hace más reactivos, interactuando con las bacterias a través de diversos mecanismos antimicrobianos, que podrían incluir el suministro de iones de plata, ruptura de la pared celular, interacción con proteínas celulares, inhibición de la actividad mitocondrial y daño del ADN [9]. El hecho de que los valores de CMI del ácido ascórbico contra bacterias [10] es alrededor de dos a tres órdenes de magnitud mayor que los valores típicos encontrados para las nanopartículas de Ag [6-8], sugiere que los bajos valores encontrados en esta investigación podrían ser debidos a procesos de sinergia entre las actividades antimicrobianas de las nanopartículas de Ag ultrafinas y la matriz de ácido ascórbico.

4.2 SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD BACTERICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS USANDO FITOQUÍMICOS DE SEMILLAS DE CHÍA COMO AGENTE REDUCTOR Y ESTABILIZANTE

4.2.1 Introducción

La semilla de *Salvia hispánica L.* conocida comúnmente como *chía* es una planta herbácea que pertenece a la familia *Lamiaceae*.^[11] Actualmente es consumida ampliamente por sus diversos beneficios en la salud, especialmente en el mantenimiento de niveles saludables de lípidos en el suero.^[12] Dicha semilla presenta buena fuente de proteína (25.32 % en peso), aceite (30.22 % en peso) y fibra dietética total (37.50 % en peso) predominando la fibra insoluble (35.07 % en peso) ^[11]. Por otra parte autores como Segura - Campos ^[13] reportan contenidos de proteínas (15 -25%), grasas (30 - 33%), carbohidratos (26 - 41%), fibra dietética (18 - 30%) y cenizas (4 - 5%).^[12,13]

Actualmente la semilla de chía ha sido investigada debido a su alto contenido de aceite con reportes que varían de entre el 25%^[14] y el 39%^[13,14], del cual la mayor proporción es debido al ácido α -*Linoleico* (Omega - 3) con un valor del 68%, seguido del ácido *Linoleico* (Omega - 6) con un valor del 20%, dichos valores representan la mayor proporción en comparación con otras fuentes conocidas a la fecha (2014).^[13] Ambos ácidos grasos son requeridos por el cuerpo humano para mantener una buena salud y no pueden ser sintetizados artificialmente.^[12]

Debido a la amplia investigación generada actualmente sobre esta semilla, así como la ausencia de reportes en la literatura como agente reductor de nanopartículas (al momento de iniciar la investigación) y el hecho de ser una planta endémica de México, han sido los motivantes principales para la realización de síntesis de nanopartículas de plata con extractos de *Salvia hispánica* (chía), mismas que respondieron de manera muy satisfactoria.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en la síntesis de nanopartículas basadas en plata mediadas por extractos de *Salvia hispánica* (chía), así como el estudio de su composición, las propiedades microestructurales, espectroscópicas y bactericidas de nanopartículas sintetizadas mediante la reducción de iones de plata a su estado metálico empleando extractos de semillas de *Salvia hispánica* L. (chía). Los estudios microestructurales y morfológicos mostraron que las muestras resultantes están constituidas por una mezcla de nanopartículas de Ag y AgCl que tienden a coalescer cuando se depositan sobre un sustrato. Las caracterizaciones mediante espectroscopias infrarroja y Raman revelaron que estas partículas están recubiertas por metabolitos de las semillas de chía, principalmente proteínas y polifenoles. Los espectros UV-visible mostraron bandas de extinción asociadas a excitaciones plasmónicas dipolares. Adicionalmente, ensayos biológicos mostraron que estas partículas son agentes antimicrobianos potentes.

4.2.2 Método de síntesis empleado

i) Preparación de los extractos de semillas de chía.

Las semillas de chía se limpiaron con agua bidestilada y se secaron a 40 °C. Después, se molieron con un mortero. 20 g de la biomasa purificada y molida se mezclaron con 100 ml de agua bidestilada. Después la mezcla se agitó con un agitador mecánico y se calentó a 95°C durante 4 horas con una parrilla de calentamiento. Posteriormente, se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, dejándola en reposo durante 12 h. Después se añadieron 100 ml de etanol. Después de agitar la mezcla durante 30 minutos, los residuos sólidos se eliminaron mediante centrifugación y filtración. El extracto resultante se usó directamente en la síntesis de las nanoestructuras de plata.

ii) Preparación de las nanopartículas de plata.

Se realizaron dos síntesis diferentes por triplicado. En primer lugar, se vertieron 10 ml de extracto de Salvia hispánica en 10 ml de una solución acuosa de nitrato de plata (AgNO_3 , Sigma-Aldrich Co., 99+%) con concentraciones de 0.1 M o 5 mM bajo agitación vigorosa y a temperatura ambiente. El medio de reacción se volvió de color marrón oscuro en pocos minutos después de realizar la mezcla, lo que indica la formación de pequeñas partículas. Para asegurar la finalización de la reacción se dejó la mezcla total en agitación durante 30 minutos. Las partículas en forma de polvo se recuperaron por centrifugación y se redispersaron en agua. Las muestras finales se denominaron S-0.1M y S-5mM, respectivamente.

4.2.3 Caracterización de la microestructura, tamaño y morfología de las nanopartículas sintetizadas con metabolitos de chía

La figura 4.12 muestra los patrones de difracción de rayos X obtenidos para las muestras S-0.1M y S-5mM. Para ambas muestras se observan picos ubicados en valores de 2θ cercanos a 38.1°, 44.3°, 64.4°, 77.5° y 81°, los cuales están asociados a los planos cristalográficos {111}, {200}, {220}, {311} y {222} de la

estructura cúbica centrada en las caras (ccc) de la plata metálica (grupo espacial Fm3m, JCPDS fichero No. 04-0783). También se observan picos adicionales a ángulos 2θ de 27.7° , 32.1° , 46.1° , 54.8° and 57.4° que se ajustan a las posiciones correspondientes de la fase ccc del cloruro de plata (grupo espacial Fm3m, JCPDS fichero No. 31-1238). Por otra parte cabe destacar que la relación entre las intensidades relativas de los picos de la fase de AgCl con respecto a los picos de la fase de Ag difiere en los patrones DRX de las dos muestras siendo mayores en la muestra S-0.1M que en la muestra S-5mM, indicando que la presencia relativa de los cristales de AgCl es mayor a medida que se emplea más nitrato de plata en la síntesis de las nanopartículas en relación con la concentración del extracto de semillas de chía. De este modo, la relación de las intensidades de los picos más intensos de las dos fases ($I_{200,AgCl} / I_{111,Ag}$), es significativamente mayor en la muestra S-0.1M (35.8%) que en la muestra S-5mM (8.2%), indicando que la formación de los cristales de AgCl es mayor a medida que se emplea más nitrato de plata en la síntesis de las nanopartículas en relación a la concentración del extracto de semillas de chía. También se observa en ambas muestras que el pico de difracción (111) de los cristales de plata metálica es más intenso en comparación con los demás picos de la misma fase que lo esperado para una muestra puramente policristalina de plata (JCPDS fichero No. 04-0783). De este modo, la relación de intensidades $I_{200,Ag} / I_{111,Ag}$ es de 24.8% y 15.7% para las muestras S-5mM y S-0.1M, respectivamente, mientras que la relación para una muestra puramente policristalina es 40%, ver figura 4.12. Esta observación indica que las nanopartículas de plata sintetizadas presentan una textura cristalina con tendencia a presentar facetas {111}, cayendo preferentemente estos planos paralelos al substrato del portamuestras.

El ángulo de Bragg, θ_B , y el ancho de pico, β , de varios de los picos de difracción de ambas muestras fueron determinados haciendo ajustes a funciones lorentzianas, tal como se mencionó en el capítulo 3. Los datos de los ajustes se presentan en la tabla 4.1 y en las figuras 4.13 y 4.14.

El tamaño de cristalito en la dirección [200] de la fase AgCl estimado utilizando la ecuación de Scherrer es de 10.5 ± 0.1 nm y 20.7 ± 0.1 nm para las muestras S-5mM y S-0.1M, respectivamente, mientras que el tamaño en

diferentes direcciones de los cristalitas de plata no fueron muy diferentes en las dos muestras, siendo cercano a 15 nm en su mayoría.

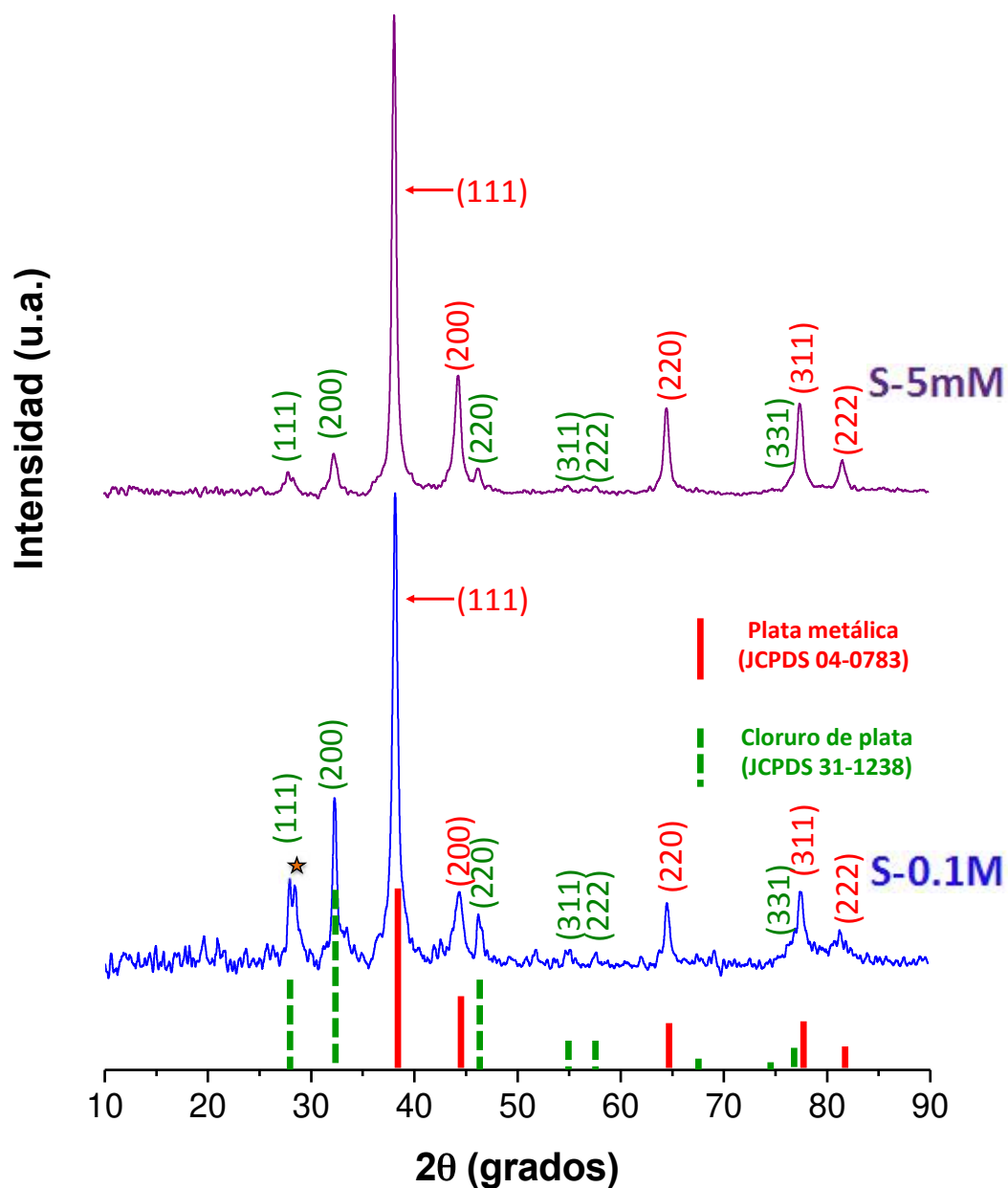


Figura 4.12. Patrones de DRX de las muestras S-5mM y S-0.1M. También se indican las posiciones e intensidades relativas de los picos (hkl) correspondientes a las fases de plata metálica (JCPDS 04-0783) y cloruro de plata (JCPDS 31-1238).

Los parámetros de red calculados a partir de la posición de los picos de difracción son $5.539 \pm 0.001 \text{ \AA}$ y $4.085 \pm 0.001 \text{ \AA}$ para las fases de AgCl y Ag en la muestra S-5mM y $5.539 \pm 0.001 \text{ \AA}$ y $4.082 \pm 0.001 \text{ \AA}$ en la muestra S-0.1M, respectivamente (ver tabla 4.1). En el caso de los parámetros de red de la plata se ha considerado el valor promedio de los valores obtenidos para varios picos de difracción. Estos valores junto a las distancias interplanares d_{hkl} calculadas (tabla 4.1) son próximos a los reportados en las fichas JCPDS 31-1238 y 04-0783, respectivamente.

Tabla 4.1. Datos obtenidos a partir del análisis de los patrones de difracción de rayos X de las muestras S-5mM y S-0.1M: θ_B es el ángulo de Bragg asociado a los picos (hkl), β es el ancho del pico (hkl), d_{hkl} es la distancia interplanar asociada a los planos {hkl}, L_{hkl} es el tamaño de cristal en la dirección [hkl].

Muestra	Fase	Reflexión (hkl)	θ_B (°)	β (°)	d_{hkl} (Å)	L_{hkl} (nm)	A (Å)
S-5mM	AgCl	(200)	16.15±0.01	0.79±0.03	2.77±0.03	10.5±0.1	5.539±0.001
	Ag	(111)	19.06±0.001	0.479±0.009	2.36±0.01	17.6±0.1	4.086±0.001
		(200)	22.154±0.002	0.70±0.02	2.04±0.03	12.2±0.1	4.085±0.001
		(220)	32.261±0.002	0.59±0.01	1.44±0.03	15.9±0.1	4.082±0.001
		(311)	38.726±0.002	0.69±0.01	1.23±0.03	14.7 ±0.1	4.084±0.001
S-0.1M	AgCl	(200)	16.148±0.003	0.40±0.02	2.77±0.03	20.7±0.1	5.539±0.001
	Ag	(111)	19.084±0.001	0.56±0.05	2.36±0.01	15.0±0.1	4.081±0.001
		(200)	22.171±0.005	1.01±0.07	2.04±0.03	8.5±0.1	4.082±0.001
		(220)	32.300±0.003	0.58±0.03	1.44±0.03	16.2±0.1	4.077±0.001
		(311)	38.79±0.01	0.74±0.04	1.23±0.03	13.8±0.1	4.078±0.001

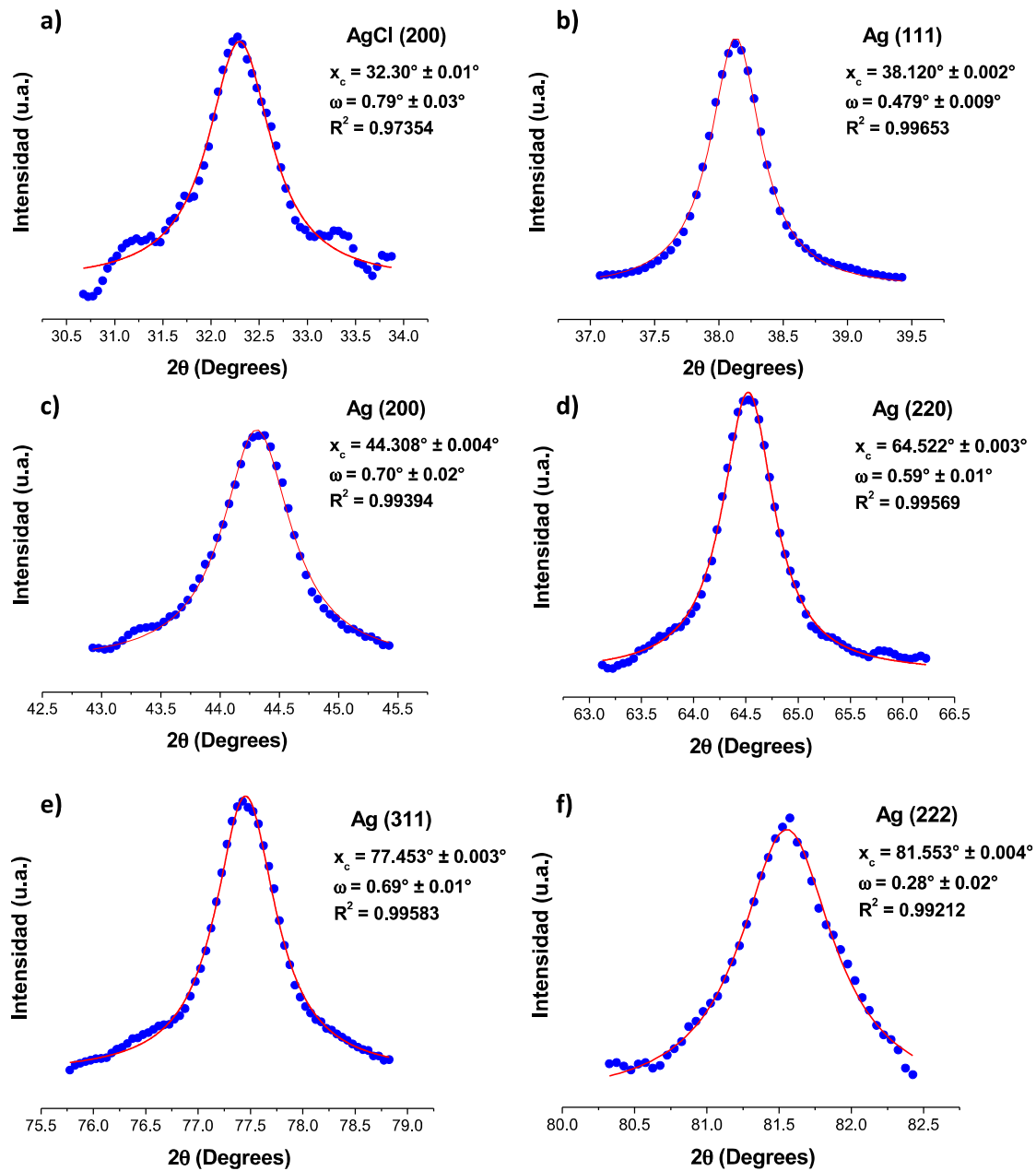


Figura 4.13. Ajustes de varios picos de difracción de la muestra S-5mM a funciones lorentzianas:

a) $(200)_{AgCl}$, b) $(111)_{Ag}$, c) $(200)_{Ag}$, d) $(220)_{Ag}$, e) $(311)_{Ag}$ y f) $(222)_{Ag}$.

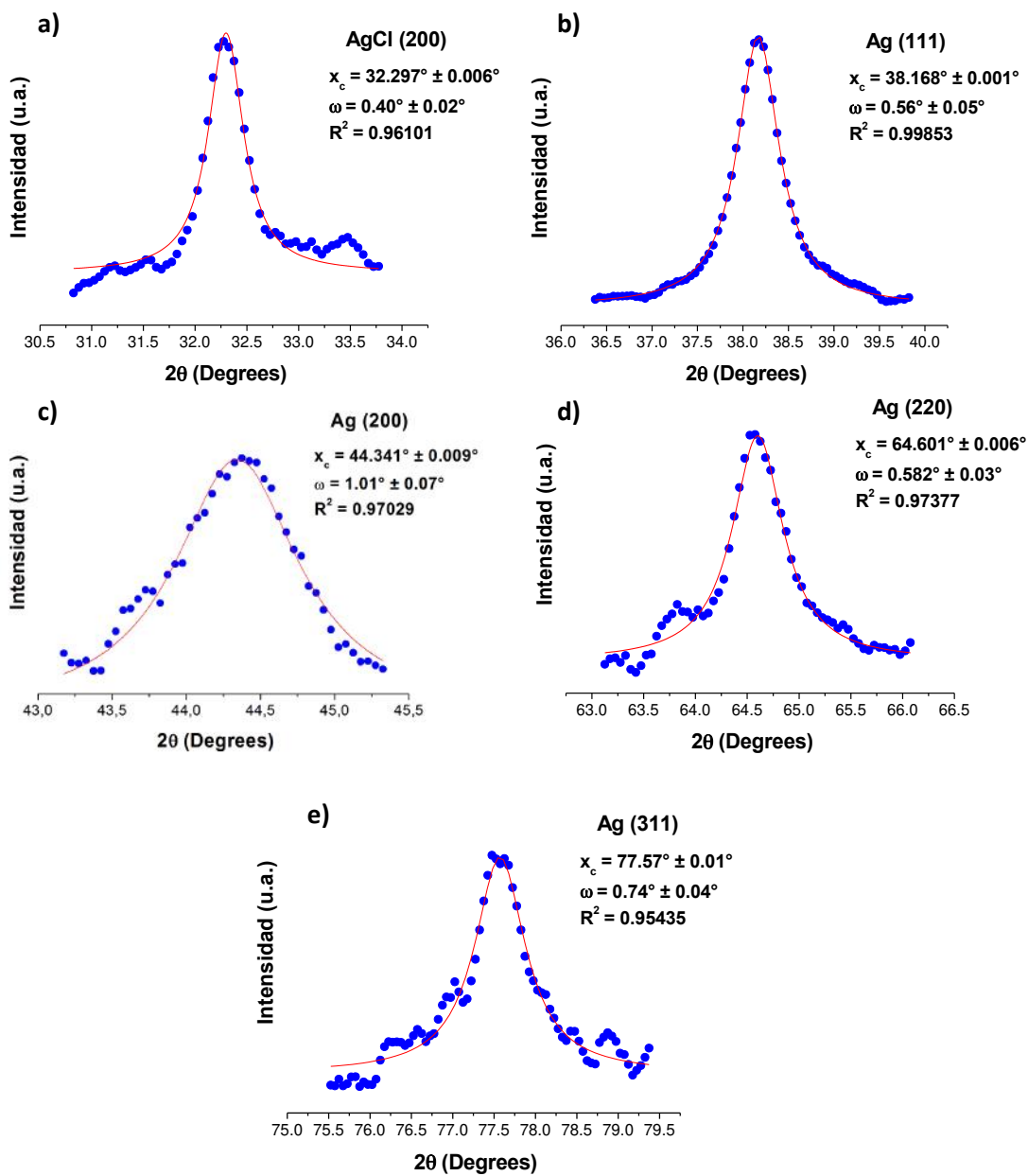


Figura 4.14. Ajustes de varios picos de difracción de la muestra S-0.1M a funciones lorentzianas: a) (200)_{AgCl}, b) (111)_{Ag}, c) (200)_{Ag}, d) (220)_{Ag} y e) (311)_{Ag}.

La figura 4.15 muestra estudios obtenidos por MET correspondientes a la muestra obtenida con extracto de chía y 5 mM de AgNO_3 (muestra S-5mM). En las micrografías (figuras 4.15 a-c) se observa la presencia de nanopartículas muy finas con diámetros entre 0.5 nm y 12 nm. También se observan partículas de diámetros cercanos a 25 nm con una presencia minoritaria. La figura 4.15e presenta la distribución de tamaños obtenida mediante la estadística de mediciones de más de 100 partículas, así como la distribución acumulativa asociada. La distribución de tamaños se ajustó a una función tipo log-normal (curva roja) obteniendo un valor central y una desviación estándar log-normal iguales a $d_m = 6.2 \pm 0.4 \text{ nm}$ y $\omega = 0.37 \pm 0.06$, respectivamente, con un parámetro de corrección $R^2 = 0.85907$. Esta distribución de tamaños tuvo un mejor ajuste considerando dos distribuciones gaussianas (curva verde) centradas en $d_{m1} = 5.9 \pm 0.2 \text{ nm}$ y $d_{m2} = 26 \pm 9 \text{ nm}$ con desviaciones estándar $\sigma_1 = 4.5 \pm 0.4 \text{ nm}$ y $\sigma_2 = 3.0 \pm 0.5 \text{ nm}$, respectivamente, con un parámetro de corrección $R^2 = 0.9483$.

Es interesante destacar que las partículas mayores de 3 nm mostraron una morfología irregular y que en varias zonas de la rejilla MET aparecen con una morfología anisotrópica que parece obedecer a la orientación que las partículas encuentran durante la evaporación del solvente después de su deposición sobre la rejilla de cobre recubierta de carbón. La presencia de nanopartículas muy finas, con diámetros menores o iguales a pocos nanómetros, junto a partículas mayores de pocos nanómetros, y la peculiar forma de las partículas más grandes podría explicarse asumiendo que las partículas crecen mediante crecimientos cristalinos secundarios, concretamente por coalescencia, y que este proceso es favorecido al depositar el coloide sobre la rejilla: la evaporación del solvente hace que la densidad de partículas aumente, así como la probabilidad del contacto entre partículas y su subsiguiente coalescencia.

La figura 4.15d es un patrón típico de DEAS de varias nanopartículas de la muestra S-5mM. Los puntos de difracción observados pueden atribuirse a reflexiones provenientes de los planos (111), (200), (220), (311) and (222) de la

plata metálica (JCPDS fichero No. 04-0783) y los planos (111), (200), (220), (311), (222), (400) y (331) de la fase ccc del cloruro de plata (grupo espacial Fm3m, JCPDS fichero No. 31-1238), en acuerdo con los resultados de DRX (figura 4.12).

La figura 4.16 muestra los resultados de la caracterización de la muestra S-0.1M realizada con MET. Las imágenes de las figuras 4.16a y b evidencian que la muestra está formada principalmente por nanopartículas polidispersas. Interesantemente, también se ha detectado la formación de estructura dendríticas (figura 4.16) formadas a partir de la agregación de partículas sobre los lazos de carbón de la rejilla MET. Esto confirma la gran tendencia a agregarse y coalescer de estas partículas durante el proceso de deposición de una gota del coloide en la rejilla MET, y su siguiente evaporación. Los patrones DEAS de esta muestra, al igual que los de la muestra S-5mM, presentan puntos de difracción asociados a la presencia de las fases cristalinas de Ag y AgCl.

Las imágenes de MET de alta resolución revelaron que la mayoría de las partículas menores de 20 nm son monocristalinas, mientras que las más grandes son usualmente policristalinas. A modo de ilustración, en la figura 4.17 se presenta el caso de dos nanopartículas monocristalinas de plata. En las micrografías de alta resolución (fig. 4.17a y c) se observan franjas con espaciados que corresponden a las distancias interplanares de la plata. Las transformadas rápidas de Fourier asociadas a estas imágenes (fig. 4.17b y d) presentan patrones de puntos que se pueden indexar a los ejes de zona [110] y [001], respectivamente.

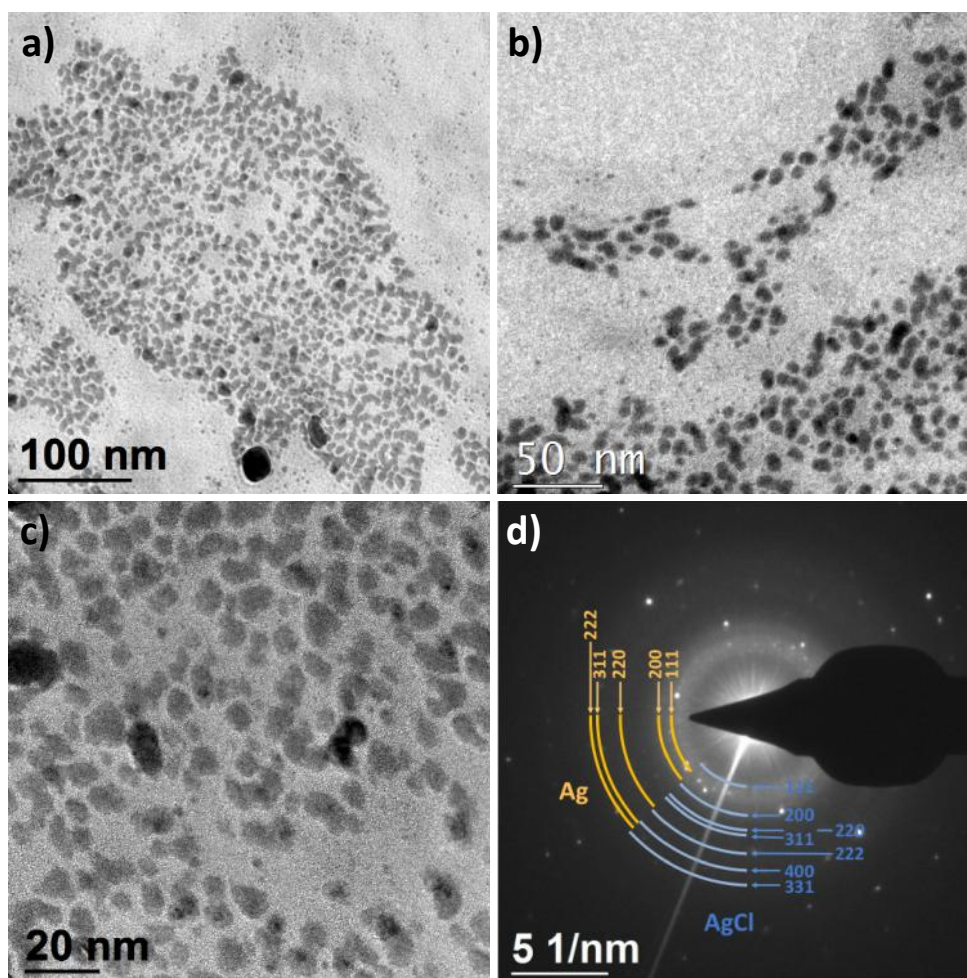


Figura 4.15. Caracterizaciones de la muestra S-5mM realizadas con electrones: a), b) y c) son imágenes MET. d) Patrón de DEAS de la misma muestra. e) Distribución de tamaños. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa. La curva verde muestra un mejor ajuste considerando dos distribuciones gaussianas.

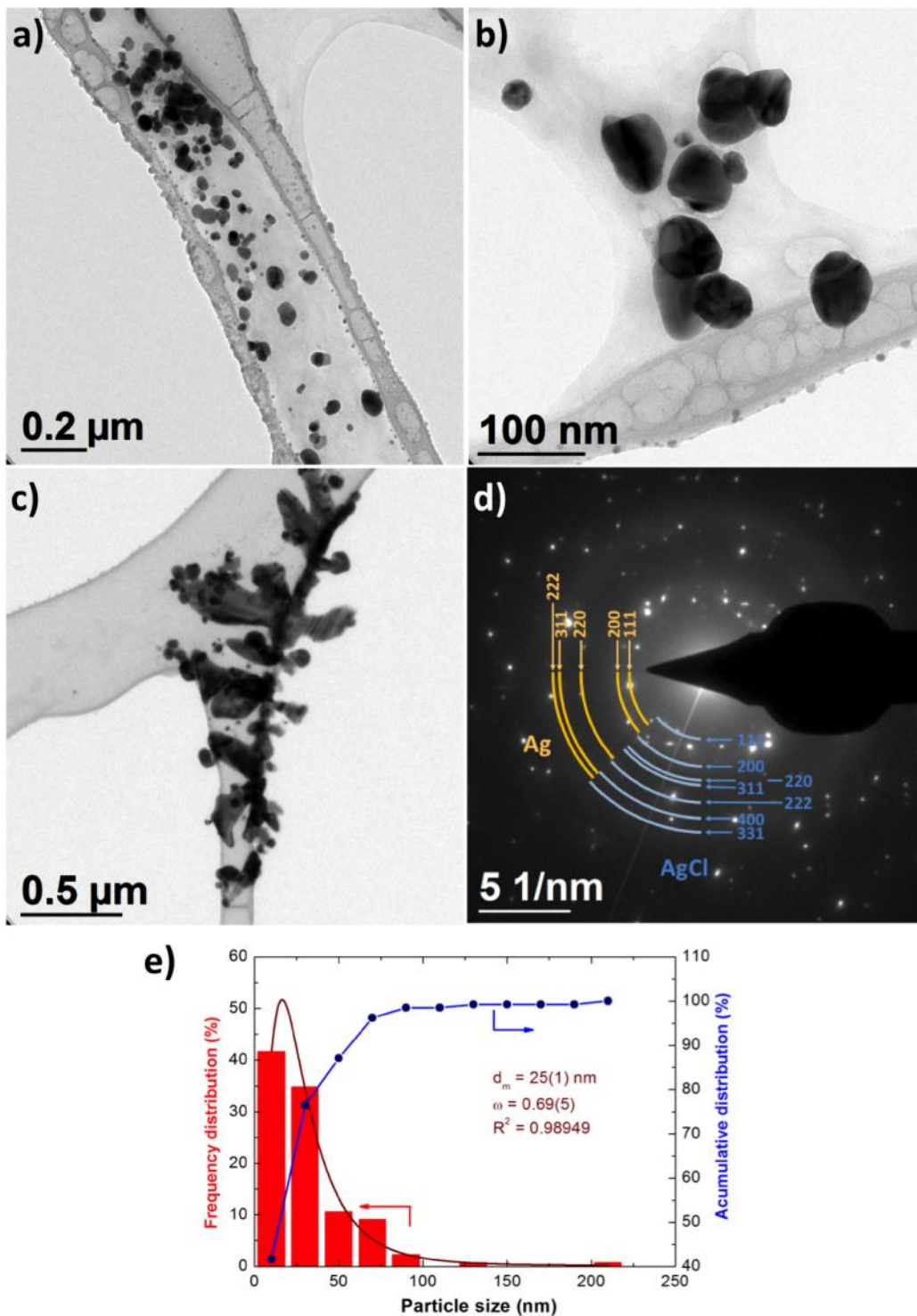


Figura 4.16. Caracterizaciones de la muestra S-0.1M realizadas con electrones: a), b) y c) son imágenes MET. d) Patrón de DEAS de la misma muestra. e) Distribución de tamaños. La curva roja corresponde al mejor ajuste de la distribución de tamaños a una función tipo log-normal dada por la ecuación (4.1). La curva azul corresponde a la distribución acumulativa.

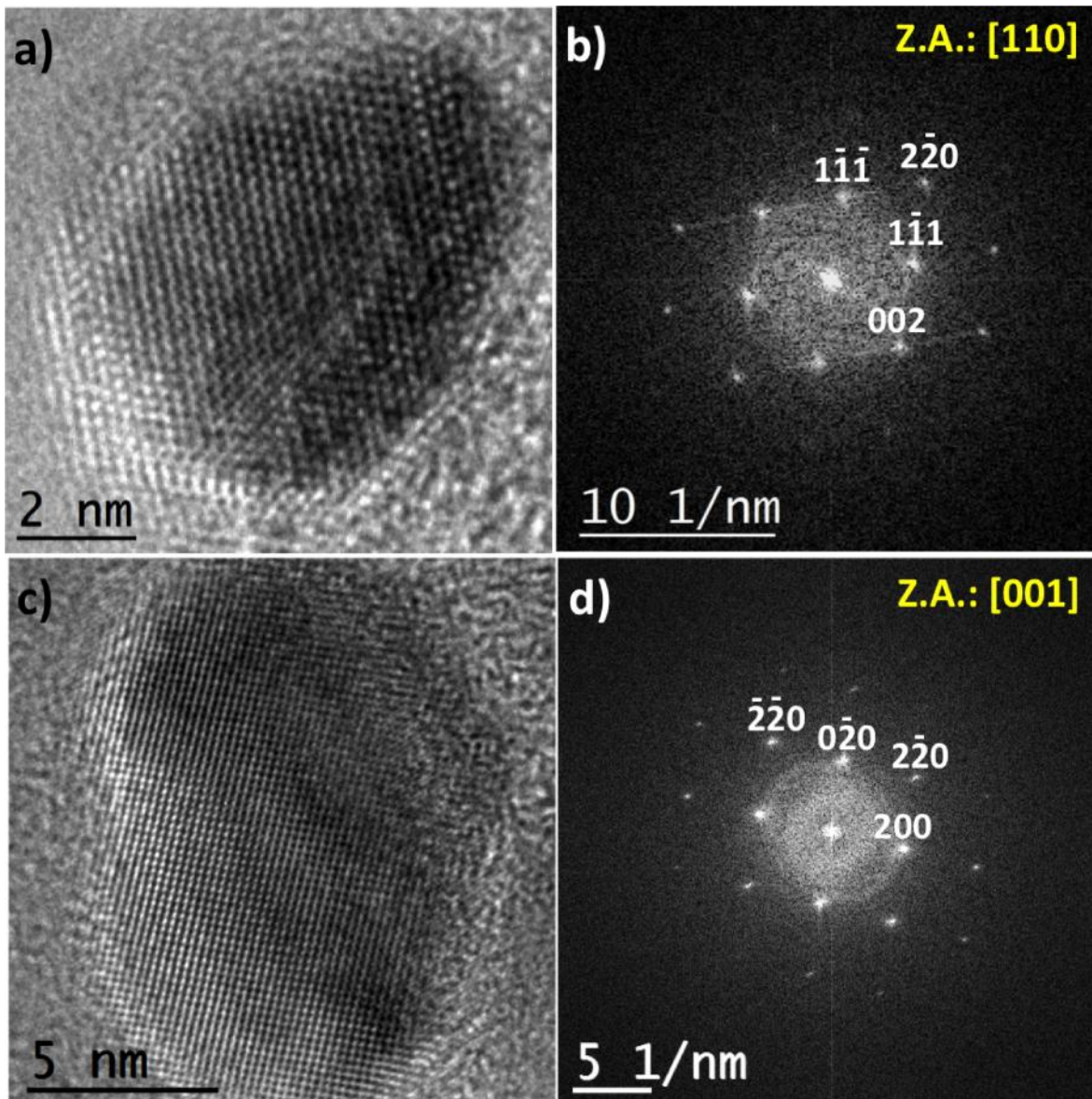


Figura 4.17. Imágenes de MET de alta resolución (a y c) y sus respectivas transformadas rápidas de Fourier (b y d). Los Patrones de puntos de difracción de estas últimas imágenes se han indexado a los ejes de zona [110] y [001] de la plata metálica.

En la figura 4.18 se muestra un espectro EDEX típico de la muestra S-0.1M en el que se detectan trazas de cloro, de forma consistente con la presencia de partículas de cloruro de plata.

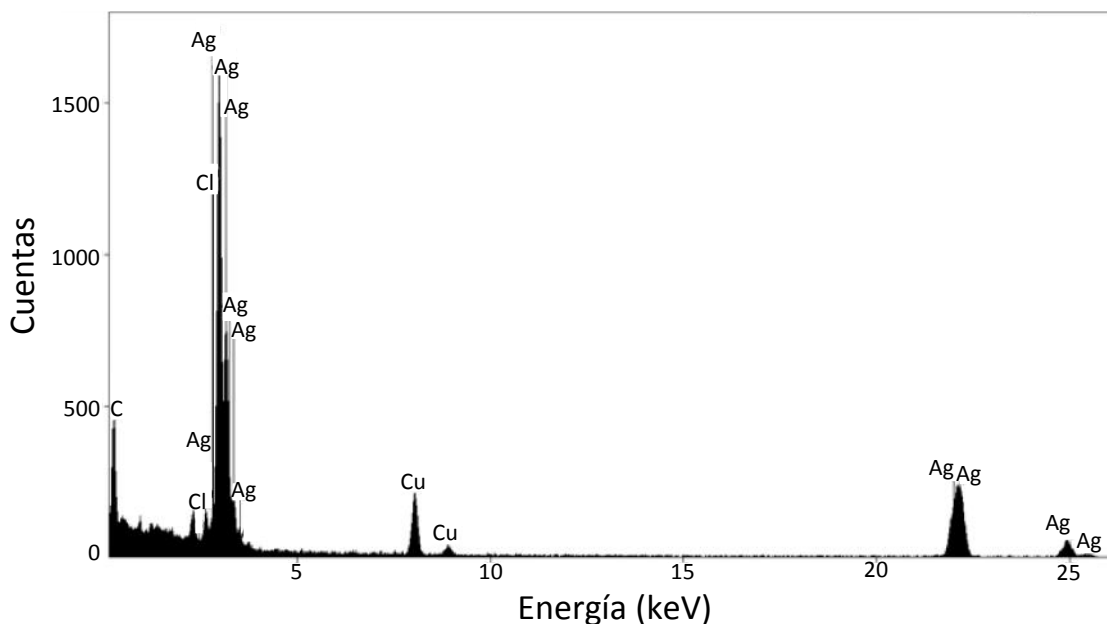


Figura 4.18: Espectro EDEX de las nanoestructuras de la muestra S-0.1M.

En la figura 4.19 se muestran los espectros UV-visible de las muestras sintetizadas con extractos de chíá y con los espectros calculados usando la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas con diámetros de 20 nm y 50 nm. Ambas muestras (S-5mM y S-0.1M) presentaron bandas de extinción en los espectros UV-visible (figura 4.19) con máximos a 450 nm y 485 nm, respectivamente, mientras que el extracto de chíá no absorbe la radiación en el rango del espectro visible. Estas bandas de absorción son debidas a la excitación de plasmones superficiales localizados en las nanopartículas. No obstante, aparecen más anchas y desplazadas con respecto a las bandas predichas por la teoría de Mie para nanopartículas esféricas de plata, siendo estas diferencias más significativas para la muestra S-0.1M. Estas diferencias se atribuyen principalmente a desviaciones de la morfología esférica, así como la presencia de agregados de nanopartículas y nanopartículas de AgCl.

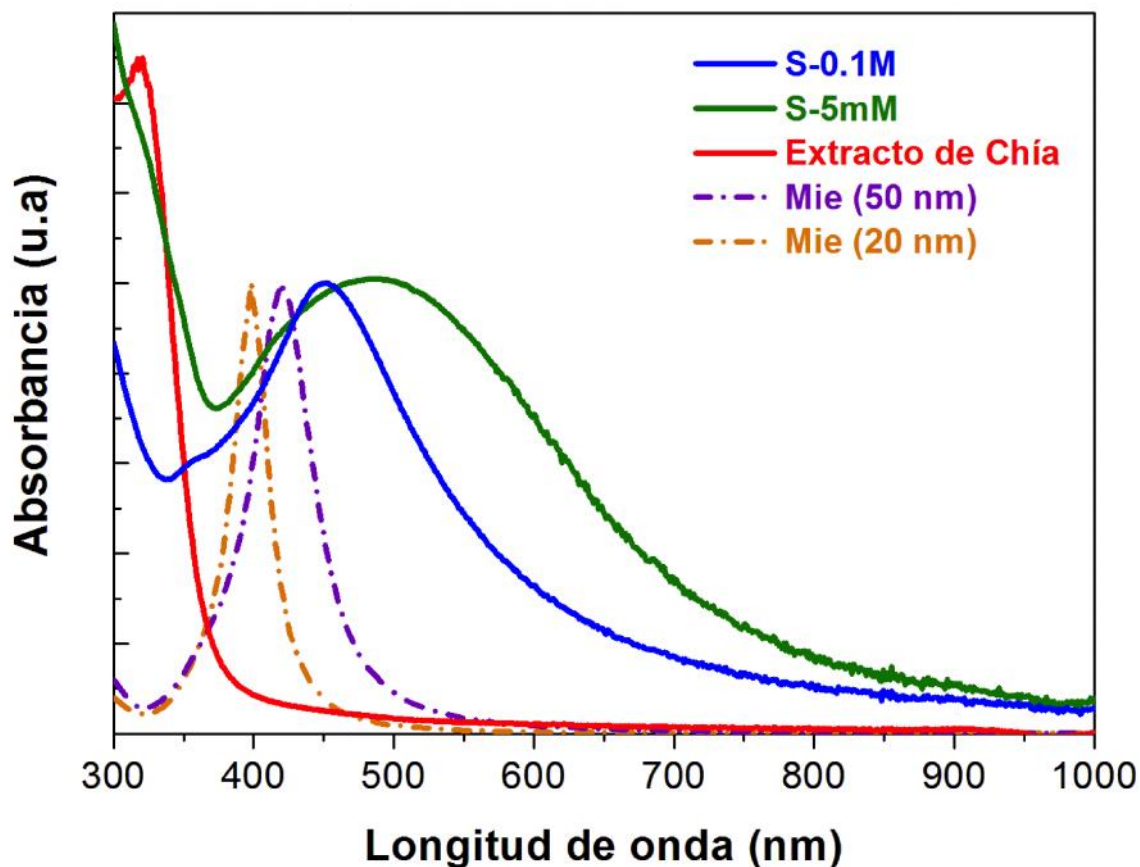


Figura 4.19. Espectros UV-visible del extracto de semillas de chía empleado en las síntesis y de las muestras S-5mM y S-0.1M. Estos espectros experimentales son comparados con los simulados con la teoría de Mie para nanopartículas de plata esféricas con diámetros de 20 nm y 50 nm suspendidas en agua.

La figura 4.20 muestra los espectros infrarrojos del extracto seco y las muestras basadas en plata. El espectro del extracto muestra bandas de absorbancia a 3330, 2932, 1726, 1634, 1600, 1409, 1264 y 1058 cm^{-1} . La banda ancha a 3330 cm^{-1} está asociada a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H. Las bandas a 2932, 1409 y 1260 cm^{-1} se pueden asociar a diferentes modos de vibración del grupo metileno. El pico a 1726 cm^{-1} podría atribuirse a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo -C=O . La banda a 1634 cm^{-1} podría asignarse a los grupos carboxílicos (banda amida I). La banda a 1058 cm^{-1} podría atribuirse a la vibración de estiramiento -C-O de grupos alcohólicos. Los

espectros de las muestras de Ag preparadas por síntesis mediada con extractos de chía presentan bandas similares, lo que indica la absorción y la unión de los grupos hidroxilo y carboxilato con la superficie de las nanopartículas. Lo anterior se resume en la tabla 4.2

Tabla 4.2: Valores asociados a los picos de absorbancia obtenidos mediante espectroscopía infrarroja para el extracto de chía utilizado en la síntesis.

BANDAS DE ABSORBANCIA	ASOCIACIÓN DE LA BANDA
3330	Asociado a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H
2932 1409 1264	Asociado a diferentes modos de vibración del grupo metileno
1726	Se atribuye a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo - C=O
1634	Se asigna a los grupos carboxílicos (banda amida I)
1058	Puede ser atribuido a las vibraciones de estiramiento -C-O de grupos alcohólicos

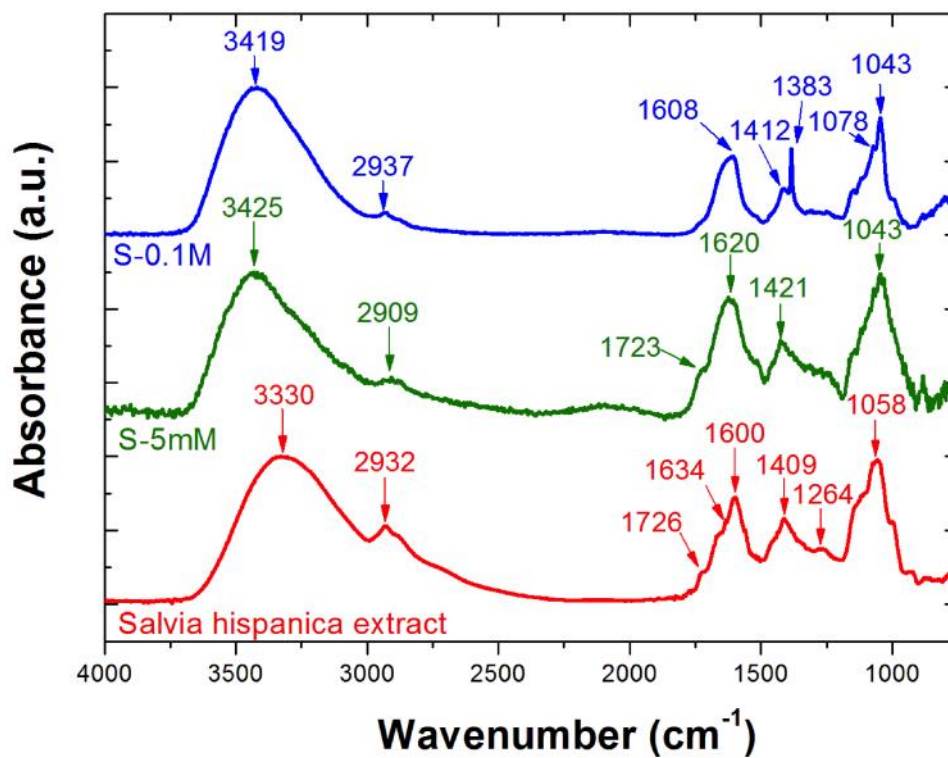


Figura 4.20. Espectros infrarrojos del extracto de semillas de chía empleado en las síntesis y de las muestras S-5mM y S-0.1M.

El espectro anterior para *Salvia hispánica* es muy similar al espectro de Transmitancia-absorbancia FTIR obtenidos por Hermoso - Díaz, figura 4.21.

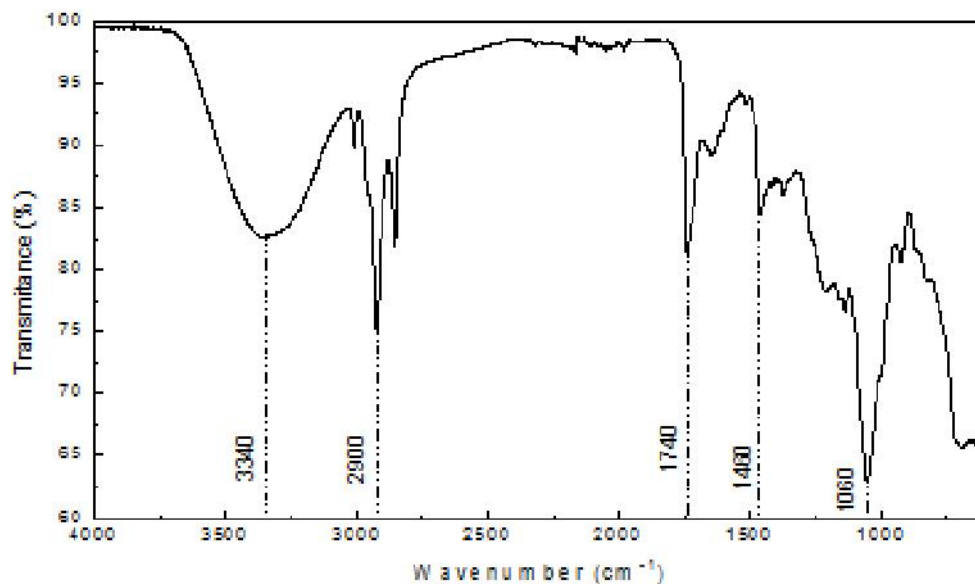


Figura 4.21: Espectro infrarrojo de *Salvia hispánica*. Obtenido por Hermoso - Díaz^[14].

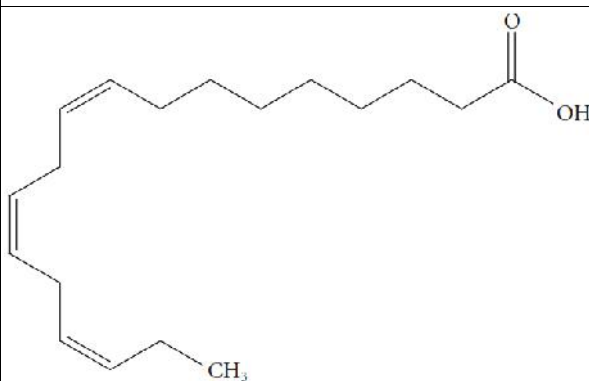
Los resultados reportados por los autores Hermoso - Díaz^[14] para el espectro de *Salvia hispánica* se menciona en la tabla 4.3.

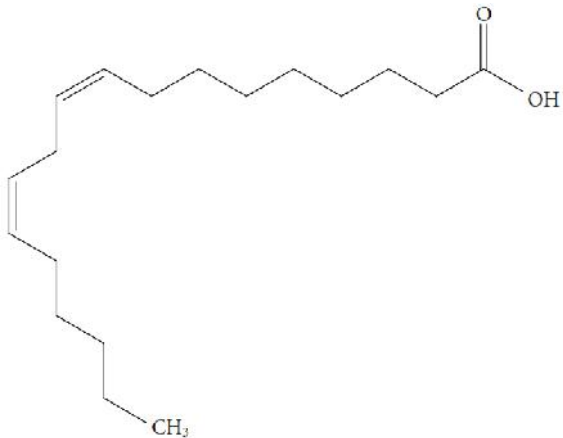
Tabla 4.3: Resultados obtenidos por los autores Hermoso - Díaz , asociados a los picos de Transmitancia.

BANDA DE TRANSMITANCIA- ABSORBANCIA	ASOCIACIÓN DE LA BANDA
3340	Asignado al grupo OH
2900	Asignado al grupo C-H
1740	Asignado al grupo C=O
1460	Correspondiente al grupo C=C
1050	Correspondiente al grupo C-O

Resultado que los autores asocian a las estructuras de los ácidos *Linoleico* y α -*Linoleico*. Mismos que se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Estructura química y actividades de los dos compuestos principales de *Salvia hispánica*.

COMPUESTO QUÍMICO EN SALVIA HISPANICA	ESTRUCTURA QUÍMICA	ACTIVIDADES
<p>Omega 3</p> <p>Ácido alfa-Linolénico</p> <p>ω-3 ALA (18:3)</p> <p>(PUFA acido graso)</p>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Reduce los niveles de triglicéridos y colesterol, lo que a su vez produce baja presión sanguínea y enfermedades relacionadas al corazón. 2. Actividad inflamatoria. 3. Actividades cardioprotectoras y hepatoprotectoras redistribuyendo los lípidos lejos de la grasa visceral y del hígado. 4. Acción antidiabética. 5. Protección contra la artritis, la enfermedad autoinmune y el cáncer.

<p>Omega 6 Ácido Linolénico ω-3 LA (18:2) (Ácido grasos PUFA)</p>		<p>Este ácido graso tiene actividades inflamatorias, hipertensivas y trombóticas. Funciona de manera inversa con ALA (Ácido alfa-linolénico); por tanto, una relación equilibrada de ALA o LA es importante para mantener una buena salud.</p>
---	--	--

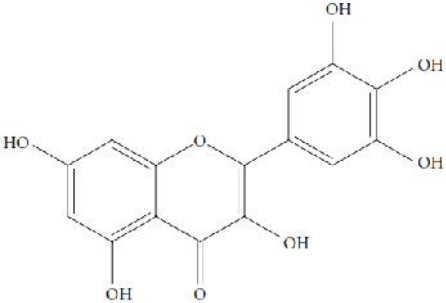
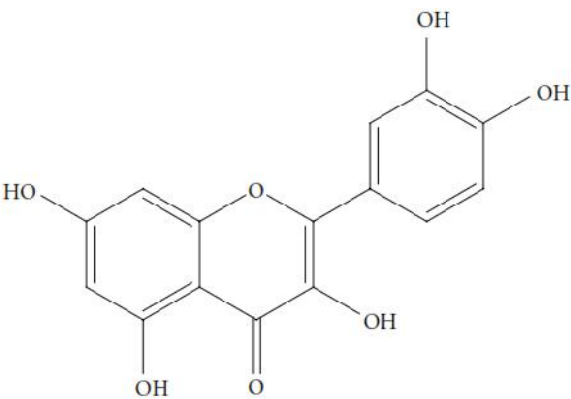
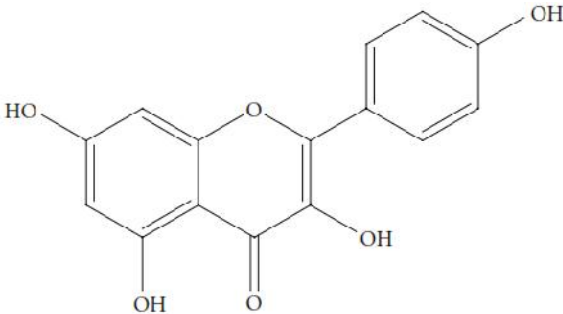
Además se detectó la presencia de compuestos fenólicos en la semilla o aceite, mismos que se muestran en la tabla 4.5.^[1]

Tabla 4.5: Compuestos fenólicos identificados en semillas de chía y aceite (*Salvia hispánica* L.) analizados por EASI-MS.^[11]

COMPUESTO	COMPOSICIÓN ELEMENTAL	[M-H] ⁻ m/z	SEMILLA DE CHIA	ACEITE DE CHIA
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.04	X	X
Acido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.09	X	X
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.05		X
Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.04	X	X
3,4-DHPEA-EDA	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	377.13	X	

La tabla 4.6 muestra el compuesto activo, la estructura química y actividades en el cuerpo humano para algunos compuestos fenólicos para *Salvia hispánica*^[12].

Tabla 4.6: Compuestos, estructura química y actividades en el cuerpo humano para algunos compuestos fenólicos para *Salvia hispánica*. Tabla tomada y acoplada de la referencia [12].

COMPUESTO QUÍMICO EN SALVIA HISPANICA	ESTRUCTURA QUÍMICA	ACTIVIDADES
<p>Miricetina (flavonoles y ácidos fenólicos)</p>		<p>-----</p>
<p>Quercetina (flavonoles y ácidos fenólicos)</p>		<p>Actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerosas y antitrombóticas.</p>
<p>Kaempferol (flavonoles y ácidos fenólicos)</p>		<p>-----</p>

Para el caso de las muestras analizadas los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.7: Valores asociados a los picos de absorbancia obtenidos mediante espectroscopía infrarroja para las muestras basadas en plata mediante extractos de chía.

PICOS DE ABSORBANCIA PARA S-0.1M	ASOCIACIÓN DE LA BANDA
3419/3425	Asignado al grupo OH
2937/2909	Asignado al grupo metileno
1723/1726	Asignado al grupo C=O
1608/1620	Se asigna a los grupos carboxílicos (banda amida I)
1412/1409	Asignado al grupo metileno
1383	Vibración de flexión de los grupos C-OH
1043/1058	Vibraciones de estiramiento -C-O de grupos alcohólicos

Las diferencias en el desplazamiento de los picos del espectro FTIR son atribuidas al método de extracción empleado, así como a la región de procedencia de *Salvia hispánica*, misma que tiene una influencia directa en la concentración de proteínas, aceites, fibra dietética entre otros.^[14]

La figura 4.22 presenta los espectros Raman de las dos muestras basadas en plata sintetizadas con extractos de chía. Ambos espectros presentan dos picos pronunciados centrados en 1372 cm^{-1} y 1568 cm^{-1} para la muestra S-5mM, y a 1366 cm^{-1} y 1590 cm^{-1} para la muestra S-0.1M. El primer pico puede relacionarse con las vibraciones simétricas de C=O de los iones COO^- . El segundo pico se asocia a vibraciones de estiramiento del anillo fenilo. La intensidad de estos picos indican que los iones carboxilatos y los grupos fenilo están directamente ligados a la superficie de plata, y sus señales están enaltecidas por el efecto SERS. También son significativas las bandas observadas a 230 cm^{-1} y a 238 cm^{-1} en los espectros de S-5mM y S-0.1M, respectivamente, la cual se ha asociado a vibraciones de estiramiento de Ag-N y Ag-O.

De los resultados de las caracterizaciones por espectroscopias infrarroja y Raman indican que la superficie de las partículas sintetizadas empleando el extracto de chía como agente reductor permanecen metabolitos de chía, principalmente proteínas y polifenoles, ligados a la superficie de las partículas mediante el átomo de hidrógeno de los grupo amina y el oxígeno de los iones carboxilatos y los iones hidroxilos.

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas preparadas con el extracto de chía se probó frente a *S. Typhimurium*(figura 4.23). La viabilidad celular se evaluó como la relación de absorbancias A/A_{control} , tal como se describió en la sección 3.7. Se observa una caída de la relación A/A_{control} hasta el 15% aproximadamente a concentraciones en plata de $0.8\text{ }\mu\text{g/ml}$ y $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ para las muestras S-0.1M y S-5mM, respectivamente. Estos valores de CMI se encuentran en los más bajos reportados en la literatura.

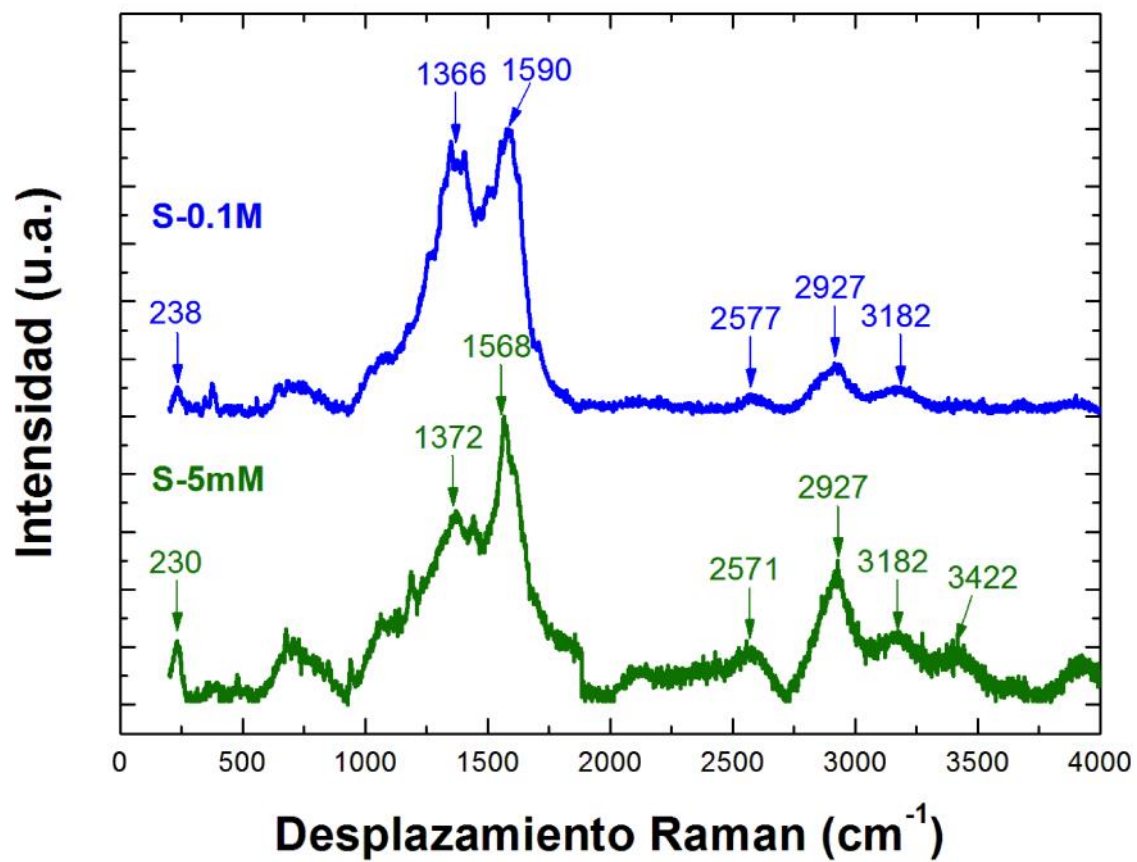


Figura 4.22. Espectros Raman de las muestras S-5mM y S-0.1M.

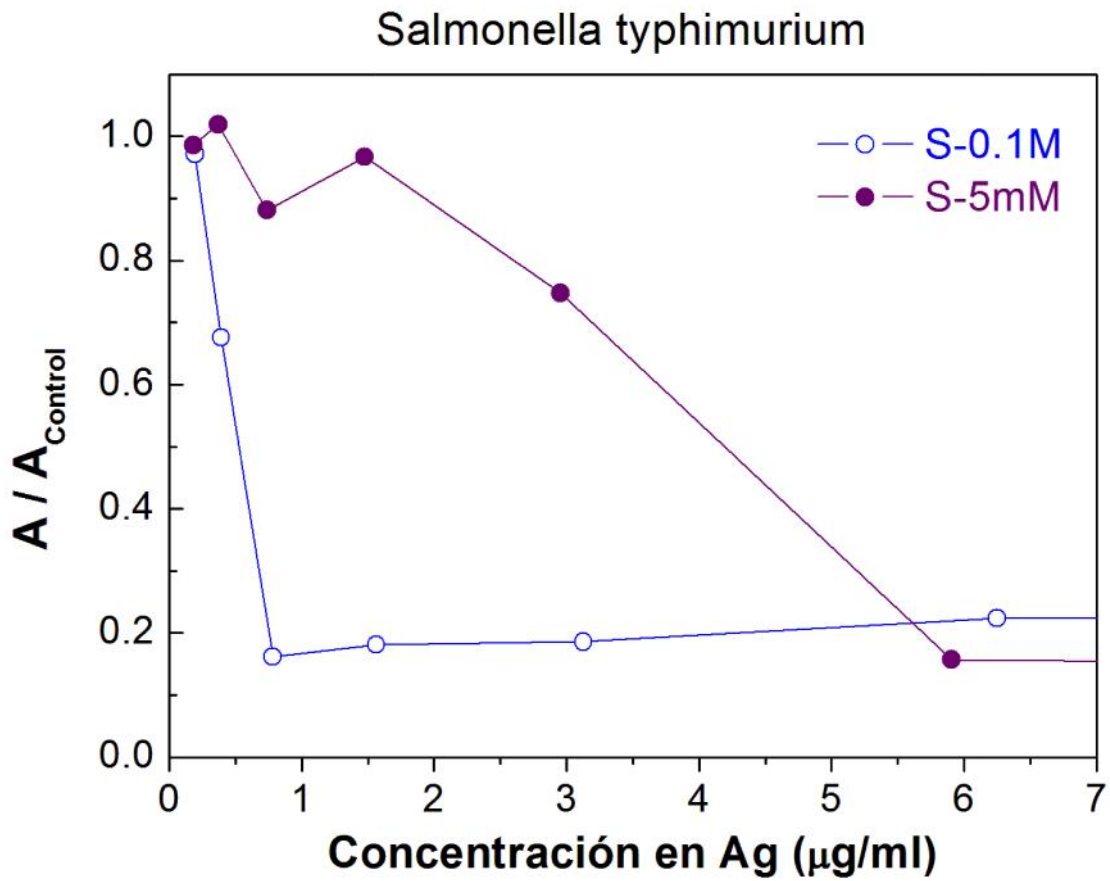


Figura 4.23. Relación entre los valores de absorbancia del pocillo de cultivo incubado y el control de cepa positiva en experimentos llevados a cabo con *S. typhimurium*, en función del contenido de plata presente en el pocillo de cultivo.

REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 4

- [1] Yu, D., & Yam, V. W. W. (2004). Controlled synthesis of monodisperse silver nanocubes in water. *Journal of the American Chemical Society*, 126(41), 13200-13201.
- [2] Evanoff, D. D., & Chumanov, G. (2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem*, 6(7), 1221-1231.
- [3] García, M. A. (2011). Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(28), 283001.
- [4] Senapati, S., Das, S. P., & Patnaik, A. K. (2012). Kinetics and Mechanism of Oxidation of L-Ascorbic Acid by Pt (IV)(aq) in Aqueous Hydrochloric Acid Medium. *Advances in Physical Chemistry*, 2012.
- [5] Panicker, C. Y., Varghese, H. T., & Philip, D. (2006). FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of Vitamin C. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(3), 802-804.
- [6] W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S. Ou-Yang, Y.B. Chen, "Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 1115–1122.
- [7] A. Panáček, L. Kvitek, R. Prucek, et al., "Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity", *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16248–16253.
- [8] C. Luna, E.D. Barriga-Castro, A. Gómez-Treviño, N.O. Núñez, R. Mendoza-Reséndez, "Microstructural, spectroscopic, and antibacterial properties of silver-based hybrid nanostructures biosynthesized using extracts of coriander leaves and seeds", *International Journal of Nanomedicine* 11 (2016) 4787.
- [9] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials", *Biotechnology advances* 27 (2009) 76-83.
- [10] H.M. Zhang, N. Wakisaka, O. Maeda, T. Yamamoto, "Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: Helicobacter pylori", *Cancer* 80 (1997) 1897-1903.
- [11] da Silva Marineli, R., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 1304-1310.
- [12] Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *BioMed Research International*, 2012.
- [13] Segura-Campos, M. R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2014). Chemical and functional properties of chia seed (*Salvia hispanica* L.) gum. *International journal of food science*, 2014.

- [14] Hermoso-Díaz, I. A., Velázquez-González, M. A., Lucio-García, M. A., & González-Rodríguez, J. G. (2014). A study of *Salvia hispanica* as green corrosion inhibitor for carbon steel in sulfuric acid. *Chem Sci Rev Lett*, 3, 685-697.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

En esta investigación se han explorado dos tipos de síntesis de nanoestructuras de plata caracterizadas por ser más sustentables que las convencionales, dado que se reemplazan agentes reductores y estabilizantes tóxicos por metabolitos y fitoquímicos biodegradables e inoocuos para la salud humana y el medio ambiente, como. De los resultados obtenidos se destacan las siguientes conclusiones:

- 1) La reducción de iones Ag^+ procedentes de la solución de nitrato de plata en agua, utilizando soluciones acuosas de ácido ascórbico con concentraciones superiores a las exploradas en otros estudios, y que fueron previamente calentadas a 70°C , conduce a la obtención de matrices nanoscópicas de ácido ascórbico que embeben y estabilizan núcleos nanoscópicos cristalinos de plata, uniformes en tamaño, con un diámetro de 3.3 ± 1.5 nm.
- 2) Los compuestos nanoscópicos de plata/vitamina C presentaron una banda de extinción en su espectro UV-visible después de extraer la absorción debida a la vitamina C. Esta banda está asociada a las excitaciones dipolares de los núcleos de plata que se ajusta razonablemente a simulaciones realizadas empleando la teoría de Mie.
- 3) Las moléculas de ácido ascórbico están ligadas a los núcleos de plata en las estructuras híbridas plata/ácido ascórbico, tal como indicó el desplazamiento de bandas de absorción en el espectro infrarrojo respecto a las posiciones de las bandas reportadas para el ácido ascórbico.
- 4) Las nanoestructuras híbridas plata/ácido ascórbico presentaron una actividad antimicrobiana mejorada frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas con valores de CIM más bajos que los encontrados en la literatura para nanopartículas de Ag. Este enaltecimiento de la actividad biológica de los núcleos de plata se ha

atribuido a su tamaño ultra-fino y a posibles efectos de sinergia en las actividades antimicrobianas de las nanopartículas de Ag y la matriz de ácido ascórbico.

- 5) Las semillas de chía contienen metabolitos, principalmente proteínas y polifenoles, que pueden emplearse en forma de extractos naturales como agentes reductores y protectores de nanopartículas coloidales basadas en plata (mezclas de nanopartículas de Ag y AgCl).
- 6) Las nanopartículas basadas en plata sintetizadas con extractos de chía presentan una tendencia a crecer mediante coalescencia al depositarlas sobre un sustrato y dejar evaporar el solvente del coloide.
- 7) Las nanopartículas basadas en plata sintetizadas con extractos de chía presentan bandas de absorción en el espectro UV-visible debidas a la excitación de plasmones superficiales localizados en las nanopartículas. No obstante, aparecen más anchas y desplazadas con respecto a las bandas predichas por la teoría de Mie para nanopartículas esféricas de plata. Estas diferencias se atribuyeron a desviaciones de la morfología esférica, la presencia de nanopartículas de AgCl y la formación de agregados de nanopartículas.
- 8) Las caracterizaciones por espectroscopias infrarroja y Raman indicaron que la superficie de las partículas sintetizadas empleando el extracto de chía como agente reductor tienen metabolitos de chía, principalmente proteínas y polifenoles, ligados a la superficie de las partículas mediante el átomo de hidrógeno de los grupo amina y el

oxígeno de los iones carboxilatos y los iones hidroxilos. Esto sugiere que estos grupos funcionales son los responsables de la reducción de iones de plata a su estado metálico.

- 9) Estas nanoestructuras presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. Typhimurium* con valores de CMI que se encuentran entre los más bajos reportados en la literatura.