



Universidad de Sonora

División de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Física

**Síntesis de nanopartículas de plata y oro con extracto de Mangle rojo y evaluación de toxicidad en *Artemia franciscana***

T E S I S

Que para obtener el grado:

LICENCIATURA EN FÍSICA

PRESENTA

P.L.F Natalia Hinostroza Moya

Hermosillo, Sonora, México.

Noviembre del 2021

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## Dedicatoria

A mi familia, quienes siempre han sido parte de mis logros.

A mi madre Rosa Amelia Moya y mi padre Ramón Enrique Hinostroza, quienes siempre me han hecho sentir que puedo alcanzar lo que me proponga. Gracias por sus enseñanzas y su apoyo incondicional.

A mis hermanos Nayely y Ramón por su compañía durante este trayecto.

## Agradecimientos

A la Universidad de Sonora y el Departamento de Física, con un cariñoso agradecimiento a todos mis maestros y compañeros.

Al Dr. Ramón Iñiguez Palomares quien me dio la oportunidad de trabajar bajo su guía. Le agradezco su apoyo, su paciencia y sus consejos. Sobre todo, le agradezco el siempre estar a disposición durante estos tiempos tan complicados para todos.

Al c.Dr. Francisco Javier Álvarez Cirerol quien me ayudó y enseñó a realizar los ensayos biológicos fundamentales en este trabajo. Le agradezco todo su apoyo en cualquier circunstancia, la motivación brindada y todo el tiempo que invirtió en este trabajo.

A la Dra. Ericka Rodríguez León y al Dr. Ricardo López Esparza por ser parte del comité de tesis y por ser parte de mi formación académica. Les agradezco todo su apoyo y orientación.

Al Departamento de Investigación en Polímeros de la UniSon, especialmente a la c.Dra. Blanca Estela Rodríguez Vasquez por sus consejos e importante ayuda en este trabajo.

Al Dr. Cesar Rodriguez Baes del Departamento de Física de la UniSon por su apoyo e invaluable ayuda.

Al Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM, agradeciendo el apoyo especialmente al Dr. Rubén Mendoza Cruz y a la Dra. Lourdes Soledad Bazán Díaz por su ayuda en este trabajo.

# Índice

Introducción.....	1
<b>Capítulo 1: Objetivos</b>	
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	2
<b>Capítulo 2: Antecedentes</b>	
2.1 Nanociencia y tecnología.....	5
2.2 Nanomateriales.....	5
2.3 Métodos de Síntesis.....	6
2.4 Síntesis Verde.....	8
2.5 Síntesis de nanopartículas con extracto de plantas.....	9
2.6 <i>Rhizophora mangle</i> .....	10
2.7 Toxicidad de los nanomateriales.....	14
2.8 Modelos de toxicidad de nanopartículas en organismos marinos.....	15
2.8.1 <i>Artemia franciscana</i> .....	16
2.8.2 Ciclo de vida de la <i>Artemia franciscana</i> .....	16
2.8.3 Artemia en acuicultura.....	17
2.8.4 Toxicidad en <i>Artemia franciscana</i> .....	17
<b>Capítulo 3: Técnicas Experimentales</b>	
3.1 Espectroscopía de absorción UV-vis.....	24

3.1.1 El plasmón de resonancia de superficie.....	26
3.1.2 Evaluación de la Cinética de Formación por Espectroscopía UV-vis <i>in situ</i> .....	27
3.2 DPPH.....	30
3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	32
3.4 Análisis termogravimétrico TGA.....	36
3.4.1 Clasificación de análisis termogravimétricos.....	37
3.4.2 Reporte de resultados TGA.....	38
3.5 Microscopía confocal.....	39
<b>Capítulo 4: Metodología</b>	
4.1 Obtención del extracto.....	45
4.2 Síntesis de nanopartículas de plata y de oro con extracto de Mangle rojo.....	46
4.2.1 Preparación de los precursores metálicos.....	46
4.2.2 Síntesis exploratoria de nanopartículas AgMR y AuMR.....	46
4.2.3 Síntesis final de nanopartículas AgMR y AuMR.....	49
4.3 Ensayo de supervivencia en <i>Artemia franciscana</i> ante AuNPs y AgNPs.....	51
<b>Capítulo 5: Resultados y Discusiones</b>	
5.1 Caracterización del Extracto.....	53
5.1.1 Espectro UV-vis del Extracto de MR y curva de calibración.....	53
5.1.2 DPPH del Extracto de MR.....	55
5.2 Nanopartículas.....	57

5.2.1 Espectros UV-vis.....	57
5.2.1.1 Espectros UV-vis de las AgNPs sintetizadas con extracto de Mangle Rojo.....	57
5.2.1.2 Espectros UV-vis de las AuNPs sintetizadas con extracto de Mangle Rojo.....	59
5.2.2 Cinética de Reacción de síntesis por UV-vis <i>in situ</i> .....	61
5.2.3 Microscopia electrónica de Transmisión.....	63
5.2.3.1 Sistema de nanopartículas de plata sintetizadas con Mangle rojo (AgMRNPs).....	63
5.2.3.2 Sistema de nanopartículas de oro sintetizadas con Mangle rojo (AuMRNPs).....	67
5.2.4 TGA de Nanopartículas.....	73
<b>5.3 Ensayo de citotoxicidad en <i>Artemia Franciscana</i>.....</b>	<b>74</b>
5.3.1 Ensayo de supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> alimentadas con nanopartículas AgMR.....	74
5.3.2 Ensayo de supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> alimentadas con nanopartículas AgMR.....	76
5.3.3 Retención de nanomateriales por <i>Artemia franciscana</i> .....	77
5.3.4 Estudio de las nanopartículas AgMR y oro MR por Microscopía Confocal de Barrido Láser.....	81
5.3.5 Estudio de las nanopartículas AuMR y oro MR por Microscopía Confocal de Barrido Láser.....	83
<b>Capítulo 6: Conclusiones.....</b>	<b>88</b>

## Lista de Figuras

<b>Número de figura</b>	<b>Pie de Figura</b>	<b>Página</b>
2.1	Esquema de materiales de escala nanométrica a macrométrica.	5
2.2	Métodos empleados para la síntesis de nanopartículas [6].	7
2.3	Polifenoles de bajo peso molecular presentes en <i>Rizópoda mangle</i> [29].	12
2.4	Imagen de Artemia Sánchez Romero, A. (2018). Efecto de la temperatura sobre el tiempo y la eficiencia de eclosión en el crustáceo euritermo Artemia sp.	17
3.1	Diagrama esquemático que ilustra el plasmón de superficie localizado en una superficie de nanopartículas [5].	26
3.2	Cinética de formación por espectroscopía UV-vis <i>in situ</i> de nanopartículas de oro sintetizadas variando la concentración de precursor metálico. Las líneas rojas corresponden al ajuste por el modelo redox-cristalización [7].	29
3.3	Espectrofotómetro de doble haz Lambda 45 (Perkin-Elmer).	29
3.4	Reacción de antioxidantes y radicales libres DPPH. AH es una molécula donante de antioxidantes y A es el radical libre producido [9].	31
3.5	Esquema de los componentes básicos de un equipo TEM y de la trayectoria del haz de electrones hasta formar la imagen [11].	33
3.6	(A) Imagen de alta resolución (HRTEM) de nanopartícula individual de plata y (B) corresponde a la respectiva Transformada rápida de Fourier (FFT) [12].	34
3.7	Rejillas para estudio por TEM, con soporte lacey-carbon. A la derecha se muestra el aspecto real del soporte visto por microscopio electrónico de barrido. La escala corresponde a 500 nm.	35
3.8	Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-ARM 200F.	36



<b>3.9</b>	Señales TGA y DTG de conversión de biomasa en atmósfera inerte [14].	39
<b>3.10</b>	Tejido fijado de riñón de ratón marcado con Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 acoplado a faloidina para revelar estructuras de soporte y con DAPI para teñir núcleos celulares. (A) corresponde a microscopía de epifluorescencia y (B) a microscopía confocal de barrido laser [16].	40
<b>3.11</b>	Diagrama de los elementos básicos que conforman al microscopio confocal. El diseño original propuesto por Minsky es mostrado en (A). La figura en (B) corresponde al arreglo de componentes de un microscopio confocal de barrido laser moderno.	40
<b>3.12</b>	Equipo confocal de barrido laser LSM800 (Zeiss).	42
<b>4.1</b>	(A) Parte de la corteza del <i>Rhizophora Mangle</i> utilizada para la obtención del extracto. (B) Extracto de MR en Etanol/H <sub>2</sub> O.	46
<b>4.2</b>	(A) AgNPs con extracto de MR obtenidas en la síntesis final. (B) AuNPs con extracto de MR obtenidas en la síntesis final.	50
<b>4.3</b>	Sistema de eclosión de <i>Artemia franciscana</i> (1. Cubo de incubación. 2. Conexión de aire. 3. Bomba de aire)	52
<b>4.4</b>	Diseño de placas para aplicación de tratamientos.	52
<b>5.1</b>	Espectro UV-vis del extracto de mangle rojo en agua.	53
<b>5.2</b>	Curva de calibración del extracto de mangle rojo.	54
<b>5.3</b>	Actividad inhibitoria del extracto de mangle rojo sobre el radical DPPH.	55
<b>5.4</b>	Ajuste lineal para la determinación de la CI <sub>50</sub> del extracto de MR.	56
<b>5.5</b>	Espectros UV-vis de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de MR a distintos volúmenes de reactantes y manteniendo constante la razón de vol. AgNO <sub>3</sub> /Vol. Extracto de MR de acuerdo con la tabla 3.1.	58
<b>5.6</b>	Espectros UV-vis del sistema Ag <sub>A</sub> correspondiente a las distintas etapas del protocolo de limpieza.	59
<b>5.7</b>	Espectros UV-vis de nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de MR a distintos volúmenes de reactantes y manteniendo constante	60

la razón de vol.  $\text{HAuCl}_4/\text{Vol. Extracto de MR}$  de acuerdo con la tabla 3.1.

<b>5.8</b>	Espectros UV-vis del sistema $\text{Au}_E$ correspondiente a las distintas etapas del protocolo de limpieza.	61
<b>5.9</b>	Cinética de formación de nanopartículas de plata (A) y de oro (B) sintetizadas con extracto de MR. Las curvas han sido ajustadas por el modelo Redox-cristalización.	62
<b>5.10</b>	Mecanismo propuesto para la formación de las nanopartículas metálicas en dos pasos, adaptado de referencia [9].	63
<b>5.11</b>	Micrografías TEM del sistema de nanopartículas AgMR (A-C) y su histograma de frecuencia de tamaños (E) construido con 340 partículas.	65
<b>5.12</b>	La micrografía de dos nanopartículas de plata (AgMRNPs) se muestra en (A). El correspondiente espectro de energías dispersivas de rayos X y la correspondiente concentración de elementos químicos se muestran en (B).	66
<b>5.13</b>	Micrografía de Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula de plata sintetizada con mangle rojo (A). La imagen en (B) corresponde a la Transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada en (A). En (C) se observa la imagen reconstruida a partir de la integración de (B) obteniéndose los planos característicos de la región seleccionada en (A).	66
<b>5.14</b>	La micrografía en (A) corresponde al conjunto de nanopartículas de plata seleccionado para el estudio de la difracción de electrones. En (B) se muestra el patrón de difracción de electrones obtenido y la asignación de los distintos planos de Bragg asociados a la estructura cristalina fcc de la plata.	67
<b>5.15</b>	Micrografías TEM del sistema de nanopartículas AuMR (A-D) a distintas ampliaciones y su histograma de frecuencia de tamaños (E) construido con 300 partículas.	69
<b>5.16</b>	Espectro de energías dispersivas de rayos X y la correspondiente concentración de elementos químicos de un conjunto de nanopartículas de oro sintetizadas con mangle rojo.	70
<b>5.17</b>	Micrografía de Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula de oro sintetizada con mangle rojo (A). La imagen en (B) corresponde a la Transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada en (A). En (C) se observa la imagen reconstruida a partir de la integración de (B) obteniéndose los planos característicos de la región seleccionada en (A).	71

<b>5.18</b>	La micrografía en (A) corresponde al conjunto de nanopartículas de oro seleccionado para el estudio de la difracción de electrones. En (B) se muestra el patrón de difracción de electrones obtenido y la asignación de los distintos planos de Bragg asociados a la estructura cristalina fcc del oro.	72
<b>5.19</b>	Potenciales zeta de los sistemas de dispersiones coloidales de nanopartículas de AgMR (A) y AuMR (B).	73
<b>5.20</b>	Curvas de termogravimetrías de las nanopartículas AgMR y AuMR.	74
<b>5.21</b>	Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> durante 24 horas en presencia de nanopartículas de plata a distintas concentraciones.	75
<b>5.22</b>	Supervivencia de <i>Artemia franciscana</i> durante 24 horas en presencia de nanopartículas de oro a distintas concentraciones.	76
<b>5.23</b>	<i>Artemia franciscana</i> con acumulación de nanopartículas de plata reportada por Alvarez <i>et al.</i> , 2019 [19].	77
<b>5.24</b>	Imágenes de campo claro de <i>Artemias franciscana</i> tratadas con nanopartículas AgMR a 200 µg/mL. En (A) y (B) las flechas indican las regiones dentro del tracto digestivo donde se observan porciones del material ingerido.	78
<b>5.25</b>	Especimen de <i>Artemia franciscana</i> analizada por microscopía confocal de barrido laser donde la imagen de fluorescencia excitando a 488 nm se muestra en (A). La imagen de campo claro y la fusión de ambas imágenes se presentan en (B) y (C), respectivamente.	79
<b>5.26</b>	Imágenes de campo claro de <i>Artemias franciscanas</i> tratadas con nanopartículas AgMR a 100 µg/mL. En (A) y (B) las flechas indican las regiones dentro del tracto digestivo donde se observan porciones del material ingerido.	79
<b>5.27</b>	Imagen modificada de Pecoraro <i>et al.</i> , 2021[16] donde se observa la acumulación de nanopartículas de titanio, oro y plata en ese orden.	80
<b>5.28</b>	Imagen modificada de Alvarez <i>et al.</i> 2019 [19]. Nanopartículas de plata sintetizadas con <i>Rumex hymenosepalus</i> .	80
<b>5.29</b>	Nanopartículas AuMR por microscopía confocal de barrido laser en modo de luz laser transmitida 4.25A y en modo de emisión (B). La figura (C) corresponde a la fusión de las imágenes (A) y (B).	82

- 5.30** Espécimen de *Artemia franciscana* alimentada con AuMR analizada por microscopía confocal de barrido laser. La imagen (A) es formada por la reflectividad del material de oro. La imagen de campo claro y la fusión de ambas imágenes se presentan en (B) y (C), respectivamente. 82
- 5.31** Caracterización del sistema de nanopartículas AgMR por microscopía confocal de barrido laser en modo de luz laser transmitida (A) y (D) y en modo de emisión (B) y (E). (C) corresponde a la fusión de las imágenes (A) y (B) mientras que las imágenes (D) y (E) son fusionadas en (F). 84

## Lista de tablas

<b>Número de tabla</b>	<b>Descripción de contenido</b>	<b>Página</b>
2.1	Biosíntesis utilizando extracto de plantas.	8
2.2	Estudios de toxicidad en distintos organismos marinos.	14
2.3	Efectos biológicos de nanopartículas observados en <i>artemia salina</i> y <i>artemia franciscana</i> .	16
3.1	Aproximaciones de longitud de onda, Energías y tipos de excitación para diferentes regiones espectrales.	23
4.1	Tabla de relaciones para la síntesis de nanopartículas de prueba de $AgNO_3$ con extracto de mangle rojo.	45
4.2	Tabla de relaciones para la síntesis de nanopartículas de prueba de $HAuCl_4$ con extracto de mangle rojo.	45
4.3	Relaciones para la síntesis de nanopartículas finales de $AgNO_3$ con extracto de mangle rojo para un volumen de 120 mL.	48
4.4	Relaciones para la síntesis de nanopartículas finales de $HAuCl_4$ con extracto de mangle rojo para un volumen de 120 mL.	48
5.1	Valores de $CI_{50}$ (DPPH) para distintos extractos de corteza y solventes empleados en la extracción.	55
5.2	Constantes de la velocidad de nucleación ( $K_1$ ) y de la tasa de crecimiento de las nanopartículas ( $K_2$ ) obtenidas del ajuste a los datos experimentales de las cinéticas de reacción de síntesis por UV-vis <i>in situ</i> .	60

## Introducción

La nanotecnología es una de las ramas tecnológicas de mayor crecimiento en los últimos años. Diferentes tipos de nanomateriales se han desarrollado con aplicaciones en diversos sectores como salud, alimentos, cosméticos, textil, agrícola y energía, solo por mencionar algunos. En las bases de datos de productos que contienen nanomateriales (<https://nanodb.dk/> y <https://product.statnano.com/>) destacan la incorporación de las partículas de óxido de silicio, titanio, aluminio, cobre y de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) así como de metales nobles (plata, oro, paladio, platino) y carbón (fulerenos, grafenos y puntos cuánticos). Por ejemplo, en el 2020 se estimó que alrededor de 500 toneladas de plata en presentación nanométrica fue producida con fines industriales. Para las nanopartículas metálicas se han propuesto varias alternativas de síntesis por método físicos y métodos químicos. En el contexto de la última, la síntesis “verde” de nanopartículas propone la utilización de reactantes de bajo impacto ambiental y con procedimientos de bajo consumo energético. Así, el uso de extractos de plantas como agentes reductores en la síntesis de nanopartículas surge como una alternativa a los métodos químicos tradicionales que generalmente emplean agentes reductores fuertes como hidracina, tetraborohidruro de sodio o citrato de sodio además del uso de estabilizantes como polímeros o surfactantes y la aplicación de calor para lograr una síntesis más rápida de nanopartículas. Se considera que la síntesis con extractos de plantas es una síntesis en un solo paso pues los mismos compuestos reductores presentes en el extracto harán las veces de agentes estabilizantes de las nanopartículas formadas en procesos que se llevan a temperatura ambiente.

*Rizophora mangle* o mangle rojo es la especie más abundante en las comunidades de manglares de México. Es una planta halófila (resistente a la sal) que crece en la parte exterior de las lagunas y en los bordes de los canales. En Sonora se encuentra principalmente Bahía Kino y dentro del Área Natural Protegida estero El Soldado. En la medicina tradicional la corteza de mangle se ha utilizado por sus propiedades astringentes, hemostáticas, febrífugas, antifúngicas, antiinflamatorias y antidiarreicas. El extracto de corteza de *Rizophora mangle* presenta una composición química variada, caracterizada por la presencia de polifenoles de bajo peso molecular como ácido gálico, elágico y clorogénico, además de catequinas, taninos condensados y fitoesteroles entre otros compuestos. Estas moléculas tienen en común la

presencia de varios grupos hidroxilos fácilmente desprotonables en su estructura que dan lugar posteriormente a una transferencia electrónica eficiente en reacciones redox. Esta capacidad para donar electrones convierte a dichas moléculas en atractivos agentes reductores en la síntesis de nanopartículas y, de hecho, existe una vasta bibliografía que reporta la síntesis de nanopartículas con estos compuestos de forma pura. En contra parte, los reportes de síntesis de nanomateriales con extractos de mangle rojo son escasos y a nuestro conocer solo existe una publicación referida a tal planta en este contexto y se enfoca a la síntesis de nanopartículas de plata.

En la presente tesis abordamos la síntesis de nanopartículas monometálicas de plata y de oro utilizando un extracto de corteza de mangle rojo como agente reductor. Los productos son caracterizados por espectroscopía UV-vis, microscopía electrónica de transmisión, difracción de área selecta y energías dispersivas de rayos X. Adicionalmente caracterizamos por análisis termogravimétrico el contenido porcentual de la parte metálica y no metálica del producto final obtenido de las nanopartículas. Por último, con el fin de establecer el potencial impacto ambiental en organismos marinos, exploramos la toxicidad de los materiales sintetizados utilizando como modelo de organismo marino a la *Artemia franciscana*.

# Capítulo 1

## Objetivos

### Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas monometálicas de oro y plata empleando como agente reductor un extracto de corteza de mangle rojo y evaluar la toxicidad de las partículas en un modelo de organismo marino (*Artemia Franciscana*).

### Objetivos específicos

1. Obtener mediante maceración en mezcla de etanol/agua un extracto de corteza de mangle rojo y construir por espectroscopía UV-vis una curva de calibración para estimar la concentración del extracto. Evaluar la capacidad antioxidante del extracto por el método de inhibición del radical DPPH.
2. Sintetizar nanopartículas monometálicas de oro y plata empleando extracto de mangle rojo y variando la relación de volumen precursor metálico: volumen agente reductor. Caracterizar por espectroscopía UV-vis la respuesta plasmónica de los productos generados.
3. Mediante espectroscopía UV-vis construir las curvas de cinética de formación de las nanopartículas y aplicar el modelo redox-cristalización para la obtención de los parámetros cinéticos  $K_1$  y  $K_2$ .
4. Utilizando análisis termogravimétrico (TGA) estimar el contenido metálico y orgánico de las nanopartículas de plata y oro.
5. Caracterizar mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) los nanomateriales producidos para determinar, formas, tamaños, cristalinidad y adicionalmente la carga superficial mediante potencial Zeta.
6. Eclosionar *Artemias franciscana* y evaluar en el estadio metanauplio la toxicidad de las nanopartículas a distintas concentraciones en un ensayo de exposición por 24 horas.



## Capítulo 2

### Antecedentes

#### 2.1 Nanociencia y nanotecnología

La nanociencia es el estudio de las propiedades de la materia a nanoescala; en particular, se concentra en las propiedades únicas y dependientes del tamaño de los materiales de estado sólido. Mientras que la nanotecnología se define como el entendimiento y control de los nanomateriales.

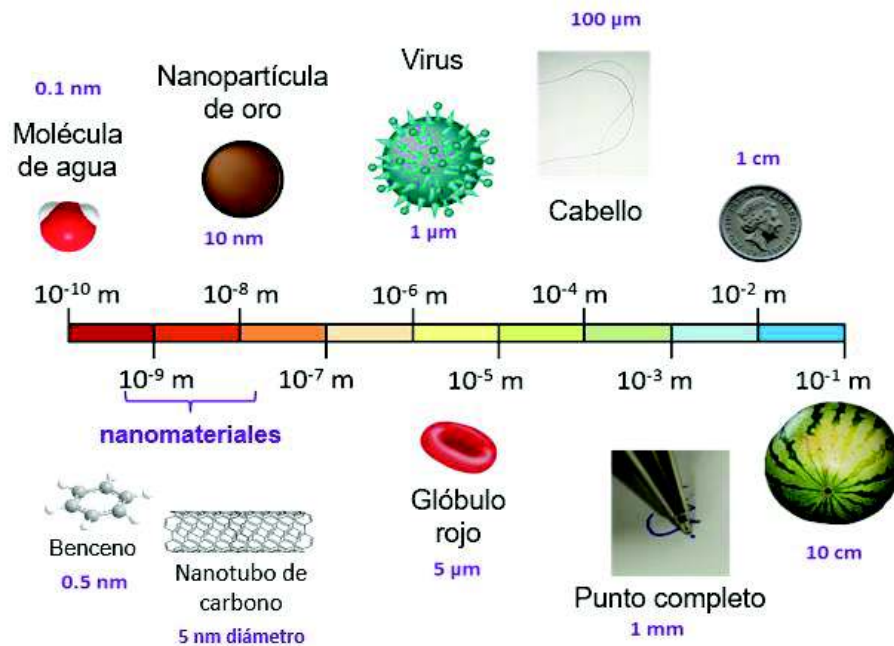
La nanotecnología moderna fue introducida por Richard Feynman, Premio Nobel de Física en 1965. Durante la reunión de la Sociedad Estadounidense de Física de 1959 en Caltech, Feynman presentó una conferencia titulada “Hay mucho espacio en el fondo”, en la que introdujo el concepto de manipulación de la materia a nivel atómico. Esta nueva idea demostró nuevas formas de pensar y desde entonces se ha demostrado que las hipótesis de Feynman son correctas. Es por esto que se le considera el padre de la nanotecnología moderna. Casi quince años después de la conferencia de Feynman, un científico japonés, fue el primero en utilizar la palabra “nanotecnología” para describir los procesos de semiconductores que ocurrieron en el orden de un nanómetro. Su definición sigue siendo pertinente hoy en día: “la nanotecnología consiste principalmente en el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula”. En otras palabras, la nanotecnología es la capacidad de manipular un solo objeto a nanoescala [1], [2].

#### 2.2 Nanomateriales

Los nanomateriales o nanopartículas representan un aspecto significativo en el estudio de la nanotecnología que trata de varios estudios que involucran partículas que oscilan entre 1 nm y 100 nm en dimensión espacial. De acuerdo con su origen, los nanomateriales se dividen en dos grupos principales: nanomateriales que se encuentran en la naturaleza, como virus, proteínas, enzimas y minerales; y nanomateriales artificiales que no se encuentran en la naturaleza y requieren algún proceso para su producción [3]. De acuerdo con sus

dimensiones, los nanomateriales se examinan cuatro clases. Cero dimensionales (puntos cuánticos) donde el movimiento de los electrones está confinado en las tres dimensiones, de una dimensión (alambres cuánticos) donde los electrones pueden moverse libremente en la dirección X, de dos dimensiones (películas delgadas) en cuyo caso los electrones libres pueden moverse en el plano X-Y o de tres dimensiones(material nanoestructurado construido con nanopartículas como bloques de construcción) en el que el electrón libre puede moverse en las direcciones X, Y, Z [4].

Las nanopartículas se clasifican generalmente en orgánicas, inorgánicas y basadas en carbono. Los dendrómetros, micelas, liposomas, ferritina se conocen comúnmente como nanopartículas orgánicas o polímeros. Estas nanopartículas son biodegradables, no tóxicas y algunas partículas como las micelas y los liposomas tienen un núcleo hueco, también conocidas como nanocápsulas y son sensibles a la temperatura y radiación electromagnética como calor y luz. Las nanopartículas inorgánicas son partículas que no están formadas por carbono. Las nanopartículas inorgánicas se clasifican generalmente como nanopartículas a base de metal y óxidos metálicos.



**Figura 2.1.** Esquema de materiales de escala nanométrica a macrométrica.

Las nanopartículas que se sintetizan a partir de metales a tamaños nanométricos mediante métodos destructivos o constructivos son nanopartículas a base de metal (nanopartículas metálicas). Los metales comúnmente utilizados para la síntesis de nanopartículas son aluminio (Al), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), hierro (Fe), plomo (Pb), plata (Ag) y zinc (Zn). Las partículas a base de óxidos metálicos son sintetizadas para modificar las propiedades de sus respectivas nanopartículas metálicas. Las nanopartículas de óxido metálico se sintetizan principalmente debido a su mayor reactividad y eficiencia. Estas nanopartículas poseen propiedades excepcionales en comparación a sus homólogas de metal.

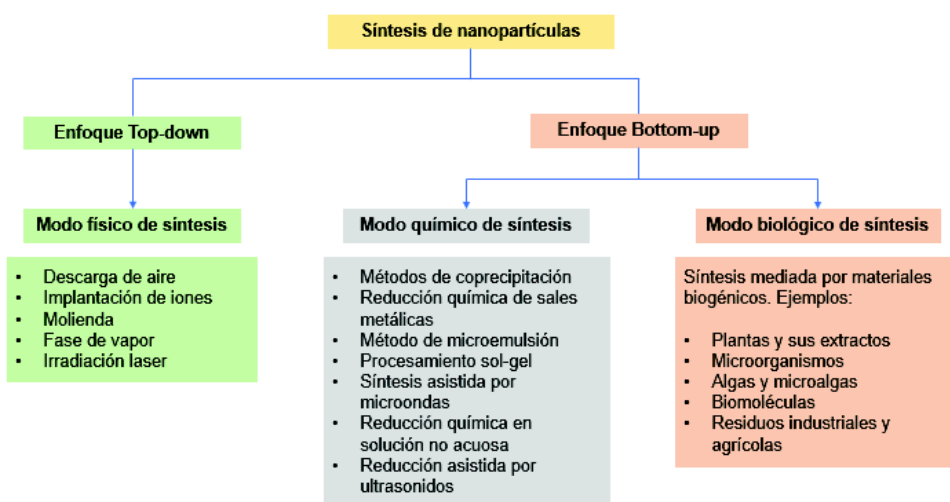
Las nanopartículas han encontrado sus aplicaciones en diversos campos. Las nanopartículas de plata son populares por sus aplicaciones catalíticas, antibacterianas y de eliminación de microorganismos. Otra de sus aplicaciones incluye su uso como material de revestimiento para la absorción de energía solar. Las nanopartículas de oro se utilizan como biosensores en células vivas y pueden conducir al diagnóstico del cáncer [5].

### 2.3 Métodos de Síntesis

Los métodos de fabricación de síntesis de partículas metálicas generalmente pueden involucrar ya sea un enfoque “top-down” o un enfoque “bottom-up”, como son representados en la Fig. 2.2 Los métodos de síntesis top-down (también conocidos por su traducción al español como “de arriba hacia abajo” o ascendentes), consisten en la descomposición de materiales sólidos en pedazos pequeños mediante la aplicación de una fuerza externa. En este enfoque, se utilizan muchas técnicas físicas, químicas y térmicas con las que proporcionar la energía necesaria para la formación de nanomateriales [3]; por ejemplo, síntesis de nanopartículas mediante métodos físicos como la molienda mecánica, pulverización catódica, ablación láser, trituración, entre otros [6].

En la síntesis “bottom-up” (traducida como “de abajo hacia arriba” o ascendente), las nanopartículas están construidas por entidades más pequeñas mediante la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución acuosa. En estos métodos de síntesis, los bloques de construcción nanoestructurados de las nanopartículas se forman primero y luego se ensamblan para producir la partícula final. Este enfoque se basa

principalmente en métodos químicos y biológicos [7]. Sol-gel, deposición química de vapor (CVD por sus siglas en inglés), pirolisis y biosíntesis son los métodos bottom-up más utilizados para la producción de nanopartículas [8].



**Figura 2.2.** Métodos empleados para la síntesis de nanopartículas [6].

Estos dos enfoques tienen ventajas y desventajas entre sí. En el enfoque top-down, que es más costoso de implementar, es imposible obtener superficies y borde perfectos debido a las cavidades y rugosidades que pueden ocurrir en las nanopartículas, esta es una de las principales limitaciones porque las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas dependen en gran medida de la estructura de su superficie [7]; mientras que se puede obtener excelentes resultados de síntesis de nanopartículas mediante el enfoque bottom-up. Además, con la síntesis de abajo hacia arriba, no se forman materiales de desecho que deban eliminarse y se tiene un mejor control de los tamaños por lo que se pueden obtener nanopartículas más pequeñas [3].

## 2.4 Síntesis Verde

Los métodos de síntesis físicos y químicos utilizan agentes reductores para la reducción de iones, y agentes estabilizantes de alta radiación implicados para evitar la aglomeración no deseada de las nanopartículas producidas; dichos agentes implican riesgos de toxicidad para los seres humanos y el medio ambiente. También se cree que las nanopartículas obtenidas por métodos fisicoquímicos pueden llegar a ser tóxicas en términos de su tamaño, forma y química de la superficie.

La síntesis biológica o “síntesis verde”, es una ruta ecológica y de bajo costo que utiliza el potencial de los materiales biológicos para la síntesis de nanopartículas metálicas. La síntesis verde implica la reducción de iones metálicos utilizando masas o extractos biológicos como fuente de reductores, ya sea de forma extracelular o intracelular. Además de la rentabilidad y el respeto al medio ambiente, las ventajas del enfoque biológico sobre los métodos físicos y químicos tradicionales incluyen la eficacia del proceso para catalizar reacciones en medios acuosos a temperatura y presión estándar, así como la flexibilidad del proceso; ya que se puede implementar en casi cualquier entorno y a cualquier escala. Los constituyentes de los materiales biológicos son responsables de la reducción y el proceso a menudo se desencadena por varios compuestos presentes como polifenoles, carbonilos, aminas, grupos amida, proteínas, pigmentos, flavononas, terpenoides, alcaloides y otros agentes reductores. Más de uno de estos grupos pueden ser responsables de la producción de nanopartículas metálicas [9]. La síntesis se puede realizar en un solo paso utilizando organismos biológicos como bacterias, actinobacterias, levaduras, mohos, algas y plantas, o sus productos [3]. Cada uno de estos materiales biológicos posee composiciones químicas y complejidades metabólicas únicas, que reaccionan con los iones metálicos de diferentes maneras, controlando y modificando así los productos de la síntesis de nanopartículas. Entre los reactivos biológicos mencionados anteriormente, los materiales vegetales parecen ser los más adecuados para la “biosíntesis” de nanopartículas a gran escala. Partes de plantas como hojas, raíces, látex, semillas y tallos se utilizan para la síntesis de nanopartículas metálicas. La velocidad de síntesis de los microorganismos es lenta y sólo un número limitado de tamaños y formas son adecuados en comparación con las rutas que involucran materiales de origen vegetal [10].

## 2.5 Síntesis de nanopartículas con extracto de plantas

Al producir nanopartículas utilizando extracto de plantas (fitosíntesi), el extracto se mezcla con una solución acuosa de la sal metálica a temperatura ambiente y normalmente la reacción se completa en minutos. Nanopartículas de plata, oro y de muchos otros metales han sido producidas de esta manera (Tabla 2.1) [7]. Los procesos para fabricar nanopartículas utilizando extractos de plantas son fácilmente escalables y pueden ser menos costosos. Se ha informado que las plantas contienen una gran variedad de antioxidantes y metabolito secundarios.

Para obtener el extracto se utilizan diferentes partes de las plantas frescas o secas, como los frutos, hojas, la cascara, los pétalo y brotes. El proceso de extracción generalmente implica remojar el material vegetal en un solvente verde (como agua o etanol) con o sin agitación seguido de filtración y en algunos casos centrifugación. La ventaja de usar plantas secas para obtención del extracto es que tienen una larga vida útil a temperatura ambiente, a diferencia de la planta seca que tiene que conservarse aproximadamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar cualquier deterioro. Además, el uso de material seco elimina los efectos de las variaciones en los componentes de las plantas a causa de los cambios estacionales.

Varios fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, fenoles, azúcares, proteínas y terpenoides se han confirmado en extractos de diversas plantas para la síntesis de nanopartículas, enfatizando su participación en la biorreducción y estabilización de iones metálicos. Varios factores como la temperatura, las concentraciones del extracto y el pH pueden afectar el tamaño y la forma de las nanopartículas sintetizadas [12,6]. Informes de síntesis de nanopartículas con diferentes plantas muestran una variación dependiente del pH en la forma, tamaño, tasa de producción y estabilidad de las nanopartículas. Las AgNPs sintetizadas con extracto de *C. zeylanicum* (árbol de canela) muestran una gran cantidad de AgNPs pequeñas y estables a pH alcalino, mientras que las nanopartículas de gran diámetro se obtuvieron a pH ácido [13].

**Tabla 2.1.** Biosíntesis utilizando extracto de plantas.

Planta	Metal	Tamaño	Morfología	Referencia
<i>Aloe vera</i>	Au, Ag	50-350 nm	Esférica, triangular	[14]
<i>Apiine extraído de henna (Lawsonia inermis) hojas</i>	Au, Ag	7.5-65 nm	Esférica, triangular, cuasi esférica	[15]
<i>Mimosa púdica</i>	Ag	25-60 nm	Esférica	[16]
<i>Pyrus sp.</i> (extracto de fruta de pera)	Au	200-500 nm	Triangular, hexagonal	[17]
<i>Cinnamomum camphora</i>	Au, Pd	3.2-20 nm	Cúbico hexagonal	[18]
<i>Chenopodium álbum</i>	Ag, Au	10-30 nm	Cuasi esférica	[19]
<i>Acalypha indica</i>	Ag	20-30 nm	Esférica	[20]
<i>Panax ginseng</i>	Au, Ag	10-40, 10-30 nm	Esférica	[21]
<i>Ginseng rojo</i>	Ag	10-30 nm	Esférica	[22]
<i>Nigella sativa</i>	Ag	15 nm	Esférica	[23]
<i>Pinus densifolia</i>	Ag	30-80 nm	Triangular	[24]
<i>Vitex negundo L</i>	Au	10-30 nm	Cúbica	[25]

## 2.6 *Rhizophora mangle*

Los manglares son bosques marinos que se encuentran en las costas de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Son un grupo de plantas halófilas (resistentes a la sal) entre las cuales destacan árboles, arbustos, pastos, helechos terrestres, entre otros. Estos grupos de plantas son altamente evolucionadas y adaptadas para establecerse en la zona intermareal de estuarios, esteros, lagunas y pantanos costeros. Los manglares ofrecen una gran cantidad de beneficios para el hombre y el medio ambiente, ya que una de sus funciones claves es la protección de las líneas costeras de tormentas y huracanes, así como de la erosión eólica y por oleaje; estabilizan los sedimentos, funcionan como filtros biológicos, y además son hábitat de los estadios juveniles de cientos de especies de peces e invertebrados de interés comercial y temporalmente de aves migratorias. Algunos autores señalan que la estructura de los manglares se determina por los aportes de agua de lluvia y por la escorrentía superficial. En zonas áridas y semiáridas la estructura de los arbustos de los manglares

muestra una alta variabilidad y tienden a presentar menor complejidad, menor riqueza de especies, menor altura de dosel y área basal.

En México, los manglares se encuentran presentes en ambos litorales de la costa (Atlántico y Pacífico), cubriendo al menos un 60% de la línea costera nacional. Se cuentan con tres especies comunes en el país: el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), el mangle negro (*Avicennia germinans*) y el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) [26].

El *Rhizophora mangle*, conocido comúnmente como “mangle rojo”, es una especie del reino Plantae, clase Magnoliopsida de la familia *Rhizophoraceae*. *Rhizophora* es uno de los géneros más ampliamente distribuidos entre los taxones de manglares en los trópicos e incluye ocho especies. El *Rhizophora mangle* se encuentra principalmente en los neotrópicos, desde el norte del Golfo de México hasta el sureste de Brasil en la costa atlántica, y desde Baja California, México, hasta Ecuador en la costa del Pacífico. Dicha especie es la más abundante en las comunidades de manglares de México [27]. En Sonora se encuentra principalmente Bahía Kino y dentro del Área Natural Protegida estero El Soldado donde también albergan mangle negro y mangle blanco. El mangle rojo es la especie que generalmente se encuentra en la parte exterior de las lagunas y en los bordes de los canales. Es un arbusto de entre 2 a 25 metros de altura, que en algunos casos alcanza los 35 metros. Se caracteriza por sus raíces en forma de zancos, raíces aéreas, hojas simples y opuestas. Sus flores son pequeñas de color blanco amarillento, y su fruto comienza su desarrollo aún prendido del árbol [26].

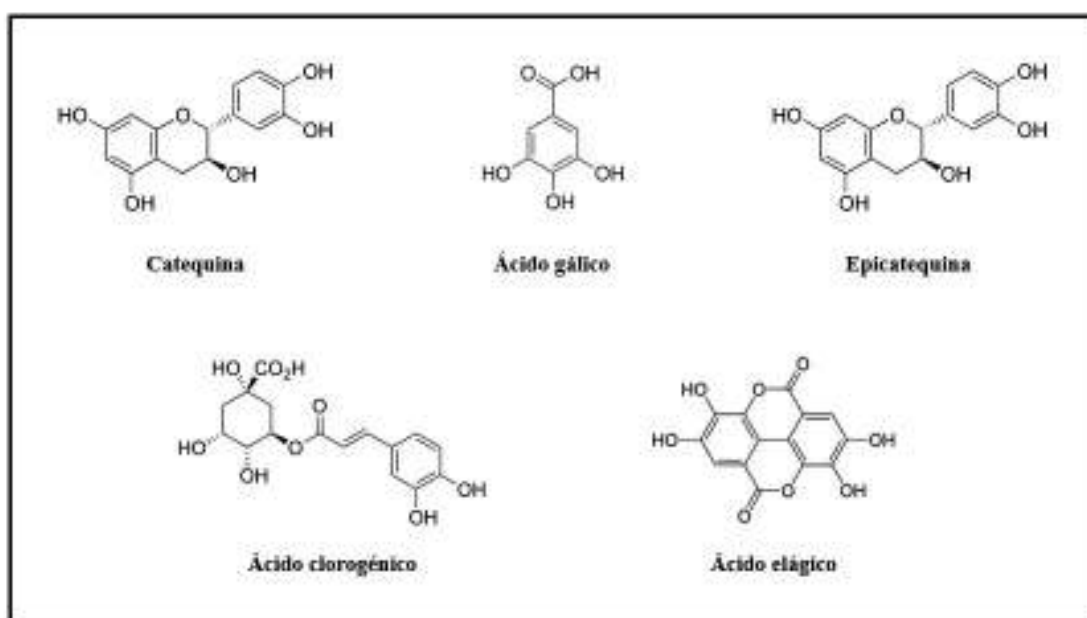
Tradicionalmente, los manglares se han explotado para leña y carbón vegetal y se han utilizado en la construcción de viviendas, muebles, embarcaciones, y en la producción de curtidos para teñir y producir cuero [28]. En México, el *Rhizophora mangle* y tres especies más de manglares se encontraban protegidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994), en la categoría de “protección especial”. Actualmente se encuentran en la NOM-059-SEMARNAT-2010 catalogadas como amenazadas, y en el artículo 60 de la Ley General de la Vida Silvestre (DOF, 01-02- 2007), que prohíbe cualquier cambio que afecte la integridad del ecosistema de dichas especies.

En la medicina tradicional, la corteza de mangle se caracteriza por tener propiedades astringentes, hemostáticas, febrífugas, antifúngicas, antiinflamatorias, antidiarreicas. Su corteza, raíces y hojas se utilizan para el tratamiento de enfermedades de la garganta y la



tuberculosis, la angina de pecho, la curación de la lepra y el asma, úlceras externas e internas, trastornos digestivos, infecciones de la piel y enfermedades venéreas.

El extracto de corteza de *Rizizophora mangle* presenta una composición química variada y compleja, caracterizada por la presencia de polifenoles de bajo peso moléculas: ácido gálico, elágico y clorogénico; catequina y epicatequina (Fig. 2.3). Además, se encontraron galotaninos, elagitaninos, taninos condensados, fitoesteroles, carbohidratos libres y enlazados, ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados, compuestos volátiles y aceites esenciales no volátiles.



**Figura 2.3.** Polifenoles de bajo peso molecular presentes en *Rizópoda mangle* [29].

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos benéficos sustituidos por funciones hidroxilicas. En la actualidad, las investigaciones de estas sustancias fitoquímicas o alimentos funcionales se centran en los posibles efectos beneficiosos para la salud humana, al ser capaces de capturar radicales libres y aumentar la actividad antioxidante. Los polifenoles presentan una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen la actividad anticancerígena, antiinflamatoria,

antihipertensiva, estrogénica, antioxidante, así como efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II. Especialmente, estos componentes pueden ejercer efectos antioxidantes como son el secuestro de radicales libres, donan moléculas de hidrogeno, barren moléculas de superóxido; estas propiedades se atribuyen principalmente al grupo hidroxilo presente en su anillo estructural. Específicamente, la presencia de los ácidos clorogénico y elágico está asociada a la prevención de diabetes tipo II y al tratamiento de enfermedades cardiovasculares. El ácido elágico, presenta propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, es antidiabético, anticancerígeno y antimutagénico, puede inhibir enlaces de ADN de ciertos compuestos cancerígenos, es eficaz en la reducción de la disfunción eréctil inducida por diabetes. Las catequinas se asocian con la inhibición de la trombosis arterial, la reducción del colesterol total y lipoproteína de baja densidad; se les ha atribuido entre otras propiedades la actividad antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena. Los galotaninos han demostrado tener actividad antioxidante y antibacteriana, y se consideran prometedores productos para su uso como aditivos naturales en la elaboración de alimentos. Los elagitaninos se encuentran principalmente en frutas como el mango y las bayas; además de su actividad antioxidante in vitro, han demostrado actividad antibacteriana. Los polifenoles presentan una amplia gama de actividades biológicas; sin embargo, también se describe en la literatura la capacidad de estos compuestos de poseer efectos tóxicos. Se plantea que la toxicidad de los polifenoles es baja en principio, pero pueden ocasionar intolerancias gástricas y estreñimiento. La ingestión de grandes cantidades de taninos puede causar efectos adversos a la salud; sin embargo, el consumo de pequeñas cantidades de algunos de ellos puede ser beneficioso. Los taninos hidrolizables son los que inducen mayor toxicidad, su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula y formar complejos con la pared celular, entre otros. También pueden ligar las proteínas de la piel y de la mucosa, las cuales se transforman en sustancias insolubles. Bajo ciertas condiciones (altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, elevado pH y presencia de hierro) los antioxidantes fenólicos pueden iniciar procesos de autooxidación y comportarse como prooxidantes. Es por esto por lo que se hace necesario, una vez comprobados los efectos farmacológicos, verificar su seguridad. En la literatura se describen estudios preclínicos realizados para estudiar el potencial

toxicológico de formulaciones para uso tópico del extracto acuoso de *Rhizophora mangle*, las cuales han mostrado un amplio margen de seguridad [29].

## 2.7 Toxicidad de los nanomateriales

La síntesis de nanomateriales se puede llevar a cabo mediante los enfoques físicos, químicos y biológicos. Las técnicas físicas y químicas utilizan compuestos tóxicos y consumen mucho tiempo, mientras que las técnicas biológicas son consideradas no tóxicas y seguras. El enfoque biológico para la síntesis de nanopartículas depende de plantas, microorganismos y enzimas. Es sabido que muchas plantas tienen propiedades benéficas y son utilizadas como fuente de alimento, sin embargo, algunas de ellas también pueden ser tóxicas en ciertas condiciones y cantidades. Estudios indican que las plantas que ingerimos pueden poseer un potencial genotóxico o mutagénico. La toxicidad de las plantas puede provenir de contaminantes involucrados de forma directa e indirecta en su crecimiento o por los mismos compuestos químicos vegetales que conforman a la planta. Por ello, diversos estudios de investigación se centran en el estudio de la toxicidad de las plantas comúnmente utilizadas por los humanos. En la actualidad se utiliza ampliamente una gran variedad de nanopartículas que se ofrecen en el mercado por sus aplicaciones diarias. A medida que aumenta la demanda de nanopartículas, el sector de la nanotoxicidad ha crecido significativamente durante los últimos 10 a 15 años, lo cual representa un problema grave en el futuro de la vida y el medio ambiente.

La toxicología es la ciencia cuyo objetivo es examinar los peligros asociados de forma cualitativa y cuantitativa de los materiales tóxicos, así como determinar los entornos que inducen su toxicidad. La investigación en nanotoxicología se aplica a varios campos, incluidos la biología y la patología, pero generalmente a la farmacología y al uso de nanomateriales y nanodispositivos con fines diagnósticos y terapéuticos [30]. Por lo tanto, uno de los objetivos principales de los toxicólogos es examinar ensayos en diferentes modelos biológicos, óptimos para indicar con precisión los efectos citotóxicos que inducen las nanopartículas a los seres humanos y al medio ambiente.

El enfoque para la evaluación de toxicidad en modelos biológicos se divide en in vivo e in vitro. Para las pruebas in vivo se han investigado una gran cantidad de modelos con animales de laboratorio, generalmente ratas y ratones, los cuales siempre deben contar con la aprobación de organismos reguladores que garanticen un trato ético para los animales. Estos ensayos se enfocan en las vías de exposición más comunes de las nanopartículas, es decir, pulmonar, oral, dérmica y otros tejidos expuestos. Sin embargo, los costos de estas pruebas son muy elevados y la mano de obra muy intensa. Por otro lado, la estimación in vitro de la toxicidad de las nanopartículas es una de las técnicas esenciales que son rápidas, de bajo costo y con un mínimo de preocupaciones éticas. Estas pruebas se realizan fuera de organismos vivos generalmente en tejidos, células u órganos. Los métodos se subcategorizan en apoptosis, necrosis, daños al ADN y ensayos de estrés oxidativo [31].

## 2.8 Modelos de toxicidad de nanopartículas en organismos marinos

Con el incremento de desarrollo de nanomateriales y con ello sus diversas aplicaciones como pintura, protector solar, catalizadores, biomedicina, etc., y siendo los cuerpos de agua el final de los desechos por el desplazamiento natural sea por escurrimiento (usar otra palabra), los materiales interacción y una creciente amenaza potencial para la salud de los organismos acuáticos, provocando un impacto negativo ecológico al dañar la cadena trófica y volviéndose un problema de salud al finalmente ser consumido por el ser humano. Se han realizado diversos estudios de organismos marinos y su respuesta a nanomateriales (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Estudios de toxicidad en distintos organismos marinos.

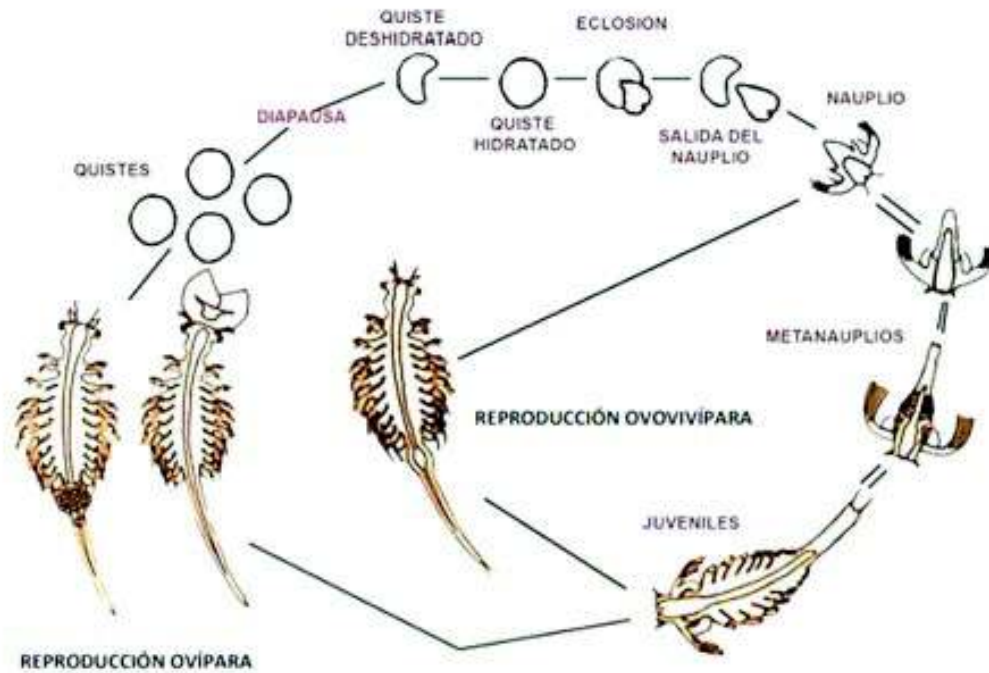
Especie	Material	Tamaño	Forma	Efecto biológico	Fuente
<i>Daphnia magna</i>	Plata Síntesis química	50-60 nm	Cuasiesfericas	>78% en su máxima concentración	[32]
<i>Danio rerio</i>	Plata Síntesis verde	7 nm	Esféricas	Citotoxicidad y embriotoxicidad	[33]
<i>Danio rerio</i>	Oro	20-50 nm	Varilla	Actividad enzimática / Viabilidad	[34]
<i>Littopenaus vannamei</i>	Plata	10 nm	Esféricas	Inhibición bacteriana	[35]

### 2.8.1 *Artemia Franciscana*

*Artemia* es un género de crustáceo acuático comúnmente conocido como camarón de salmuera y se encuentra distribuido en cuerpos de agua salada en el mundo, dependiendo la localización geográfica se pueden dividir en distintas especies, siendo la cepa *Artemia franciscana* la perteneciente a America del Norte, Sur y Centro [36].

### 2.8.2 Ciclo de vida de la *Artemia Franciscana*

*Artemia franciscana* puede encontrarse distribuida en lagos, estanques y regiones cercanas a la costa donde predomine el agua salada. Durante una época del año, la artemia comienza la producción de quistes, los cuales pueden ser arrojados a tierra por el oleaje y viento. En lugares secos el quiste se mantendrá metabólicamente inactivo y no seguirá su desarrollo. Una vez que los quistes son inmersos en agua de mar, proceden a hidratarse, con lo que cual el desarrollo del organismo continua, siendo necesarias condiciones de temperatura y salinidad optimas, le tomará alrededor de 24 horas al quiste eclosionar y continuará con su desarrollo pasando por distintas fases hasta llegar a su etapa reproductiva (Figura 1.4).



**Figura 2.4.** El ciclo de vida de artemia (Modificada de Sanchez, 2018)

### 2.8.3 Artemia en acuicultura

Debido a su fácil manejo y rápida reproducción, artemia es uno de los organismos más utilizados en la acuicultura como alimento de diversas especies, su riqueza en proteínas y ácidos grasos insaturados hacen del organismo una fuente nutricional de importancia [37]. *Artemia franciscana* es un organismo filtrador no selectivo por lo que también es utilizado como vector de fármacos o incluso ácidos grasos debido a que depara con fines terapéuticos en organismos acuáticos [42].

### 2.8.4 Toxicidad en *Artemia franciscana*

*Artemia franciscana* es un organismo que ha funcionado como modelo para evaluar los efectos tóxicos de los nanomateriales en recientes años. Esto debido a su fácil cultivo, manejo y corto ciclo de vida con lo cual se ha evaluado desde la eclosión del quiste de artemia, en la tabla de abajo se pueden ver las distintas cepas de artemia que se probaron.

**Tabla 2.3.** Efectos biológicos de nanopartículas observados en artemia salina y Artemia franciscana.

<b>Especie</b>	<b>Material</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Efecto biológico</b>	<b>Fuente</b>
<i>Artemia salina</i>	AgNPs	<100 nm	Esfericas	LC <sub>50</sub> de 3521.13mg/ L	[3]
<i>Artemia salina</i>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	>300nm	Esfericas	LC <sub>50</sub> 230mg/L	[39]
<i>Artemia franciscana</i>	TiO <sub>2</sub> NPs CuONPs y ZnONPs	No definen		Toxicidad mayo/menor CuO>TiO <sub>2</sub> >ZnO	[40]
<i>Artemia franciscana</i>	Plata	13 nm	Esféricas	Acarreador de nanopartículas	[41]

## Referencias

- [1] Glortzer, S. (2015). Nanoscience vs Nanotechnology-Defining the field. *American Chemical Society*. 9(3), 2215-2217.
- [2] Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*. 34(12), 1318-1321.
- [3] Nadaroglu, H., GÜNGÖR, A. A., & Selvi, İ. N. C. E. (2017). Synthesis of nanoparticles by green synthesis method. *International Journal of Innovative Research and Reviews*, 1(1), 6-9.
- [4] Mageswari, A., Srinivasan, R., Subramanian, P., Ramesh, N., & Gothandam, K. M. (2016). Nanomaterials: classification, biological synthesis and characterization. In *Nanoscience in Food and Agriculture 3* (pp. 31-71). Springer, Cham.
- [5] Shukla, A. K., & Iravani, S. (2017). Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 223-231.
- [6] Rana, A., Yadav, K., & Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 122880.
- [7] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.
- [8] Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017, November). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 263, No. 3, p. 032019). IOP Publishing.
- [9] Vijayaraghavan, K., & Ashokkumar, T. (2017). Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: a review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(5), 4866-4883.
- [10] Kharissova, O. V., Dias, H. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., & Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 31(4), 240-248.
- [11] Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31(2), 346-356.



- [12] Latif, M. S., Abbas, S., Kormin, F., & Mustafa, M. K. (2019). Green synthesis of plant-mediated metal nanoparticles: The role of polyphenols. *Asian J. Pharmaceut. Clin. Res*, 12(7), 75-84.
- [13] Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., & Patil, S. V. (2014). Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(1), 1-29.
- [14] 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.
- [15] Kasthuri, J., Veerapandian, S., & Rajendiran, N. (2009). Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 55-60.
- [16] Marimuthu, S., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirthi, A. V., Jayaseelan, C., ... & Kamaraj, C. (2011). Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites. *Parasitology research*, 108(6), 1541-1549.
- [17] Ghodake, G. S., Deshpande, N. G., Lee, Y. P., & Jin, E. (2010). Pear fruit extract-assisted room-temperature biosynthesis of gold nanoplates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(2), 584-589.
- [18] Yang, X., Li, Q., Wang, H., Huang, J., Lin, L., Wang, W., ... & Jia, L. (2010). Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of Cinnamomum camphora leaf. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1589-1598.
- [19] Dwivedi, A. D., & Gopal, K. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 369(1-3), 27-33.
- [20] Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. J. C. S. B. B. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50-56.

- [21] Singh, P., Kim, Y. J., & Yang, D. C. (2016). A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by *Panax ginseng* leaves. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(8), 1949-1957.
- [22] Singh, P., Kim, Y. J., Wang, C., Mathiyalagan, R., El-Agamy Farh, M., & Yang, D. C. (2016). Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(3), 811-816.
- [23] Amooaghaie, R., Saeri, M. R., & Azizi, M. (2015). Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 400-408.
- [24] Velmurugan, P., Park, J. H., Lee, S. M., Jang, J. S., Lee, K. J., Han, S. S., ... & Oh, B. T. (2015). Synthesis and characterization of nanosilver with antibacterial properties using *Pinus densiflora* young cone extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 147, 63-68.
- [25] Zargar, M., Hamid, A. A., Bakar, F. A., Shamsudin, M. N., Shameli, K., Jahanshiri, F., & Farahani, F. (2011). Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. *Molecules*, 16(8), 6667-6676.
- [26] Valenzuela, M. B., & Jáuregui, S. Técnicas de colecta, siembra y trasplante, tasas de mortalidad y sus causantes de Mangle Rojo (*Rhizophora mangle*), Mangle Negro (*Avicennia germinans*) y Mangle Blanco (*Laguncularia racemosa*) en el Área Natural Protegida estero El Soldado, Guaymas, Sonora.
- [27] Núñez-Farfán, J., Domínguez, C. A., Eguiarte, L. E., Cornejo, A., Quijano, M., Vargas, J., & Dirzo, R. (2002). Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. *Evolutionary Ecology Research*, 4(7), 1049-1064.
- [28] Cruz, S. M., Marroquín, N., Alvarez, L. E., Chang, D. E., & Cáceres, A. (2015). Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2(1), 12-12.

- [29] Regalado, A. I., Sánchez, L. M., & Mancebo, B. (2016). *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(1), 1-17.
- [30] Arumugam, D. G., Sivaji, S., Dhandapani, K. V., Nookala, S., & Ranganathan, B. (2019). Panchagavya mediated copper nanoparticles synthesis, characterization and evaluating cytotoxicity in brine shrimp. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 19, 101132.
- [31] Siddhardha, B., Dyavaiah, M., & Kasinathan, K. (Eds.). (2020). *Model Organisms to Study Biological Activities and Toxicity of Nanoparticles*. Springer Nature.
- [32] İçoglu Aksakal, F., Yilmaz, A., Koc, K., & Özdemir, S. (2021). A comparative study on aquatic toxicity of chemically-synthesized and green synthesis silver nanoparticles on daphnia magna. *International Journal of Environmental Health Research*, 1-11.
- [33] Machado, S., González-Ballesteros, N., Gonçalves, A., Magalhães, L., de Passos, M. S. P., Rodríguez-Argüelles, M. C., & Gomes, A. C. (2021). Toxicity in vitro and in Zebrafish Embryonic Development of Gold Nanoparticles Biosynthesized Using Cystoseira Macroalgae Extracts. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 5017-5036.
- [34] Souza, J. P., Mansano, A. S., Venturini, F. P., Marangoni, V. S., Lins, P. M., Silva, B. P., ... & Zucolotto, V. (2021). Toxicity of gold nanorods on *Ceriodaphnia dubia* and *Danio rerio* after sub-lethal exposure and recovery. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(20), 25316-25326.
- [35] Alvarez-Cirerol, F. J., López-Torres, M. A., Rodríguez-León, E., Rodríguez-Beas, C., Martínez-Higuera, A., Lara, H. H., ... & Iñiguez-Palomares, R. A. (2019). Silver nanoparticles synthesized with *Rumex hymenosepalus*: A strategy to combat early mortality syndrome (EMS) in a cultivated white shrimp. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- [36] Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., & Versichele, D. (1986). *Manual for the culture and use of brine shrimp Artemia in aquaculture*.
- [37] Moraga, P., Ávila, R., & Vilaxa, A. (2015). Salinidad y temperatura óptimas para reproducción ovípara y desarrollo de *Artemia franciscana*. *Idesia (Arica)*, 33(1), 85-92.

- [38] Kachenton, S., Whangpurikul, V., Kangwanrangsang, N., Tansatit, T., & Jiraungkoorskul, W. (2018). Silver nanoparticles toxicity in brine shrimp and its histopathological analysis. *International Journal of Nanoscience*, 17(06), 1850007.
- [39] Wang, C., Jia, H., Zhu, L., Zhang, H., & Wang, Y. (2017). Toxicity of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. *Science of the Total Environment*, 598, 847-855.
- [40] Khoshnood, R., Jaafarzadeh, N., Jamili, S., Farshchi, P., & Taghavi, L. (2017). Acute toxicity of TiO<sub>2</sub>, CuO and ZnO nanoparticles in brine shrimp, *Artemia franciscana*.
- [41] Alvarez-Cirerol, F. J., López-Torres, M. A., Rodríguez-León, E., Rodríguez-Beas, C., Martínez-Higuera, A., Lara, H. H., ... & Iñiguez-Palomares, R. A. (2019). Silver nanoparticles synthesized with *Rumex hymenosepalus*: A strategy to combat early mortality syndrome (EMS) in a cultivated white shrimp. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- [42] Aguilar-Aguila, A., Mansir, A. T., & Manriquez, A. R. (1994). Using brine shrimp as a drug carrier for therapeutic applications in aquaculture. *Aquacultural engineering*, 13(4), 301-309.

## Capítulo 3

### Técnicas Experimentales

#### 3.1 Espectroscopía de absorción UV-vis

La espectroscopía de absorción ultravioleta y visible (UV-vis) es la medición de la atenuación de la radiación electromagnética por una sustancia o agente absorbedor. A la espectroscopía UV-vis también se le conoce como espectrofotometría UV-vis. El término espectrofotometría se refiere a la realización de mediciones cuantitativas mediante esta técnica, como puede ser la estimación de la concentración de un analito o agente absorbedor en una muestra al medir la absorbancia de la muestra en cuestión. Por su parte, el término espectroscopía se usa cuando registramos la “huella espectroscópica” o el espectro de absorción o transmisión en un rango de longitudes de onda. En general ambos términos son utilizados indistintamente para referirse a esta técnica.

Generalmente los equipos de espectroscopía UV-vis trabajan en el rango de longitudes de onda de 190-900nm. El límite de longitudes de onda más cortas está impuesto por la absorción de los gases atmosféricos en la región ultravioleta en longitudes de onda menores a 180nm, de tal manera que si deseamos medir en 200-175nm se debe purgar con nitrógeno el espacio donde la muestra es alojada. El límite de longitudes de onda grandes está determinado por la naturaleza del detector. Por ejemplo, espectrómetros equipados con detectores de silicio alcanzan hasta 1100nm, mientras que otros espectrómetros pueden extender su rango hasta la región del cercano infra-rojo (NIR) a 3300nm. En la tabla 3.1 se presentan las distintas regiones en que suele dividirse el espectro electromagnético en la espectroscopía UV-vis [1].

**Tabla 3.1.** Aproximaciones de longitud de onda, Energías y Tipos de Excitación para Diferentes Regiones Espectrales

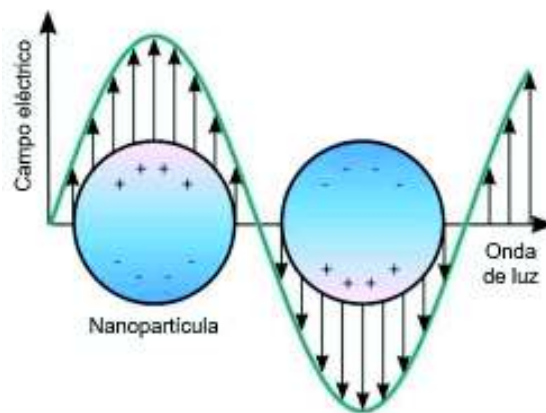
Región Espectral	Región de longitud de onda (nm)	Rango de Energía (cm <sup>-1</sup> )	Rango de Energía (eV)	Tipo de Excitación
Vacío-UV	10180	1×10 <sup>6</sup> -56,000	120-6.9	Electrónica
UV	180400	56,000-25,000	6.9-3.1	Electrónica
Visible	400-750	25,000-13,300	3.1-1.6	Electrónica
NIR	750-2,500	13,300-4,000	1.6-0.50	Electrónica, connotaciones vibracionales
IR	2,500-25,000	4,000-400	0.50-0.050	Vibraciones, fonones

El uso de la espectroscopía UV/vis en la investigación de materiales puede dividirse en dos grandes categorías: 1) mediciones cuantitativas del analito en las distintas fases (sólida o líquida, principalmente) y 2) caracterización de las propiedades ópticas y electrónicas de un material. La gran utilidad de esta técnica en las estimaciones cuantitativas proviene de la relación lineal que existe entre la absorbancia medida y la concentración del agente absorbedor como lo veremos más adelante en la ley de Beer-Lambert. Estas aplicaciones incluyen la cuantificación de constituyentes o dopantes e incluso podemos monitorear las concentraciones de reactantes, precursores o productos conforme una reacción se lleva a cabo [2]. La segunda aplicación general de la espectroscopía UV-vis es la caracterización de materiales metálicos, semiconductores y aislantes ya que se emplea para caracterizar la absorción, transmisión y reflectancia de una gran variedad de materiales relevantes tecnológicamente como son semiconductores para electrónica, hospederos laser de estado sólido, materiales para la conversión de energía solar, pigmentos, recubrimientos, filtros ópticos y sistemas nanométricos de partículas metálicas y semiconductoras [3].

La energía de los fotones en el rango UV-vis poseen la suficiente energía para promover electrones a estados electrónicos de mayor energía en las moléculas y materiales haciendo esta técnica útil en la determinación de las propiedades ópticas y electrónicas de una basta variedad de materiales. En la figura 1 se muestra un espectro de absorción para la excitación electrónica de una molécula las cuales suelen ocurrir en las regiones UV o visibles del espectro.

### 3.1.1 El plasmón de resonancia de superficie

La resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR, por sus siglas en inglés) es un fenómeno óptico generado por una onda de luz atrapada dentro de nanopartículas conductoras (NP) más pequeñas que la longitud de onda de la luz. El fenómeno es el resultado de las interacciones entre la luz incidente y los electrones de superficie en una banda de conducción. Esta interacción produce oscilaciones de plasmones localizados coherentes con una frecuencia de resonancia que depende en gran medida de la composición, el tamaño, la geometría, el entorno dieléctrico y la distancia de separación partícula-partícula de las NP. Los materiales comunes utilizados para la producción de NP son metales nobles como Ag y Au, que debido a los niveles de energía de las transiciones  $d - d$  exhiben LSPR en el rango visible del espectro [4].



**Figura 3.1.** Diagrama esquemático que ilustra el plasmón de superficie localizado en una superficie de nanopartículas [5].

Para comprender los factores que afectan el gran aumento de la absorción y la dispersión cuando se produce la resonancia, a menudo se evoca la teoría de Mie. La teoría de Mie es una solución analítica a las ecuaciones de Maxwell con condiciones de contorno esféricas, que se utiliza para describir los espectros de extinción de una nanopartícula determinada. Para calcular con mayor precisión las constantes dieléctricas en los diferentes valores de longitud de onda y extender esta teoría a formas más complejas, se utiliza la Aproximación de Longitud de Onda Larga Modificada (Modified Long Wavelength Approximation, MLWA) de la teoría de Mie:

$$C_{\text{ext}} = \frac{24 \pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2} N}{\lambda \ln(10)} \frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + \chi \epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2} \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde R es el radio de la partícula,  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz incidente,  $\epsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio circundante,  $\epsilon = \epsilon_r + i\epsilon_i$  es la constante dieléctrica compleja del metal a granel, N es la densidad electrónica, y  $\chi$  explica la forma de la partícula. Este "factor de forma",  $\chi$ , modela las partículas como una elipse y es proporcional a a/b donde a y b son los ejes menor y mayor, respectivamente, de la elipse. Como se muestra en la Ec. 3.1, muchos factores como la forma de la nanopartícula, la longitud de onda de la luz incidente, el tipo de material y el medio circundante influyen en los procesos de absorción y dispersión.

Cuando un analito biológico se une a la superficie de la nanopartícula, se induce un cambio en el índice de refracción en la superficie de la nanopartícula, que a su vez cambia la frecuencia máxima de LSPR. Este cambio de frecuencia de LSPR también se ve afectado por la composición de la nanopartícula y su forma. Además, las nanopartículas de forma asimétrica también son más sensibles a los cambios en la unión superficial biomolecular que los coloides esféricos. El cambio en la frecuencia de LSPR tras la unión del adsorbato se ha descrito mediante la siguiente relación [5]:

$$\Delta\lambda = m (\Delta n) \left[ 1 - \exp\left(\frac{-2d}{l_d}\right) \right] \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde m es la sensibilidad del índice de refracción (en nm por unidad de índice de refracción, UIR),  $\Delta n$  es el cambio en el índice de refracción (en UIR), d es el espesor efectivo de la capa adsorbida (en nm) y  $l_d$  es la longitud de desintegración del campo EM característico (en nm).

### 3.1.2 Evaluación de la Cinética de Formación por Espectroscopía UV-vis *in situ*

La evolución de las curvas de cinética de formación de las nanopartículas obtenidas mediante espectroscopía Uv-vis *in situ* pueden proporcionar información valiosa acerca de los procesos de nucleación y crecimiento de las nanopartículas. Se sabe que la síntesis de las nanopartículas se realiza en varias fases. En la primera fase, a través de dos pasos interconectados, una formación de pequeños núcleos o agregados de varios átomos toma

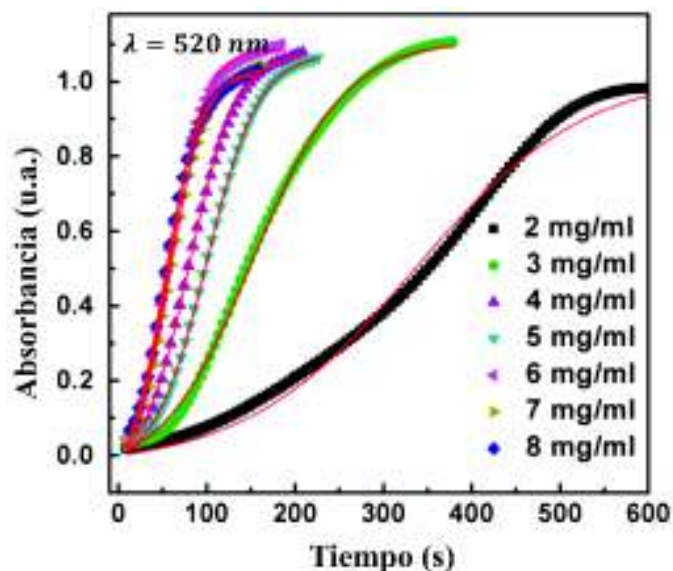


lugar a través de la reducción de los iones metálicos del precursor ( $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$  o  $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$  en nuestro caso) y estos núcleos rápidamente se agregan para formar nanopartículas muy pequeñas. Esta primera fase de la reacción es reflejada en un incremento lento de la señal de absorbancia medida en la longitud de onda del máximo  $\lambda_{Max}$  del plasmón de resonancia de las respectivas nanopartículas (450 nm para las nanopartículas AgMR y 540 nm para AuMR). En la segunda fase de la reacción, las partículas inicialmente formadas son ahora suficientemente grandes para el crecimiento auto catalítico y crecen por lo tanto de forma rápida hasta su tamaño final, lo cual se ve reflejado por el rápido crecimiento de la señal de absorción. En la última fase de la reacción un proceso de recristalización de las nanopartículas formadas toma lugar dependiendo de sus tamaños. Esta fase de la reacción es reflejada por una muy lenta y casi desapercibido crecimiento de la curva de cinética [6]. Dentro del contexto de la síntesis verde de nanopartículas se ha propuesto un modelo matemático conocido como redox-cristalización que permite el análisis cuantitativo de las curvas de cinética de crecimiento con comportamiento sigmoideal al ajustar los datos experimentales mediante la siguiente ecuación

$$A_t = A_{max} \left( 1 - \frac{k_1 + k_2}{k_1 e^{(k_1+k_2)t} + k_2} \right) \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde

$A_t$  es la absorbancia al tiempo  $t$  del plasmón de resonancia de superficie;  $A_{max}$  es la absorbancia máxima alcanzada en la síntesis;  $k_1$  es la constante de la velocidad de nucleación y  $k_2$  es la constante de la tasa de crecimiento de las nanopartículas [7]. En la figura 1 se muestran algunas curvas de cinética de crecimiento de nanopartículas de oro a distintas concentraciones de precursor metálico y reducidas con extractos de hojas de *Cinnamomum Camphor*. Los datos experimentales son ajustados con el modelo de la ecuación 2.3.



**Figura 3.2** Cinética de formación por espectroscopía UV-vis *in situ* de nanopartículas de oro sintetizadas variando la concentración de precursor metálico. Las líneas rojas corresponden al ajuste por el modelo redox-cristalización [7].

Para obtener las curvas de cinética de formación de las nanopartículas en nuestro trabajo se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 45 de doble haz como el mostrado en la figura 3.2.



**Figura 3.3.** Espectrofotómetro de doble haz Lambda 45 (Perkin-Elmer).

El monocromador del espectrofotómetro UV-vis se posiciona en la longitud de onda del plasmón de resonancia de las nanopartículas. Para el caso de las nanopartículas de oro

(AuMR) se fijó el valor en 545 nm y para las nanopartículas de plata (AgMR) en 460 nm. La síntesis se efectuó en celdas de cuarzo bajo agitación magnética a lo largo de la síntesis *in situ* dentro del espectrofotómetro a lo largo de 20 minutos, registrando la absorbancia cada segundo a partir del momento en que se agrega el precursor metálico en la celda que contiene inicialmente solvente con el extracto de mangle rojo.

### 3.2 DPPH

El método de eliminación de radicales libres de  $\alpha$ -difeníl- $\beta$  picrilhidrazilo (DPPH) ofrece el primer enfoque para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, un extracto u otras fuentes biológicas. Es un método simple, en el que el compuesto o extracto a estudiar se mezcla con una solución DPPH y se registra la absorbancia después de un periodo de tiempo definido [8].

Los antioxidantes son moléculas que pueden interactuar e inhibir el inicio o propagación de reacciones oxidantes en cadena generadas por radicales libres reactivos antes de que las moléculas vitales se dañen. Pueden causar enfermedades como cáncer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, trastornos cardiovasculares y enfermedades neurológicas. Los antioxidantes son producidos de forma natural y mediante procesos sintéticos. Estos pueden inhibir la reactividad de los radicales libres a través de distintos mecanismos que incluyen la donación de hidrógeno, la captación de radicales y la extinción del oxígeno singlete [9].

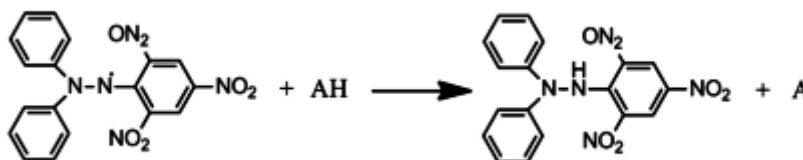
El ensayo se basa en la medición de la capacidad antioxidante hacia el radical libre DPPH. El electrón impar del átomo de nitrógeno en el DPPH se reduce al recibir un átomo de hidrógeno de los antioxidantes a la correspondiente hidracina. El DPPH se caracteriza como un radical libre estable debido a la deslocalización del electrón de reserva sobre la molécula en su conjunto, por lo que las moléculas no se dimerizan como sucede en la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón de reserva también da lugar a un color violeta intenso, con una absorción en torno a 520 nm en solución de etanol. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que tiene la capacidad de donar un átomo de hidrógeno, se produce una pérdida del color violeta.

Representando el radical libre DPPH por  $Z^*$  y la molécula donante por  $AH$ , la reacción primaria es



Donde  $ZH$  es la forma reducida y  $A^*$  es el radical libre producido. Este último radical libre sufrirá reacciones adicionales que controlaran la estequiometría general (figura 3.4).

El radical DPPH restante se mide con un espectrofotómetro UV-vis a aproximadamente 515-520 nm para determinar la actividad antioxidante. Esta prueba proporciona información sobre la capacidad del antioxidante para donar átomos de hidrógeno, la reacción reductora y mecanismos entre el radical libre y el antioxidante [8,9].



**Figura 3.4.** Reacción de antioxidantes y radicales libres DPPH. AH es una molécula donante de antioxidantes y A es el radical libre producido [9].

La actividad captadora de radicales libres de un extracto de corteza de mangle rojo (MR-Ex) fue evaluada por el método del DPPH (2,2-difenil-1-picryl hidrazil). El porcentaje de decoloración del radical DPPH se calculó midiendo la caída en la absorbancia a 520 nm mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left( \frac{1 - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de la referencia. Con ello se logró determinar la concentración de extracto requerida para decolorar el radical DPPH en un 50% respecto al valor de referencia o en ausencia del extracto. A dicha concentración se le denomina concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ). Para el ensayo se preparó una solución de DPPH en alcohol a una concentración de 300  $\mu\text{mol/L}$ , de los cuales 100  $\mu\text{L}$  de DPPH se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de MR-Ex a una concentración de 97.5  $\mu\text{g/mL}$ . El proceso se realizó en la oscuridad por 30 minutos y la absorbancia se midió en una lectora de placas

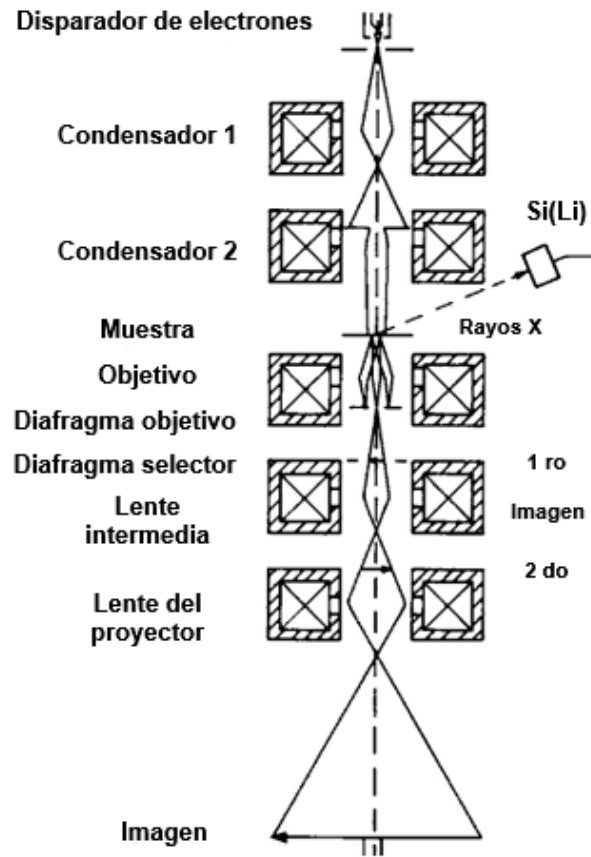
a una longitud de onda de 520 nm. Las muestras se evaluaron para 25, 12.5, 6.75, and 3.75  $\mu\text{g/mL}$ . Como controles de comparación se utilizaron vitamina C y catequina, ambas a concentración de 70  $\mu\text{M}$ .

### 3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En un microscopio electrónico de transmisión convencional (TEM) una muestra muy delgada (menor a 150 nm) es irradiada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme. Los equipos de microscopía electrónica de transmisión comunes trabajan con voltajes de operación entre 100 kV y 200 kV aunque existen equipos que llegan a trabajar con voltajes mayores. Los microscopios electrónicos de ultra-alto voltaje son equipos que aceleran electrones con voltajes de 1MV o mayores. La longitud de onda asociada a electrones de 1 MV es del orden de 0.00087 nm, lo que proporciona una resolución cercana a 0.1 nm; sin embargo, los equipos modernos han apostado a mejorar las aberraciones asociadas a los instrumentos por lo que microscopios electrónicos equipados con correctores de aberración esférica y cromática trabajando a tan solo 80 kV han logrado resoluciones por debajo de 1 Å [10]. En la figura 3.5 se muestra un esquema de los constituyentes básicos de un equipo TEM equipado con la técnica de espectroscopía de energías dispersivas de rayos x (EDS). Los electrones son emitidos en el cañón de electrones por emisión de campo. Este tipo de cañón es usado cuando se requiere contar con un haz de electrones altamente brillante y de gran coherencia, es decir, de baja dispersión en las longitudes de onda de los electrones emitidos. Un conjunto de lentes condensadoras permite la variación de la apertura de iluminación y controlar el área que ilumina a la muestra. Posteriormente, cuando los electrones atraviesan la muestra, el haz de electrones es controlado por un sistema de lentes que permiten enfocar y finalmente proyectar la imagen con la información de la muestra sobre una pantalla fluorescente acoplada por fibra óptica a una cámara CCD.

Las aberraciones de las lentes objetivas son tan grandes que hacen necesario el trabajar con aperturas de objetivos sumamente pequeñas, del orden de 10-25 mrad para poder alcanzar resoluciones del orden de 0.1-0.3 nm. La imagen de campo claro se produce interceptando los electrones dispersos a través de ángulos mayores que la apertura del objetivo (contraste de dispersión) o por interferencia entre la onda dispersa y la onda incidente en el punto de la

imagen (contraste de fase). Adicionalmente, en los equipos modernos de TEM es posible obtener haces de electrones de tamaños nanométricos con diámetros entre 0.2-10 nm gracias a un sistema adicional de lentes condensadoras. Esto posibilita al instrumento el poder trabajar en el modo de barrido (STEM, Microscopio electrónico de transmisión en modo barrido) con una resolución determinada por el diámetro de la sonda o haz de electrones seleccionado.



**Figura 3.5.** Esquema de los componentes básicos de un equipo TEM y de la trayectoria del haz de electrones hasta formar la imagen [11].

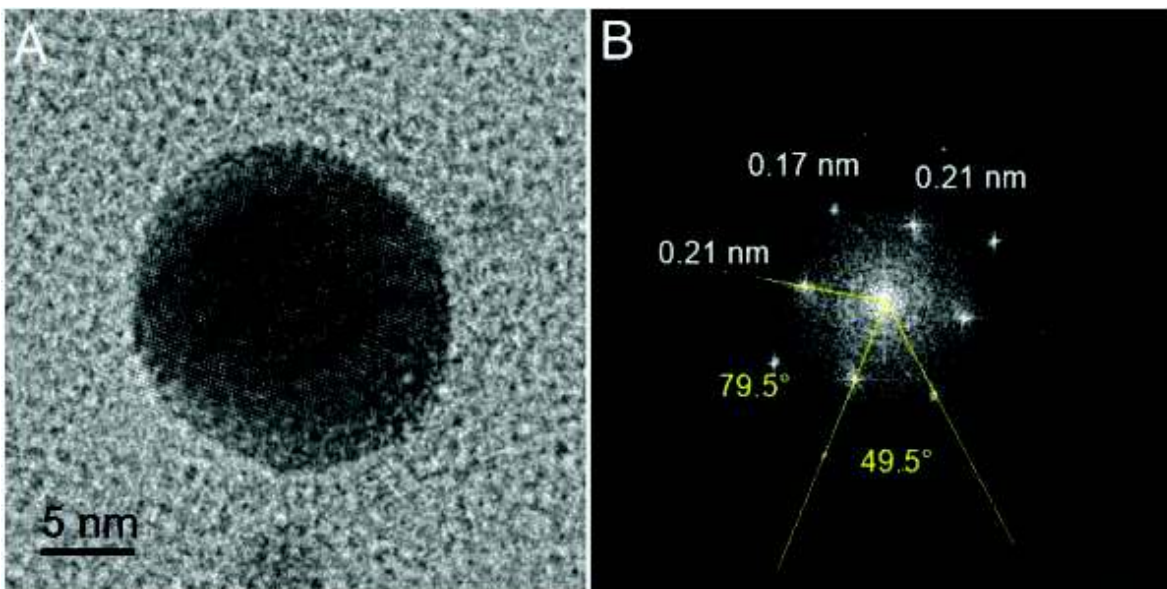
La longitud de onda teórica asociada a los electrones puede determinarse por la relación de De Broglie en su aproximación no relativista:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2m_0E}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

Donde  $h = 6.6256 \times 10^{-34} Js$  es la constante de Planck,  $p$  es el momento lineal de los electrones,  $m_0 = 9.1091 \times 10^{-31} kg$  es la masa en reposo de los electrones y  $E$  es su energía cinética. Esta energía es cuantitativamente igual al voltaje de operación del microscopio (200 kV en nuestro caso) pero expresada en unidades de  $eV$  y debemos aplicar el factor de conversión de  $1 eV = 1.602 \times 10^{-19} J$  para trabajar en unidades del sistema Internacional.

El valor teórico de  $\lambda$  asociado a electrones acelerados con voltajes de 200 kV, de acuerdo a la Ec.1, es de  $\lambda = 0.00274 nm$  y el límite de resolución espacial del equipo TEM utilizado en este trabajo es de 82 pm (0.082 nm).

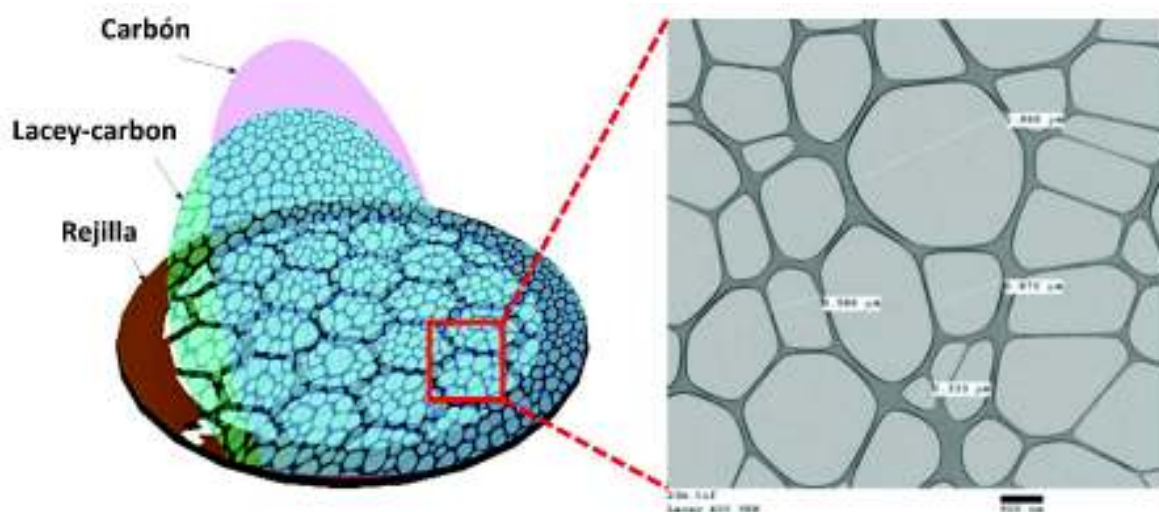
En el modo de alta resolución (HRTEM) es posible obtener información muy puntual sobre la naturaleza cristalina de los materiales caracterizados. Por ejemplo, con ayuda del software Digital Micrograph para el procesamiento de imágenes de TEM y el software Image J es posible identificar la fase cristalina de una nanopartícula individual tal como se ilustra en la figura 3.6 se observa una imagen HRTEM para una nanopartícula de plata y su respectiva FFT (transformada rápida de Fourier) de donde es posible obtener las distancias asociadas a las familias de planos existentes en la estructura cristalina. En este caso, comparando en bases de datos los diversos registros de fichas cristalográficas para la plata se concluye que la fase cristalina corresponde a una estructura hexagonal 4H de plata.



**Figura 3.6.** (A) Imagen de alta resolución (HRTEM) de nanopartícula individual de plata y (B) corresponde a la respectiva Transformada rápida de Fourier (FFT) [12].

Debido a que los electrones del haz que incide sobre la muestra interactúan fuertemente con los átomos de ésta produciendo dispersión elástica e inelástica, es necesario entonces que la muestra sea de un espesor del orden de 5-100 nm para energías mayores a 100 keV.

En nuestro caso, dado que nuestros materiales a estudiar son nanopartículas metálicas (Ag y Au) en dispersiones acuosas, utilizamos rejillas especialmente diseñadas para el análisis por TEM. En particular las rejillas empleadas son de níquel, con soporte “lacey-carbon” y con malla 300. El diámetro estándar de estas rejillas es de 3.05 mm. En la figura 3.7 se muestra un dibujo correspondiente al tipo de rejilla utilizada y una imagen de microscopía electrónica de barrido de la apariencia del entramado “lacey - carbon” que sirve como soporte para las nanopartículas. Una gota de 10  $\mu$ l de dispersión coloidal de nanopartículas es depositada sobre la rejilla y se espera a que seque a temperatura ambiente por 12 horas mínimamente previas a su observación por TEM.



**Figura 3.7.** Rejillas para estudio por TEM, con soporte lacey-carbon. A la derecha se muestra el aspecto real del soporte visto por microscopio electrónico de barrido. La escala corresponde a 500 nm.

El microscopio electrónico de transmisión empleado para la caracterización de las nanopartículas de oro y plata sintetizadas con extracto de corteza de mangle rojo es un equipo



JEOL JEM-ARM 200F (figura 3.8) con resolución de 82 pm y corrector de aberración esférica. El equipo opera a 200 kV y cuenta con detector de energías dispersivas de rayos x (EDS) modelo AztecTEM de la compañía Oxford instrument.



**Figura 3.8.** Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-ARM 200F.

### 3.4 Análisis termogravimétrico TGA

La termogravimetría se ocupa del análisis térmico que investiga el cambio de peso de una sustancia en función del tiempo o la temperatura. El perfil de cambio de peso se registra cuando la muestra se somete a un entorno de calentamiento o enfriamiento de manera controlada. Se denomina *modo isométrico* cuando el cambio de peso se registra en función del tiempo y *modo de escaneo* cuando el cambio de peso se registra en función de la temperatura.

El principio fundamental del análisis termogravimétrico (TGA) es que el cambio de masa de una muestra se puede estudiar en condiciones programadas. Por lo tanto, el TGA se utiliza para comprender ciertos eventos térmicos como absorción, adsorción, desorción,

vaporización, sublimación, descomposición, oxidación y reducción. Además, con el TGA se puede realizar la evaluación de productos volátiles o gaseosos perdidos durante tales reacciones químicas para muestras como nanomateriales, polímeros, nanocompuestos poliméricos y películas [13].

Para llevar a cabo el TGA, la muestra se coloca en un portamuestras diseñado específicamente para este tipo de ensayos. En cuanto a las condiciones de temperatura y su medición, la variación de temperatura se establece con un programa de temperatura personalizado que puede incluir pasos isotérmicos o de rampa con diferentes velocidades de calentamiento, mientras que la temperatura se mide con termopares que están en contacto con el recipiente de la muestra. Generalmente el portamuestras se coloca en un soporte conectado a una microbalanza. El sistema TG (muestra, portamuestras) se calienta mediante un horno eléctrico, que en casos particulares puede alcanzar hasta 2000 °C, dependiendo de los materiales específicos, el diseño del horno y otras componentes. Los recipientes de muestra que se utilizan en un dispositivo TGA pueden ser de diferentes formas y materiales. Deben poder almacenar la muestra de forma segura, no reaccionar con ella y ser adecuados para la temperatura a utilizar. Los portamuestras más comunes están hechos de alúmina, platino y aluminio.

Es posible clasificar los procesos térmicos que ocurren en un dispositivo TGA según la variación positiva o negativa de la masa. La variación de masa positiva se puede deber a adsorción, oxidación o reducción; la variación de masa negativa a desorción, descomposición térmica (con formación de productos volátiles), oxidación (combustión), vaporización y sublimación [14].

#### 3.4.1 Clasificación de análisis termogravimétricos

El TGA se clasifica en tres tipos diferentes.

**Análisis termogravimétrico dinámico:** durante este método la temperatura de la muestra varía linealmente con el tiempo.

**Análisis termogravimétrico estático o isotérmico:** la muestra se mantiene a una temperatura constante durante un intervalo de tiempo fijo. Durante este método se registra el cambio de peso de la masa con respecto al tiempo.

**Análisis termogravimétrico cuasiestático:** para este análisis, la muestra se calienta hasta un peso constante en cada una de las series de temperaturas crecientes.

### 3.4.2 Reporte de resultados TGA

Como ya se mencionó, los resultados de TGA se representan como masa respecto a temperatura o tiempo. Otro tipo de representación de los resultados es la termogravimetría derivada (DTG), que es la primera derivada de la curva TGA. Por lo tanto, el DTG describe el cambio de masa. También se usa para detectar efectos más sutiles o parámetros cinéticos. La señal de TGA se reporta en mg o porcentaje (donde el 100% es la masa inicial en el tiempo cero), entonces el DTG generalmente se representa como mg o el porcentaje sobre el tiempo. La siguiente figura muestra la gráfica de las curvas TGA y DTG obtenidas con una prueba termogravimétrica de una muestra de biomasa bajo atmósfera de nitrógeno y una velocidad de calentamiento constante hasta 750 °C. La curva de TGA que se muestra en la figura describe la descomposición térmica de la biomasa siguiendo diferentes pasos que ocurren a una temperatura diferente. A partir de un gráfico TGA, una pendiente constante caracteriza los diferentes pasos de la descomposición térmica. En el caso de la figura 3.9, estos pasos son apenas detectables en las diferentes pendientes de la curva, porque ocurren en rangos de temperatura superpuestos. El gráfico DTG ayuda a la detección de transformaciones que se superponen o están asociadas con una pérdida de masa deficiente. De hecho, los picos de DTG indican una transformación específica y los valores mínimos coinciden con la tasa máxima de pérdida de masa del paso de descomposición relacionado [14].

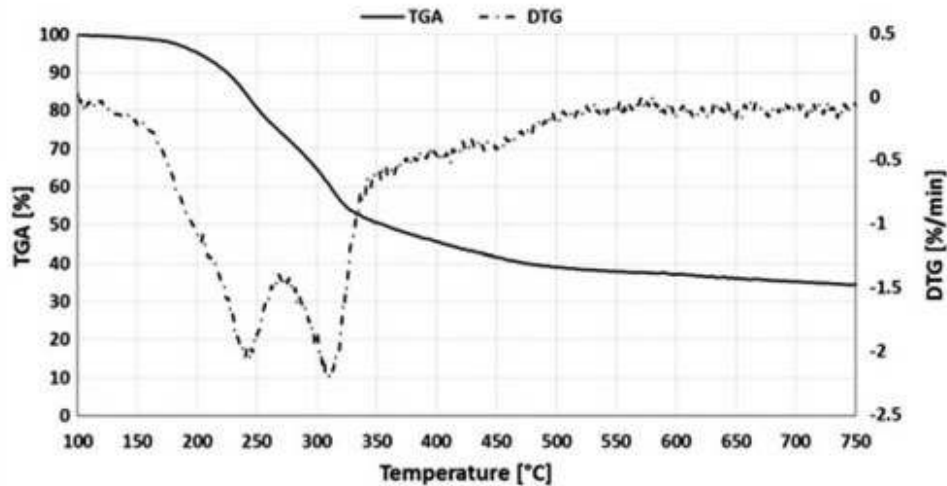


Figura 3.9. Señales TGA y DTG de conversión de biomasa en atmósfera inerte [14].

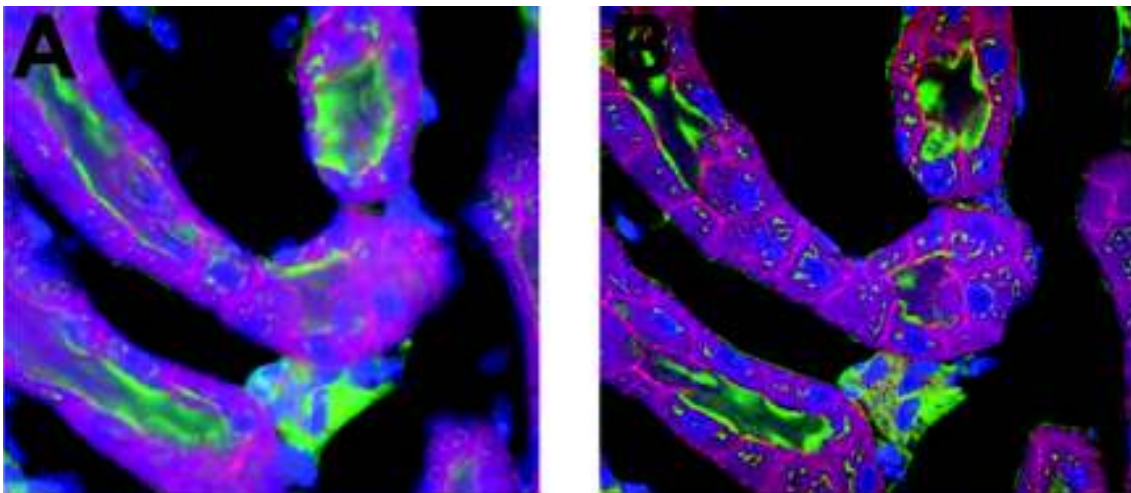
### 3.5 Microscopía confocal

En la microscopía óptica tradicional, la luz proveniente de la fuente de iluminación atraviesa la muestra de forma uniforme a través del campo de visión. Para muestras gruesas, donde las lentes objetivas no tienen suficiente profundidad de foco, también se detectará la luz de los planos de muestra por encima y por debajo del plano focal. Dicha luz que está fuera de foco proporcionará un aspecto difuso a la imagen reduciendo la resolución de ésta. En la microscopía de fluorescencia, cualquier molécula de colorante que entre en contacto con la iluminación de excitación será estimulada, incluso aquellas que se encuentran fuera del plano focal. En la microscopía confocal se tiene la posibilidad de bloquear aquella luz que proviene de las regiones fuera del plano focal de tal manera que solo la luz proveniente del plano focal llega al detector permitiendo obtener imágenes de gran nitidez y alta resolución [15].

Las funciones principales de un microscopio confocal son producir una fuente puntual de luz y rechazar la luz desenfocada, lo que brinda la capacidad de obtener imágenes de gran profundidad de campo en los tejidos, con alta resolución y seccionamiento óptico para reconstrucciones 3D de muestras obtenidas con imágenes. El principio básico de la microscopía confocal es que la óptica de iluminación y detección se enfoca en el mismo punto de difracción limitada, el cual se mueve sobre la muestra para construir la imagen completa en el detector. Si bien todo el campo de visión es iluminado punto a punto durante

la construcción de imágenes confocales, cualquier cosa fuera del plano focal contribuye poco a la imagen, disminuyendo con ello el desenfocamiento y aumentando la nitidez. En la figura 3.9 se muestran dos imágenes de la misma región de un grupo de células de riñón de ratón marcadas fluorescentemente con 3 cromóforos diferentes y analizadas por microscopía de fluorescencia tradicional o epifluorescencia (figura 3.9A) y por microscopía confocal de barrido laser (figura 3.9B), sobresaliendo la nitidez de las estructuras reveladas por la última [16].

El primer microscopio confocal fue desarrollado por Marvin Minsky en 1955 y en su propuesta original de microscopio confocal (figura 3.10A), la fuente de excitación (línea verde) es colimada por el primer pinole y posteriormente enfocada en la muestra por la lente condensadora. La luz emitida (fluorescencia) es enfocada por la lente mediante el objetivo haciéndola pasar por un segundo pinole antes de llegar al detector (línea roja), mientras que la luz fuera de foco es rechazada por el pinhole (línea roja discontinua).

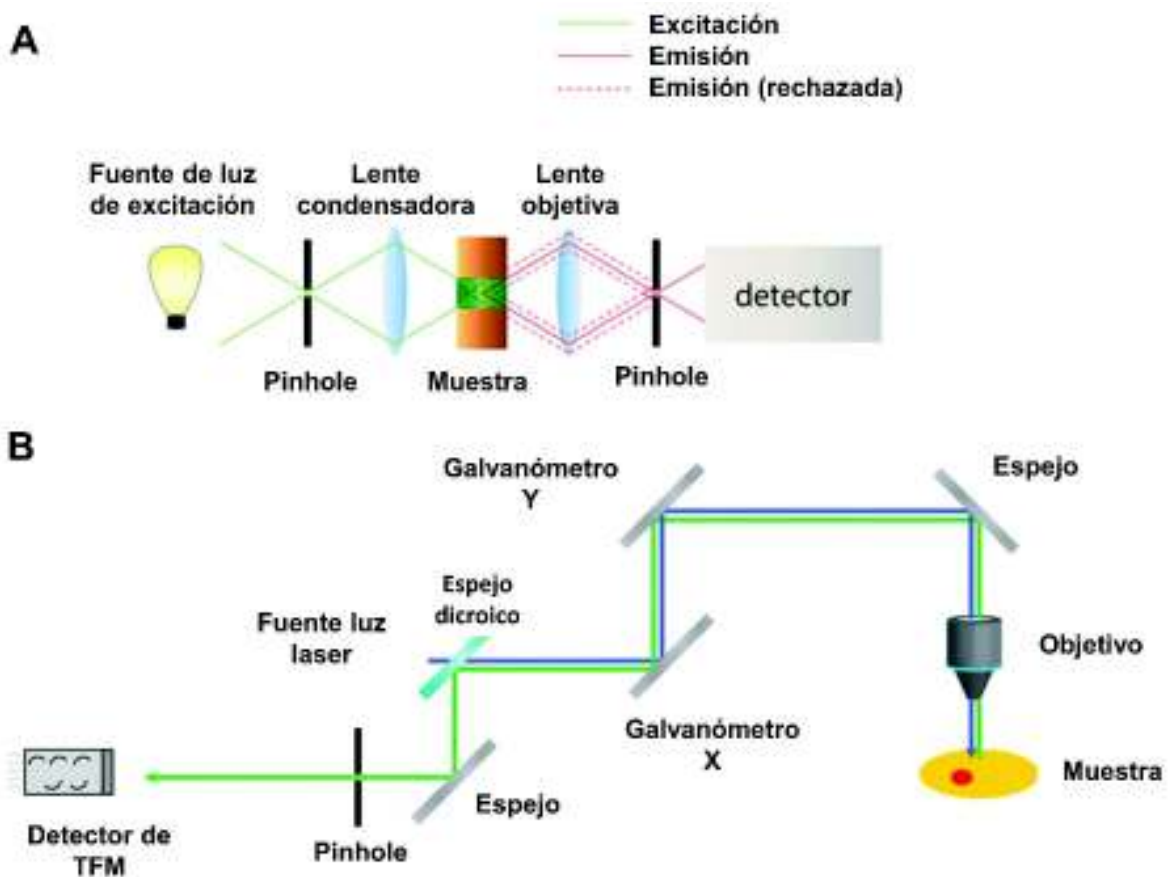


**Figura 3.10.** Tejido fijado de riñón de ratón marcado con Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 acoplado a faloidina para revelar estructuras de soporte y con DAPI para teñir núcleos celulares. La figura en (A) corresponde a microscopía de epifluorescencia y (B) a microscopía confocal de barrido laser [16].

En un equipo moderno de microscopía confocal de barrido laser (figura 3.10B), la fuente de excitación proporcionada por un láser pasa por un espejo dicróico y es barrida a través del campo de visión en la muestra por un par de galvanómetros los cuales hacen el barrido a lo

largo de los ejes X y Y. La luz emitida es reflejada vía los galvanómetros a el espejo dicroico donde es reflejada a través del pinhole a un tubo fotomultiplicador que funge como detector.

En el presente trabajo se utilizó un microscopio invertido Axio Observer.Z1 (Zeiss) con sistema de epifluorescencia tradicional y lámpara halógena para campo claro. También posee acoplado el sistema confocal de barrido laser en forma integrada conformando el sistema LSM800 el cual se ilustra en la figura 3.12. El equipo cuenta con 4 laser de excitación (405, 488, 561 y 640 nm), 3 detectores de alta sensibilidad GaAsP para la colecta de la fluorescencia y un detector fotomultiplicador para integrar la imagen de luz transmitida. La velocidad máxima de escaneo en modo confocal es de 200 ms en imágenes de 512 x 512.



**Figura 3.11.** Diagrama de los elementos básicos que conforman al microscopio confocal. El diseño original propuesto por Minsky es mostrado en (A). La figura en (B) corresponde al arreglo de componentes de un microscopio confocal de barrido laser moderno.



**Figura 3.12.** Equipo confocal de barrido laser LSM800 (Zeiss).

## Referencia

- [1] Tissue, B. M. (2002). Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. Characterization of Materials.
- [2] Herman, I. P. (2003). Optical diagnostics for thin film processing. Annual review of physical chemistry, 54(1), 277-305.
- [3] Begum, R., Farooqi, Z. H., Naseem, K., Ali, F., Batool, M., Xiao, J., & Irfan, A. (2018). Applications of UV/Vis spectroscopy in characterization and catalytic activity of noble metal nanoparticles fabricated in responsive polymer microgels: a review. Critical reviews in analytical chemistry, 48(6), 503-516.
- [4] Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Analytica chimica acta*, 706(1), 8-24.
- [5] Unser, S., Bruzas, I., He, J., & Sagle, L. (2015). Localized surface plasmon resonance biosensing: current challenges and approaches. *Sensors*, 15(7), 15684-15716.
- [6] Suchomel, P., Kvitek, L., Pucek, R., Panacek, A., Halder, A., Vajda, S., & Zboril, R. (2018). Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- [7] Zhou, Y., Wang, H., Lin, W., Lin, L., Gao, Y., Yang, F., ... & Li, Q. (2013). Quantitative nucleation and growth kinetics of gold nanoparticles via model-assisted dynamic spectroscopic approach. *Journal of colloid and interface science*, 407, 8-16.
- [8] Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- [9] Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*, 34(7), 795-800.
- [10] Bell, D. C., Russo, C. J., & Benner, G. (2010). Sub-Ångstrom low-voltage performance of a monochromated, aberration-corrected transmission electron microscope. *Microscopy and Microanalysis*, 16(4), 386-392.
- [11] Reimer, L. (2013). *Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis* (Vol. 36). Springer.
- [12] Bazán-Díaz, L., Ascencio-Aguirre, F., Herrera-Becerra, R., & Mendoza-Cruz, R. (2021). FCC and 4H structure coexistence in Ag nanoparticles determined through TEM



- imaging and a diffraction pattern indexing program (DPIP). *Microscopy and Microanalysis*, 27(S1), 2330-2331.
- [13] Loganathan, S., Valapa, R. B., Mishra, R. K., Pugazhenti, G., & Thomas, S. (2017). Thermogravimetric analysis for characterization of nanomaterials. In *Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization* (pp. 67-108). Elsevier.
- [14] De Blasio, C. (2019). Thermogravimetric analysis (TGA). In *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology* (pp. 91-102). Springer, Cham.
- [15] Elliott, A. D. (2020). Confocal microscopy: principles and modern practices. *Current protocols in cytometry*, 92(1), e68.
- [16] Bayguinov, P. O., Oakley, D. M., Shih, C. C., Geanon, D. J., Joens, M. S., & Fitzpatrick, J. A. (2018). Modern laser scanning confocal microscopy. *Current protocols in cytometry*, 85(1), e39.

## Capítulo 4

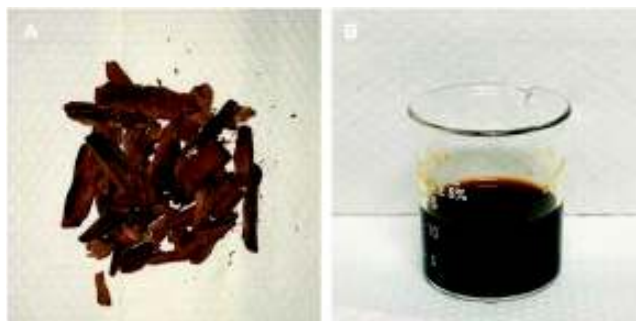
### Metodología

#### 4.1 Obtención del extracto de Mangle rojo

Para obtener el extracto de la corteza de la planta *Rhizophora mangle*, conocido comúnmente como mangle rojo (MR), se utilizaron 84.20 g de MR y 561.34 mL de solución Etanol/H<sub>2</sub>O ultrapura en proporción 70/30 en volumen. El procedimiento aplicado para la extracción fue la maceración a temperatura ambiente y en la oscuridad para evitar la foto-oxidación de los componentes del extracto. La absorbancia se monitoreo conforme transcurrió el tiempo y la maceración se dio por concluida a las 4 semanas al confirmar que la absorbancia del extracto permanecía constante.

Posteriormente el extracto crudo obtenido fue filtrado con filtros Whatman de papel de 8 µm y después de 2 µm. Al final se utilizó unidad de filtración al vacío acoplada con filtro de 0.22 µm. Una porción del extracto filtrado fue separada para su posterior secado en horno de convección a temperatura constante de 35 °C durante 72 horas. Los polvos recuperados se utilizaron para construir la curva de calibración del extracto y para el ensayo de capacidad antioxidante por inhibición del radical DPPH. El resto del extracto en solución se utilizó para la síntesis de las nanopartículas.

El tronco del mangle rojo está formado por varias capas con texturas distintas. Para la obtención del extracto se removió la primera cobertura con navaja y se utilizó la parte inmediata posterior que es más blanda, posee una textura porosa y es de intenso color rojizo, encontrándose también en menor cantidad en el centro de la rama. En la figura 4.1A se muestra la materia prima obtenida del MR utilizada en la extracción y figura 4.1B corresponde al extracto obtenido después del proceso de filtración caracterizado por un intenso color marrón.



**Figura 4.1.** (A) Parte de la corteza del *Rhizophora Mangle* utilizada para la obtención del extracto. (B) Extracto de MR en *Etanol/H<sub>2</sub>O*.

## 4.2 Síntesis de nanopartículas de plata y de oro con extracto de Mangle rojo

### 4.2.1 Preparación de los precursores metálicos

Para la síntesis de las nanopartículas de plata se utilizó como precursor metálico el reactivo de nitrato de plata  $\text{AgNO}_3$  (PM = 169.87g/mol) a una concentración de 0.1 M. En el caso de las nanopartículas de oro, el precursor metálico utilizado fue el ácido tetracloroaúrico trihidratado  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (PM = 339.79 g/mol) a concentración de 0.01M. Ambos reactivos se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich (Merck) con una pureza del 99.99 %.

Las soluciones precursoras se prepararon a un volumen de 100 mL en matraces aforados con agua ultrapura milli-Q como solvente y bajo agitación magnética durante 1 h. Una vez preparadas las soluciones se resguardaron de la luz hasta su uso en la síntesis de las nanopartículas.

### 4.2.2. Síntesis exploratoria de nanopartículas AgMR y AuMR

Con el propósito de evaluar la capacidad del extracto de MR para reducir a los iones metálicos y producir nanopartículas metálicas, se efectuaron algunas síntesis exploratorias variando los volúmenes de reactantes (precursores metálicos, extracto en solución y solvente) y manteniendo constante el cociente entre volumen de precursor y volumen de reductor ( $R=1$ ). En las tablas 4.1 y 4.2 se muestran los volúmenes de reactantes empleados y las etiquetas asignadas a las nanopartículas sintetizadas de plata (AgMR) y oro (AuMR), respectivamente.

**Tabla 4.1.** Tabla de volúmenes de reactantes para la síntesis de nanopartículas de prueba de  $AgNO_3$  con extracto de mangle rojo.

Muestra	Relación	Vol. del precursor metálico ( $AgNO_3$ 0.1M)	Vol. Reductor (extracto de MR)	Vol. Solvente (agua ultrapura)
A	R = 1	0.5 mL	0.5 mL	9 mL
B	R = 1	1 mL	1 mL	8 mL
C	R = 1	2 mL	2 mL	6 mL
D	R = 1	3 mL	3 mL	4 mL

R es la relación entre el reductor y el precursor, es decir el cociente del volumen de extracto de MR entre el volumen de  $AgNO_3$ .

**Tabla 4.2.** Tabla de volúmenes de reactantes para la síntesis de nanopartículas de prueba de  $HAuCl_4$  con extracto de mangle rojo.

Muestra	Relación	Vol. del precursor metálico ( $HAuCl_4$ 0.01M)	Vol. Reductor (extracto de MR)	Vol. Solvente (agua ultrapura)
E	R = 1	0.5 mL	0.5 mL	9 mL
F	R = 1	1 mL	1 mL	8 mL
G	R = 1	2 mL	2 mL	6 mL
H	R = 1	3 mL	3 mL	4 mL

R es la relación entre el reductor y el precursor, o sea el cociente del volumen de extracto de MR entre el volumen de  $HAuCl_4$ .

Las síntesis de las distintas muestras se efectuaron en frascos de vidrio transparente de 25 ml donde los volúmenes preparados de cada muestra fueron de 10 ml. Los reactivos fueron medidos y colocados en los frascos con ayuda de micropipetas en el siguiente orden: agua ultrapura—extracto de MR—precursor metálico ( $AgNO_3$  o  $HAuCl_4$ ). Inmediatamente después de agregar el precursor metálico, se introdujo a cada una de las muestras un agitador magnético; se pusieron a agitar sobre una placa de agitación magnética a 700 rpm y frente a una lámpara UV de 60 W colocada a 15 cm de separación. Para una radiación de la luz UV más homogénea, los frascos con las muestras se fueron girando  $90^\circ$  cada 10 min, durante 40 min. Al terminar, las muestras se dejaron reposar en el laboratorio durante dos días a temperatura ambiente. Después, las muestras se homogenizaron por sonicación durante 5 minutos y se tomaron 300  $\mu$ L de cada una de las muestras para realizar la caracterización por espectroscopía UV-Vis.

Para la obtención de los espectros UV-vis de cada una de las muestras preparadas se llevaron a cabo los siguientes pasos frente al espectrofotómetro UV-vis Lambda 45 (Perkin-Elmer):

- 1) Definición de las condiciones en que se realizarán las mediciones. Dentro del programa del UV-vis se definió: a) la longitud de onda inicial (900 nm) y la longitud de onda final (200 nm); b) el slit (0.5); c) y la velocidad de barrido para el experimento (480 nm/min).
- 2) Después se procedió a tomar la medida del “blanco” o solvente para fijar en cero la señal de referencia. Para esto se utilizan dos celdas de cuarzo para UV-vis a las cuales se agregan 3 mL del solvente para dispersar las nanopartículas. La celda de referencia es la que se coloca más alejada del usuario, ésta ya no se moverá de su lugar hasta después de finalizar la toma del espectro; y la que se coloca más cerca es la celda de la muestra. Antes de cada corrida se revisó que las paredes de las celdas estuvieran bien limpias para evitar cualquier error.

Ya que el solvente con el que se hace la corrida del “blanco” debe coincidir con el utilizado en la síntesis; se preparó un solvente Etanol/H<sub>2</sub>O ultrapura en distintas proporciones para cada una de las muestras. Esto debido a que el extracto de MR se preparó en solución Etanol/H<sub>2</sub>O ultrapura al 70/30. Por lo tanto, para cada una de las muestras, primero se tomó la corrida del “blanco” correspondiente y después la toma del espectro.

- 3) Al finalizar la toma de la señal de referencia, para la toma del espectro, tomamos la celda con posición más cercana al usuario. Con ayuda de una micropipeta retiramos 100 µL del solvente y agregamos 100 µL de la muestra correspondiente, agitamos un poco para homogenizar la solución, limpiamos las paredes externas de la celda y se volvió a colocar en el lugar en donde estaba. Después de cada medición del espectro se deben enjuagar las celdas con agua y etanol.

Al haber realizado todas las mediciones se procede a guardar los espectros obtenidos para después exportarlos en formato ascii.

Con el fin de recuperar las nanopartículas sintetizadas y remover los reactantes en exceso, se sigue el protocolo de limpieza que a continuación se describe.

Lo primero que se hace es transferir cada una de las muestras a tubos cónicos de plástico con capacidad de 50 mL. Para el proceso de centrifugación debemos asegurar que los tubos con

sus contenidos posean la misma masa por lo que los pesamos uno por uno en la balanza. A los que pesan menos se les agrega lo necesario de su solvente correspondiente para igualarlos con los más pesados. A continuación, se sonicar cada uno de ellos hasta homogenizar las muestras. De aquí se toman 300  $\mu$ L de cada uno de los tubos y se colocan en tubos eppendorf para caracterizarlos por espectroscopía UV-vis. Después de esto, el ciclo de limpieza sigue el orden que abajo se enlista:

- 1) Centrifugar las muestras durante 45 minutos a 13,000 RPM.
- 2) Retirar el sobrenadante y agregar 10 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura.
- 3) Sonicar hasta homogenizar las muestras.
- 4) Tomar 300  $\mu$ L de cada una de las muestras y colocarlos en tubos eppendorf para un posterior ensayo UV-vis.
- 5) Repetir pasos del 1) al 4)
- 6) Repetir pasos del 1) al 4), pero esta vez agregando Etanol en lugar de H<sub>2</sub>O ultrapura en el paso 2)
- 7) Por último, las nanopartículas dispersas en etanol son centrifugadas (13, 000 RPM por 45 minutos) y se les retira el sobrenadante. El sólido precipitado es secado en horno de convección a 35 °C por 2 horas y los sólidos recuperados son pesados y dispersados en agua ultrapura a la concentración requerida mediante sonicación hasta su completa homogenización.

#### 4.2.3 Síntesis final de las nanopartículas AgMR y AuMR

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización por espectroscopía UV-vis de las diversas nanopartículas sintetizadas, se eligieron aquellas que mostraron una respuesta plasmónica más favorable en absorbancia, desplazamiento del PRSL a energías mayores y menor ancho medio de la banda de absorbancia. Para cada metal se eligieron, respectivamente, las muestras A (AgMR) y E (AuMR) y la producción de estas formulaciones se escaló a un volumen total de 120 mL (ver figura 4.2) de acuerdo con las Tablas 4.3 y 4.4. Los productos fueron caracterizados por espectroscopía UV-vis y sometidos al protocolo de limpieza de acuerdo con las metodologías descritas anteriormente. Los

productos finales obtenidos al finalizar el protocolo de limpieza se emplearon en distintas concentraciones para la evaluación de la toxicidad en los ensayos con *Artemia franciscana*.

**Tabla 4.3.** Relaciones para la síntesis de nanopartículas finales de  $AgNO_3$  con extracto de mangle rojo para un volumen de 120 mL.

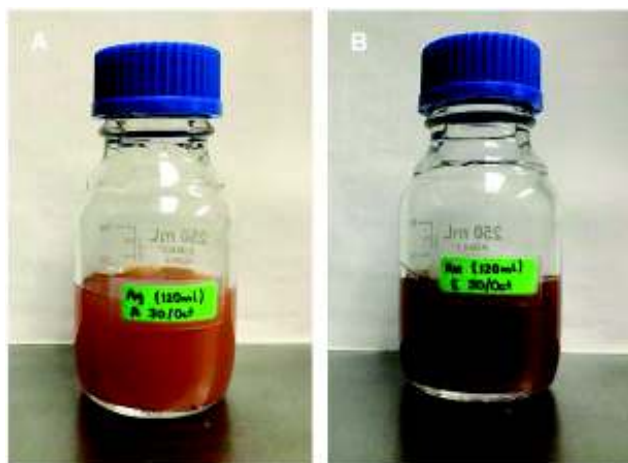
Muestra	Relación	Vol. del precursor metálico ( $AgNO_3$ 0.1M)	Vol. Reductor (extracto de MR)	Vol. Solvente (agua ultrapura)
A	R = 1	6 mL	6 mL	108 mL

R es la relación entre el reductor y el precursor, o sea el cociente del volumen de extracto de MR entre el volumen de  $AgNO_3$ .

**Tabla 4.4.** Relaciones para la síntesis de nanopartículas finales de  $HAuCl_4$  con extracto de mangle rojo para un volumen de 120 mL.

Muestra	Relación	Vol. del precursor metálico ( $HAuCl_4$ 0.01M)	Vol. Reductor (extracto de MR)	Vol. Solvente (agua ultrapura)
E	R = 1	6 mL	6 mL	108 mL

R es la relación entre el reductor y el precursor, o sea el cociente del volumen de extracto de MR entre el volumen de  $HAuCl_4$ .



**Figura 4.2.** (A) Nanopartículas AgMR y (B) nanopartículas AuMR, obtenidas ambas en la síntesis final.

### 4.3 Ensayo de supervivencia en *Artemia Franciscana* ante AuNPs y AgNPs

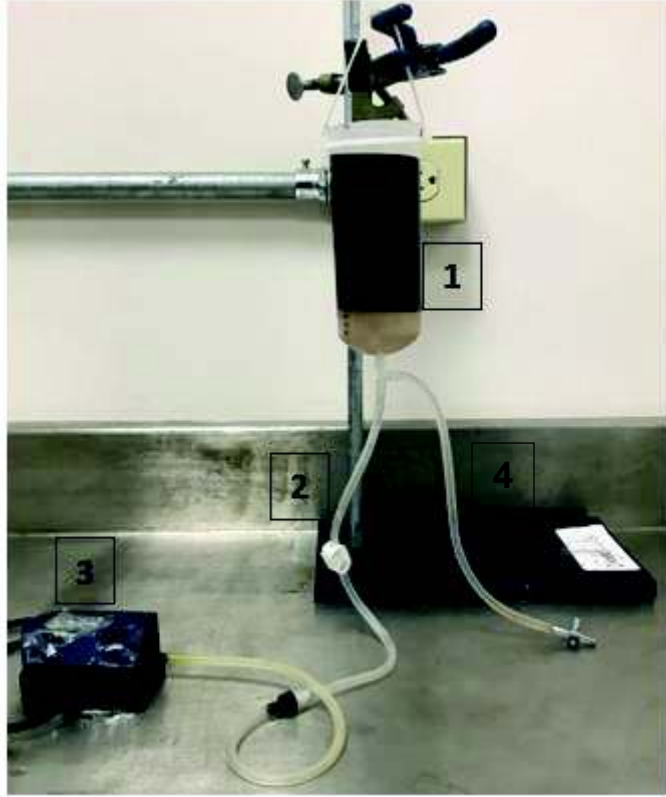
Con el fin de evaluar los efectos tóxicos de las nanopartículas AgMR y AuMR en organismos marinos, se implementó el modelo de la *Artemia franciscana* en su fase de nauplio (48 horas post-eclosión). El protocolo implementado en este ensayo consistió en los siguientes pasos.

1. Se colocó a eclosionar 0.25 g de quiste de *Artemia franciscana* en un volumen de 250 mL con agua de mar 35 g/L previamente filtrada con un filtro Acrodisk 0.2  $\mu\text{m}$ .
2. Todo se depositó en un eclosionador de artemia con aireación constante (ver figura 4.3).
3. Se eclosionó bajo condiciones de luz blanca y una temperatura de 29 °C por 48 horas.
4. Se realizó un cambio de agua del sistema para limpiar los desechos y exceso de quistes post-eclosión.
5. Se recolectó 1 mL por triplicado para obtener una media de organismos eclosionados por mL.
6. Se depositaron en promedio 32 artemias por pozo en placa de 6 pozos con un volumen final de 6 mL colocando las concentraciones de 200, 100, 50 y 25  $\mu\text{g/mL}$  de AuNPs y AgNPs. También se dejó un pocillo control con artemias con solo agua de mar.
7. Se mantuvo durante 24 horas en una incubadora con temperatura controlada a 29°C con exposición a luz blanca y con agitación constante de 100 rpm.
8. Se contabilizó la supervivencia de artemia cada 6 horas.

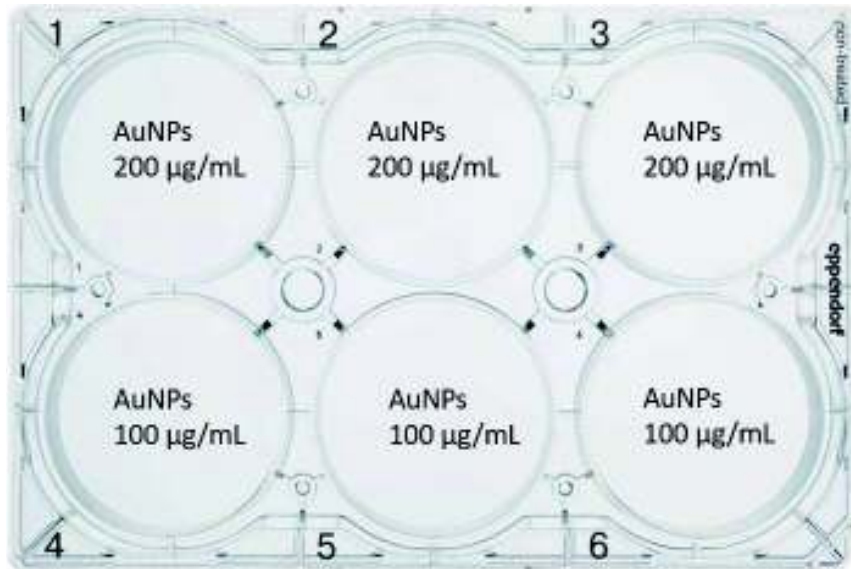
$$\% \text{ Supervivencia Artemias} = \left( \frac{\text{Artemias}_t}{\text{Artemias}_{t=0}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde  $\text{Artemias}_{t=0}$  corresponde al número de *Artemias franciscana* vivas en el pozo al inicio del ensayo y  $\text{Artemias}_t$  es el número de *Artemias franciscana* vivas en el mismo pozo a un tiempo  $t$  dado.





**Figura 4.3.** Sistema de eclosión de *Artemia franciscana* (1. Cilindro de incubación. 2. Conexión de aire. 3. Bomba de aire. 4. Manguera de drenado).



**Figura 4.4.** Diseño de placas para aplicación de tratamientos.

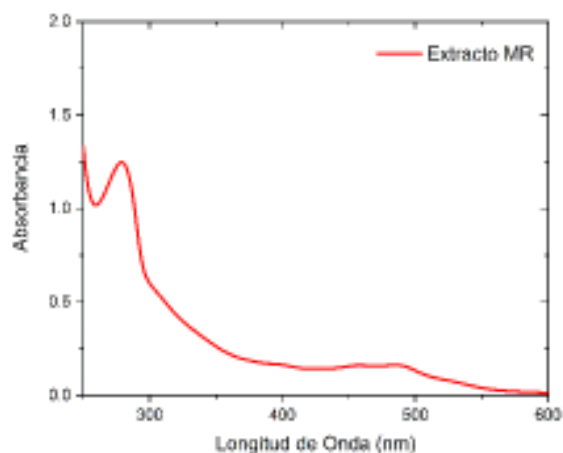
## Capítulo 5

### Resultados y Discusiones

#### 5.1 Caracterización del Extracto

##### 5.1.1 Espectro UV-vis del Extracto MR y curva de calibración

El espectro UV-vis del extracto de mangle rojo se obtuvo al agregar 25  $\mu\text{L}$  del extracto y 2975  $\mu\text{L}$  de mezcla etanol/agua (70/30 v/v) como solvente en celda de cuarzo de 10 mm de longitud de camino óptico. La lectura se realizó de 600 nm a 250 nm empleando velocidad de barrido de 480 nm/min. Como se observa en la figura 5.1, el espectro UV-vis del extracto se caracteriza por una banda bien definida con máximo en 279 nm y absorbancia de 1.25 asociada a las transiciones electrónicas de los orbitales moleculares tipo  $\pi$  de los compuestos fenólicos, como los descritos en la figura 2.3 [1]. Adicionalmente el espectro muestra una región cercana a los 500 nm donde la absorbancia pasa de un valor de 0 (en 600 nm) a un valor de 0.25. La absorción de luz en dicha región puede ser la responsable del color marrón intenso característico de este extracto.

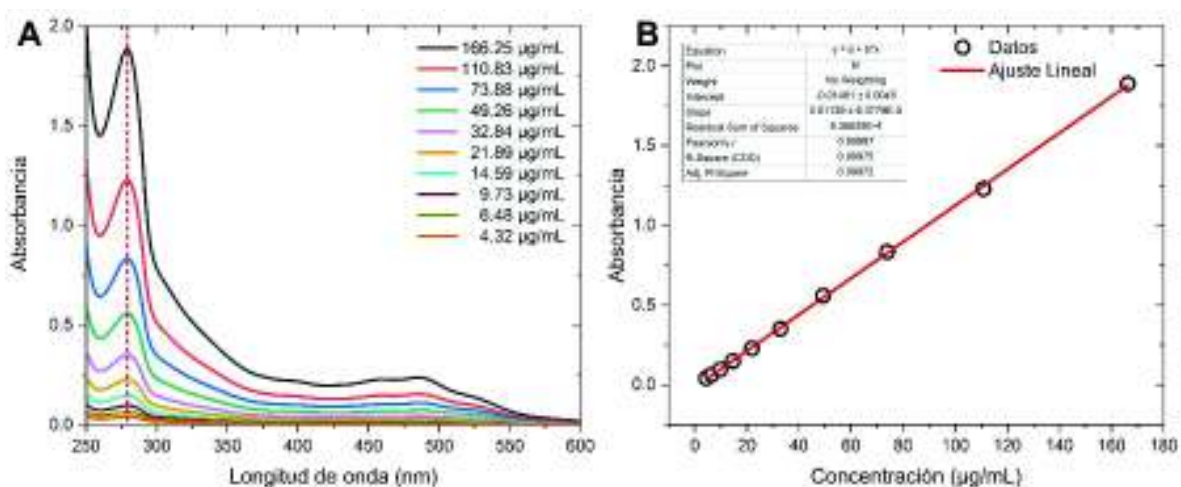


**Figura 5.1.** Espectro UV-vis del extracto de mangle rojo en agua.

La curva de calibración para determinación de concentraciones del extracto de mangle rojo se construyó evaluando los espectros UV-vis de una serie de diluciones seriadas de una solución de extracto en polvo preparada a concentración conocida. El resultado se muestra en la figura 5.2 donde se observa el comportamiento monótono decreciente de las intensidades de absorbancia en el espectro UV-vis del extracto a medida que se va diluyendo (figura 5.2A). Se tomó la intensidad a 279 nm para construir la ecuación del ajuste lineal (figura 5.2B) que nos permitirá determinar concentraciones desconocidas de muestras de extractos de MR en solvente etanol/agua. Dicha ecuación está dada como

$$A = \left[ 0.01139 \frac{1}{\left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)} \right] (C) - 0.01461 \quad \text{Ec 5.1}$$

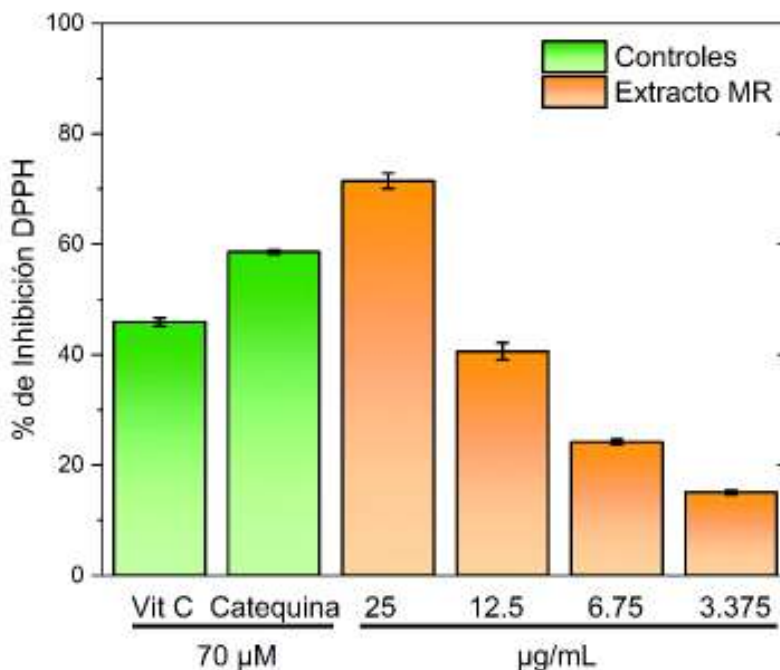
donde A es la absorbancia y C la concentración del extracto de MR en  $\mu\text{g/mL}$ . En el presente trabajo, 10  $\mu\text{L}$  del extracto líquido de MR se diluyeron en 2990  $\mu\text{L}$  de solvente produciendo una absorbancia de 1.25 de acuerdo con la figura 4.1. Aplicando la Ec 5.1 obtenemos una concentración de extracto en la dilución dentro de la celda de cuarzo de 111.02  $\mu\text{g/mL}$  y al aplicar el factor de dilución empleado (10  $\mu\text{L}/3000 \mu\text{L}$ ) estimamos la concentración real del extracto de MR en 33.308  $\text{mg/mL}$ .



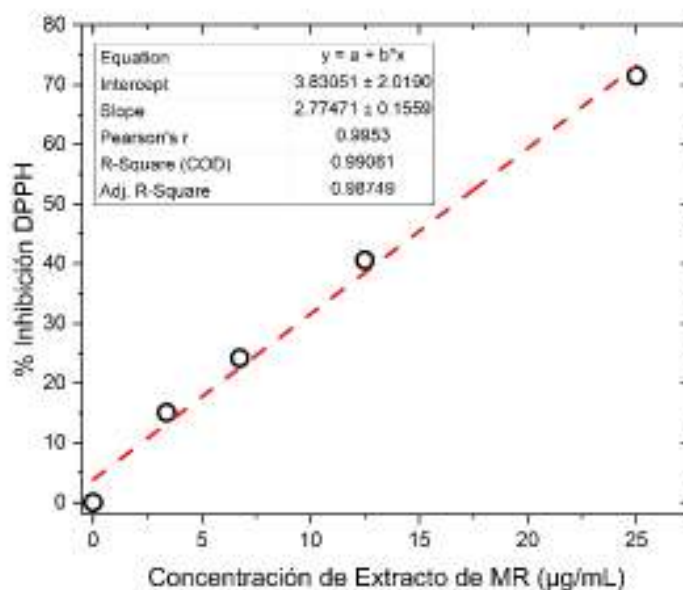
**Figura 5.2.** Curva de calibración del extracto de mangle rojo.

### 5.1.2 DPPH Extracto de MR

En la figura 5.3 se muestra la actividad inhibitoria del extracto de mangle rojo sobre el radical DPPH. Como se observa, a 25  $\mu\text{g/mL}$  de extracto la capacidad inhibitoria sobre el DPPH es mayor al 70% y supera a la mostrada por los controles de referencia (Vitamina C y Catequina) a concentraciones de 70  $\mu\text{M}$ . La figura 5.4 corresponde al ajuste lineal de los datos que relacionan la respuesta inhibitoria del extracto sobre el radical DPPH vs la concentración del extracto. A partir la ecuación de la recta (ver inset en figura 5.4) es posible estimar la concentración inhibitoria  $\text{CI}_{50}$ , la cual arroja un valor 16.63  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto de MR obtenido por maceración de la corteza del árbol en una mezcla de etanol/agua 70/30 (%vol/vol). De acuerdo con la clasificación propuesta por Phongpaichit y colaboradores [2] este valor ubica al extracto en el rango de fuerte actividad inhibitoria sobre el radical DPPH ( $50 \mu\text{g/mL} > \text{CI}_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ ) pero es ligeramente superior al reportado para extractos de corteza de *Mimosa tenuiflora* donde la  $\text{CI}_{50}$  se ubica en 12.5  $\mu\text{g/mL}$  [3].



**Figura 5.3.** Actividad inhibitoria del extracto de mangle rojo sobre el radical DPPH.



**Figura 5.4.** Ajuste lineal para la determinación de la  $CI_{50}$  del extracto de MR.

Lo anterior nos indica que el extracto de mangle rojo posee compuestos con gran capacidad para ceder electrones en una reacción óxido-reducción convirtiéndolo en candidato idóneo para emplearse como agente reductor en la síntesis verde de nanopartículas. En la tabla 5.1 se muestran algunos extractos de corteza de plantas con sus respectivos solventes y el valor de la  $CI_{50}$  correspondiente a la actividad inhibitoria de los extractos sobre el radical DPPH.

**Tabla 5.1.** Valores de  $CI_{50}$  (DPPH) para distintos extractos de corteza y solventes empleados en la extracción.

Especie de planta	Solvente de extracción	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Referencia
<i>Zanthoxylum armatum</i> (corteza)	Agua	67.82	[4]
<i>Eucalyptus globulus</i> (corteza)	Etanol	$6.4 \pm 2$	[5]
<i>Eucalyptus viminalis</i> (corteza)	Etanol/Agua	$8.6 \pm 0.4$	[6]
<i>Mimosa tenuiflora</i> (corteza)	Etanol/Agua	12.5	[3]
<i>Diospyros montana</i> (corteza)	Metanol	$43.94 \pm 6.4$	[7]
<i>Rizophora mangle</i> (corteza)	Etanol/Agua	16.63	Presente tesis

## 5.2 Nanopartículas

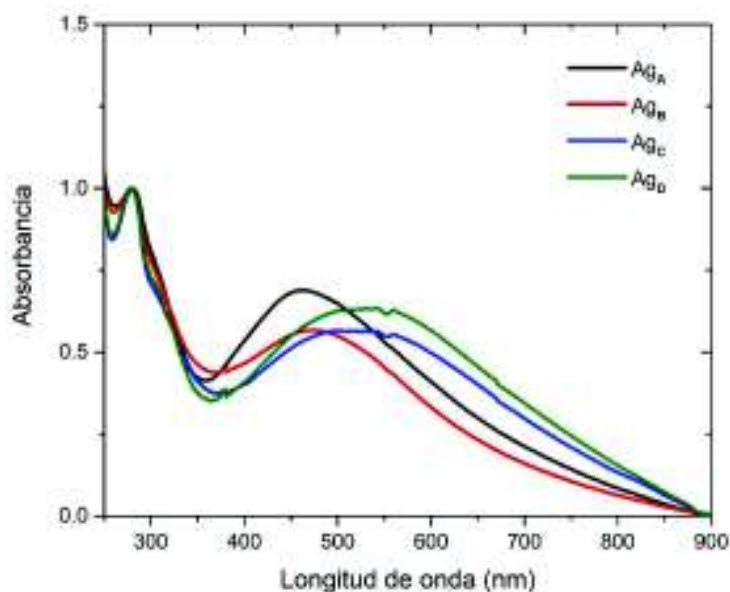
### 5.2.1 Espectros UV-vis

Los datos obtenidos en el UV-vis se procesaron de la misma manera para todas las muestras para su análisis. Primero, se llevó a cero la absorción en los 900 nm para fijar una línea base que permita una comparación relativa entre los distintos espectros. Después los datos son normalizados respecto al máximo de la absorbancia del extracto, aproximadamente en 280 nm.

#### 5.2.1.1 Espectros UV-vis de las AgNPs sintetizadas con extracto de Mangle Rojo

La figura 5.5 muestra los espectros de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de mangle rojo de acuerdo con las proporciones de reactantes indicados en la

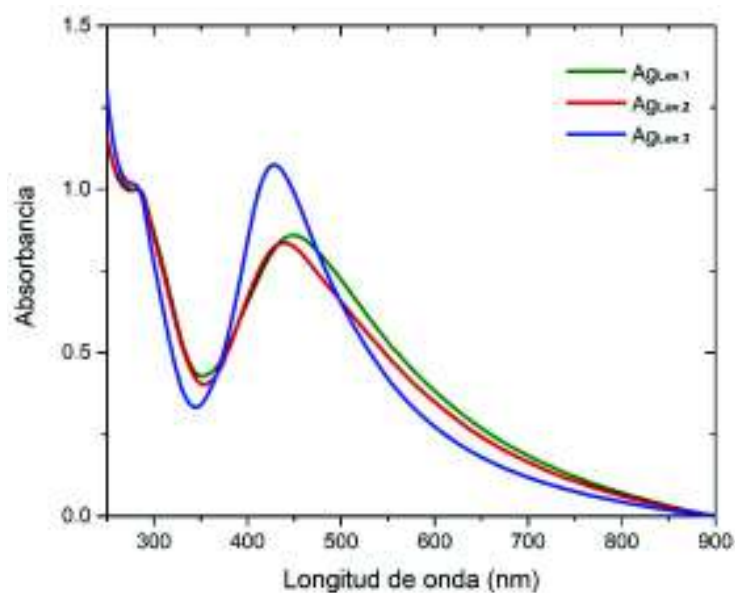
tabla 1 de Metodología. Si tenemos en cuenta que en la síntesis todas las muestras se elaboran manteniendo una relación  $R=1$  ( $R=\text{Vol. AgNO}_3/\text{Vol. Extracto MR}$ ), de la figura 5.5 se obtiene que entre mayor es el volumen del precursor metálico  $\text{AgNO}_3$  y del extracto de mangle rojo en las síntesis, el ancho medio de la banda del plasmón de resonancia aumenta y la posición del pico del plasmón se va desplazando hacia la derecha.



**Figura 5.5.** Espectros UV-vis de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de MR a distintos volúmenes de reactantes y manteniendo constante la razón de vol.  $\text{AgNO}_3/\text{Vol. Extracto de MR}$  de acuerdo con la tabla 4.1.

De las cuatro diferentes síntesis exploradas para nanopartículas de plata, se tiene que para el sistema  $\text{Ag}_A$  el pico del plasmón de resonancia se encuentra desplazado más hacia la izquierda (450 nm, o 2.75 eV) y posee el ancho medio de banda más pequeño de los 4 sistemas, lo que indica que estas nanopartículas son más pequeñas y los tamaños presentan la polidispersidad más baja. Por lo anterior, este sistema fue seleccionado para escalar su producción en un mayor volumen con la finalidad de utilizar estas partículas en los ensayos de citotoxicidad.

La figura 5.6 muestra cómo se fue retirando el extracto y las sales metálicas excedentes en la síntesis  $Ag_A$  durante el proceso de lavado. La figura 4.6 muestra el comportamiento de los espectros UV-vis de las síntesis  $Ag_A$  a medida que las nanopartículas producidas se sometieron a las distintas etapas del proceso de limpieza. Dicho proceso tiene la finalidad de retirar los reactantes durante los primeros dos lavados realizados con agua ultrapura se puede observar la reducción de la variación de los tamaños de las nanopartículas por el cómo el ancho de banda del plasmón de resonancia va disminuyendo. Después del tercer lavado, realizado con etanol, se nota un cambio drástico en la intensidad del plasmón. Si la intensidad del plasmón de resonancia rebasa la unidad del extracto indica que se tiene una mayor cantidad de nanopartículas que extracto en la muestra.



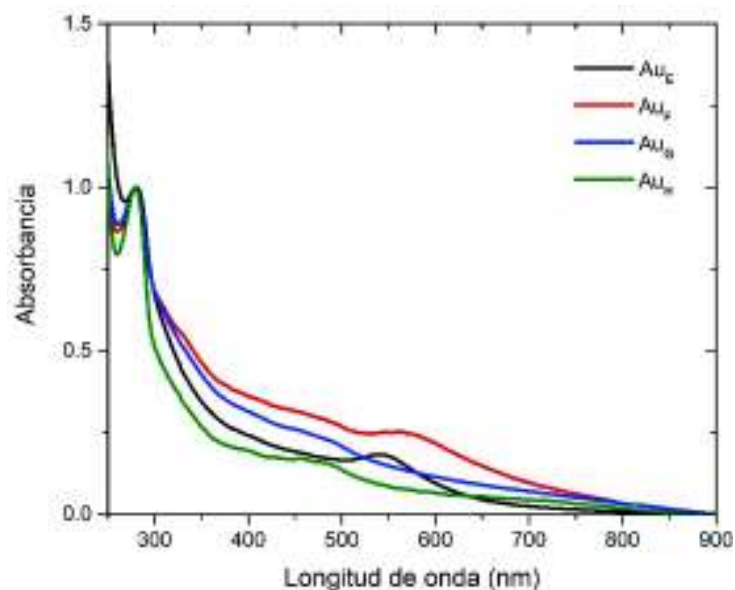
**Figura 5.6.** Espectros UV-vis del sistema  $Ag_A$  correspondiente a las distintas etapas del protocolo de limpieza.

#### 5.2.1.2 Espectros UV-vis de las AuNPs sintetizadas con extracto de Mangle Rojo

En la figura 4.7 podemos observar como las lecturas del UV-vis son más irregulares mientras va aumentando el volumen de extracto y de  $H AuCl_4$  en la síntesis de nanopartículas de oro con MR. Al igual que en el caso de las síntesis de nanopartículas de plata, la síntesis con

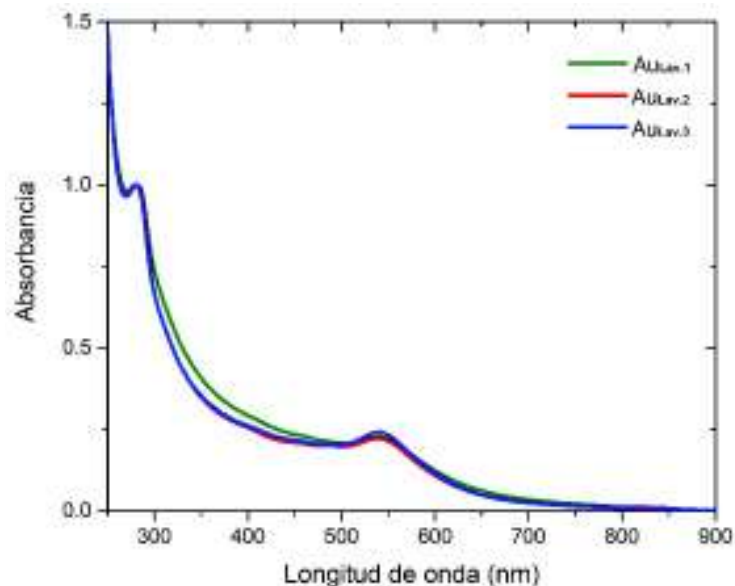


menor volumen de extracto y precursor metálico  $Au_E$ , es la que muestra mayor estabilidad y menos variación de tamaños de las nanopartículas. Esta fue la síntesis reproducida a mayor escala para obtener las AgNPs de MR utilizadas en los demás ensayos de caracterización y citotoxicidad.



**Figura 5.7.** Espectros UV-vis de nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de MR a distintos volúmenes de reactantes y manteniendo constante la razón de vol.  $H[AuCl_4]/Vol.$  Extracto de MR de acuerdo con la tabla 3.1.

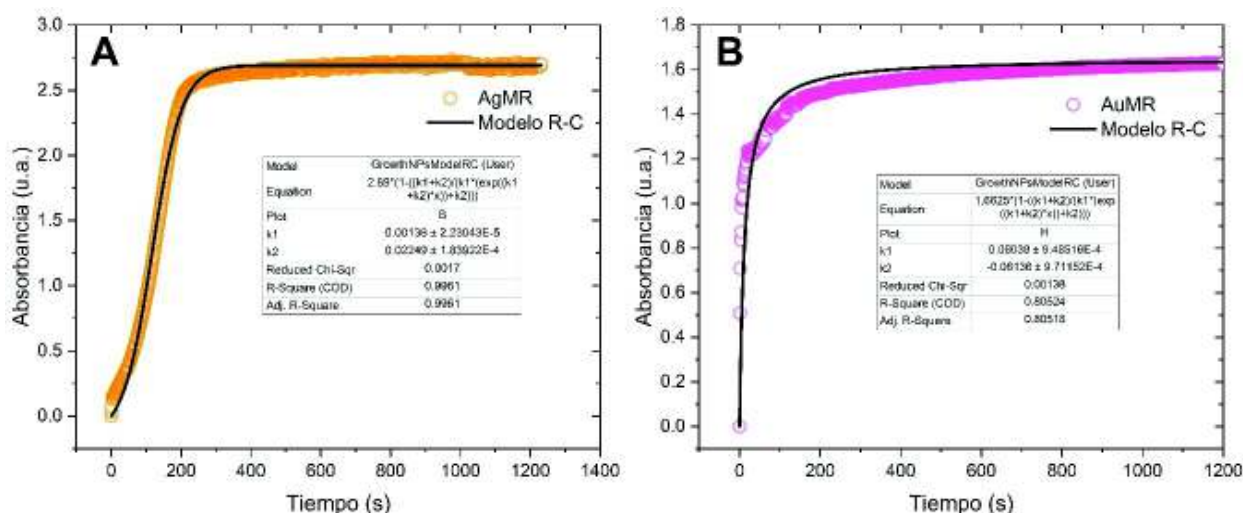
De los resultados de absorción obtenidos durante el proceso de lavado de las nanopartículas obtenidas de oro  $Au_E$  que se observan en la figura 5.8, se puede notar que inicialmente hubo un ligero aumento de la intensidad del plasmón de resonancia y una disminución del ancho de banda. Después, durante los últimos dos lavados, los parámetros se mantuvieron casi igual.



**Figura 5.8.** Espectros UV-vis del sistema Au<sub>E</sub> correspondiente a las distintas etapas del protocolo de limpieza.

### 5.2.2 Cinética de Reacción de síntesis por UV-vis *in situ*

La figura 5.9 corresponde a las cinéticas de formación de las nanopartículas de plata (A) y oro (B), respectivamente. Se observa de los datos experimentales que el comportamiento del crecimiento de la absorbancia es más rápido para el caso de las partículas de oro. De hecho, al comparar los tiempos requeridos en ambas síntesis para alcanzar el 80% de la absorbancia máxima en cada caso, tenemos que las partículas de plata requieren de 172 s para alcanzar el 80% mientras que las nanopartículas de oro alcanzan el mismo porcentaje en 62 s, es decir, el proceso de síntesis de las nanopartículas de oro se realiza en 1/3 del tiempo que requieren las nanopartículas de plata. En las figuras las líneas negras en las gráficas corresponden al ajuste experimental mediante el modelo de dos pasos (R-C) de la ecuación 3.3. que permite determinar los parámetros  $k_1$  (constante de la velocidad de nucleación) y  $k_2$  (constante de la tasa de crecimiento de las nanopartículas). En la tabla 5.2 se muestran los valores obtenidos de los ajustes.



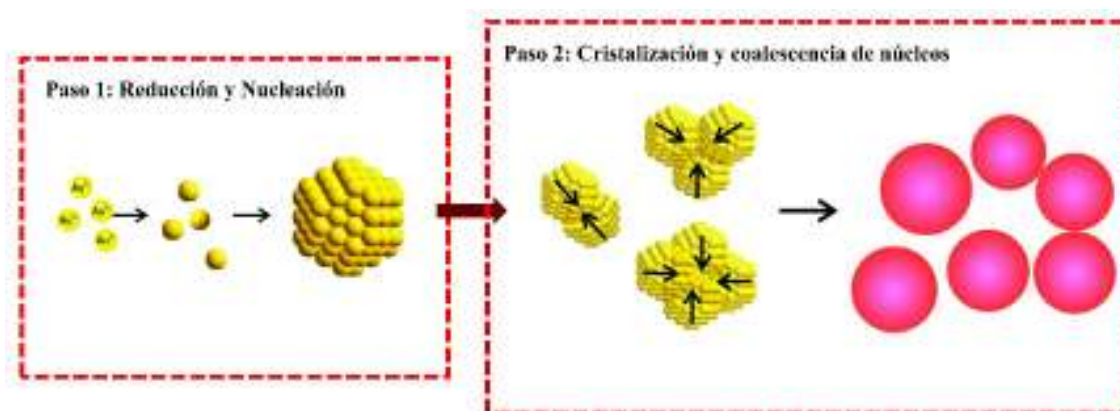
**Figura 5.9.** Cinética de formación de nanopartículas de plata (A) y de oro (B) sintetizadas con extracto de MR. Las curvas han sido ajustadas por el modelo Redox-cristalización.

**Tabla 5.2** Constantes de la velocidad de nucleación ( $K_1$ ) y de la tasa de crecimiento de las nanopartículas ( $K_2$ ) obtenidas del ajuste a los datos experimentales de las cinéticas de reacción de síntesis por UV-vis *in situ*.

Tipo de nanopartícula	$K_1$ (s <sup>-1</sup> )	$K_2$ (s <sup>-1</sup> )	$R^2$
AgMR	0.00136	0.02249	0.9961
AuMR	0.08038	-0.08136	0.8051

Los factores de correlación de los ajustes en la tabla 4.2 indican que la cinética de crecimiento para las nanopartículas de plata es bien descrita por este modelo mientras que en el caso del oro el factor de correlación ( $R^2$ ) es muy bajo. De hecho, el valor de  $K_2$  obtenido por el ajuste carece de significado físico-químico. Lo anterior se debe a que el proceso de síntesis de las nanopartículas de oro es muy rápido y los primeros 5 s de la reacción la absorbancia alcanza el 62% del valor máximo registrado. Para poder obtener información de la fase de reducción y nucleación de la síntesis del oro se requiere de técnicas experimentales más veloces. Particularmente en el contexto de espectroscopía UV-vis se puede dar seguimiento al proceso de síntesis de las nanopartículas con espectrofotómetros de arreglo de diodos, los cuales son equipos empleados para caracterizar diversas cinéticas de reacción por la alta resolución temporal de la técnica [8]. Para la síntesis de las nanopartículas de plata las constantes guardan la relación predicha por el modelo ( $K_1 < K_2$ ) indicando que el proceso de

crystalización y formación de las nanopartículas es más rápido que la etapa de reducción y nucleación. Estos procesos se describen gráficamente en la figura 5.10.



**Figura 5.10** Mecanismo propuesto para la formación de las nanopartículas metálicas en dos pasos, adaptado de referencia [9].

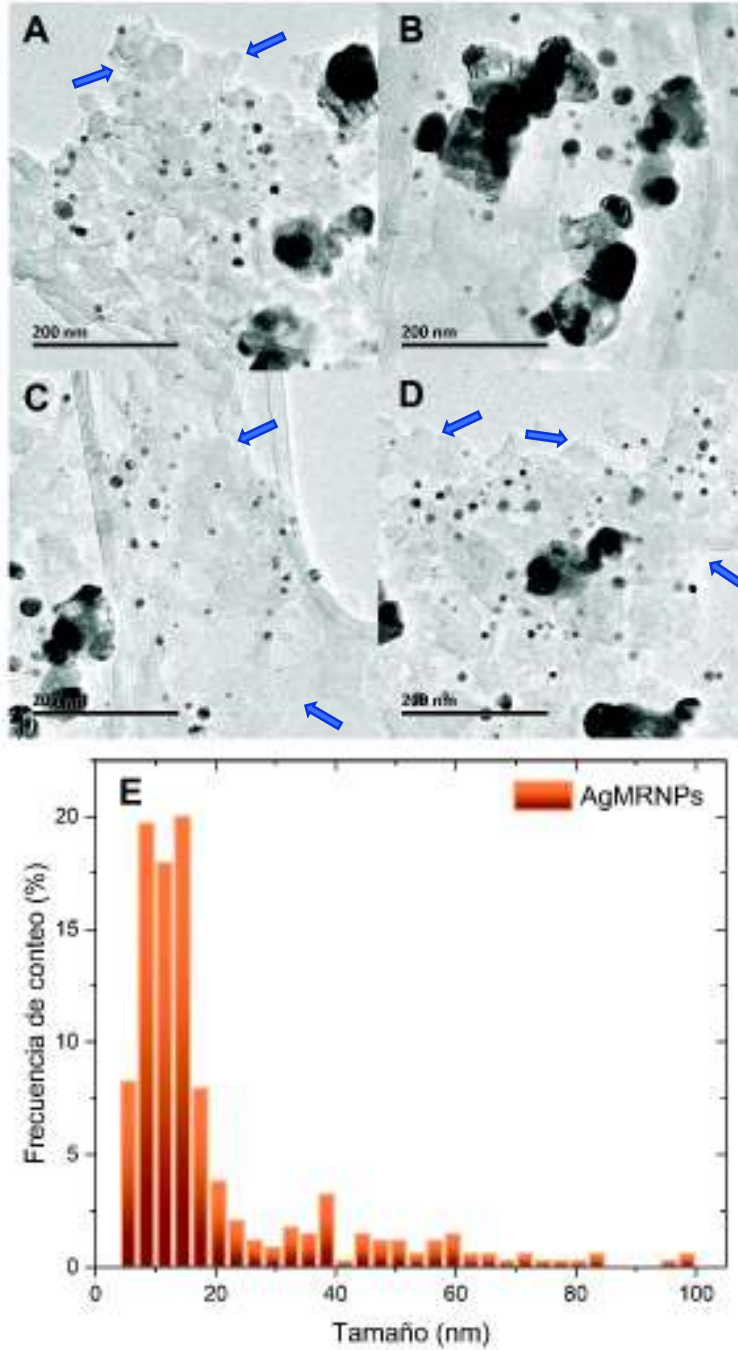
### 5.2.3 Microscopía electrónica de Transmisión

#### 5.2.3.1 Sistema de nanopartículas de plata sintetizadas con Mangle rojo (AgMRNPs)

Las micrografías de la microscopía electrónica de transmisión del sistema AgMRNPs mostradas en las figuras 4.11A a 4.11D indican que las partículas son polidispersas en tamaños, abundando las más pequeñas. El histograma de distribución de tamaños construido con 340 nanopartículas (figura 4.11E) indica que el 65% de las partículas son de tamaños menores a 20 nm con una distribución centrada en 15 nm. El promedio estadístico de los tamaños de la población total es de  $19.91 \pm 17.5 \text{ nm}$ . Se aprecia que las partículas más grandes se encuentran aglomeradas formando cúmulos de nanopartículas debido a un posible proceso de recristalización mientras que las más pequeñas se encuentran dispersas y embebidas en una matriz amorfa que puede asociarse al extracto remanente (flechas azules en micrografías) que prevalece aún después del proceso de limpieza al que se sometieron las partículas.

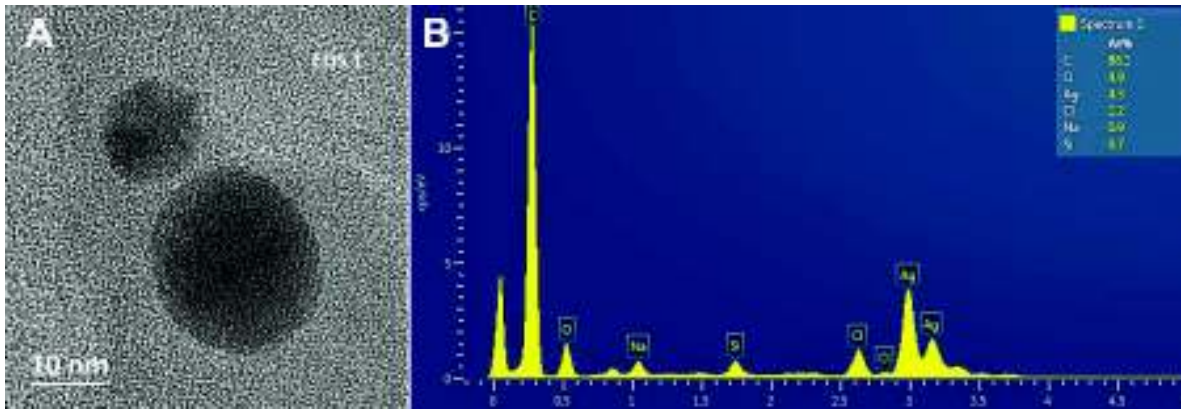
El análisis semicuantitativo de elementos químicos mediante energías dispersivas de rayos X (EDS) para una región que incluye un par de nanopartículas de plata (figura 5.12A) es mostrado en la figura 5.12B, donde el espectro indica claramente la presencia de la plata

alrededor de 2.98 keV correspondiente a la transición  $L_{\alpha}$ . De igual forma se detecta sodio y cloro, los cuales se asocian al extracto pues el mangle rojo crece en un ambiente de alta salinidad. El contenido atómico reportado para el oxígeno es muy similar al de plata guardando una proporción 1:1 lo que hace suponer que la plata no se encuentra oxidada pues en esa situación la relación debería ser al menos 2:1 (Ag:O). Atribuimos el alto contenido de oxígeno y carbono a los compuestos orgánicos del extracto que estabilizan a las nanopartículas como se indicaba en las micrografías de la figura 5.11, además, en la alta lectura para el carbono está contribuyendo también el soporte de carbono de la rejilla usada para el análisis por TEM/EDS. La figura 5.13 corresponde al análisis de alta resolución (HRTEM) efectuada sobre una nanopartícula de plata. En 5.13A se muestra un recuadro rojo que corresponde a la región seleccionada en la nanopartícula. Con el software Digital Micrograph se obtiene la transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada para generar el correspondiente patrón de difracción (Figura 5.13B) y a partir de ésta, con el software Digital Micrograph, es posible obtener la imagen integrada asociada a la región seleccionada (Figura 5.13C) y con el mismo software estimar la distancia interplanar asociada al arreglo periódico como se señala en la imagen. Esta distancia tiene valor de  $d = 2.36 \text{ \AA}$  y se asocia a el plano (111) correspondiente a la estructura fcc (cúbica centrada en las caras) de un cristal de plata [10].

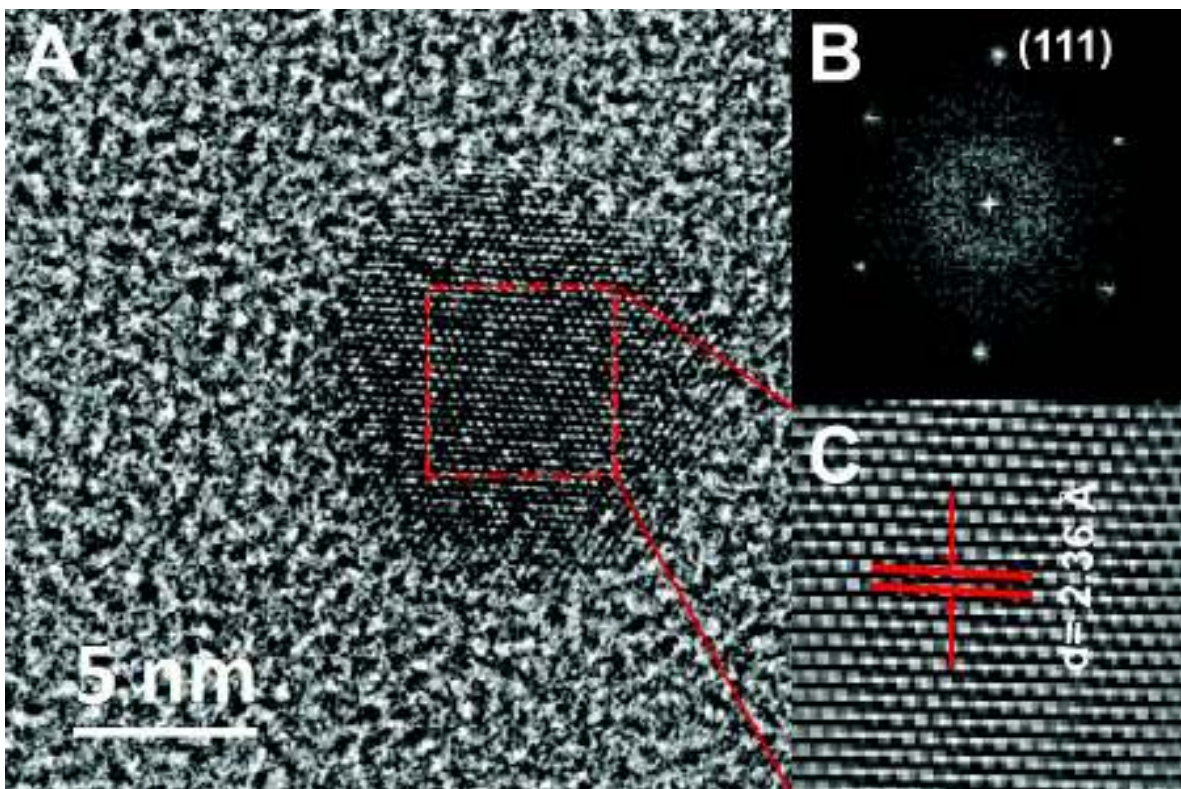


**Figura 5.11.** Micrografías TEM del sistema de nanopartículas AgMR (A-C) y su histograma de frecuencia de tamaños (E) construido con 340 partículas.



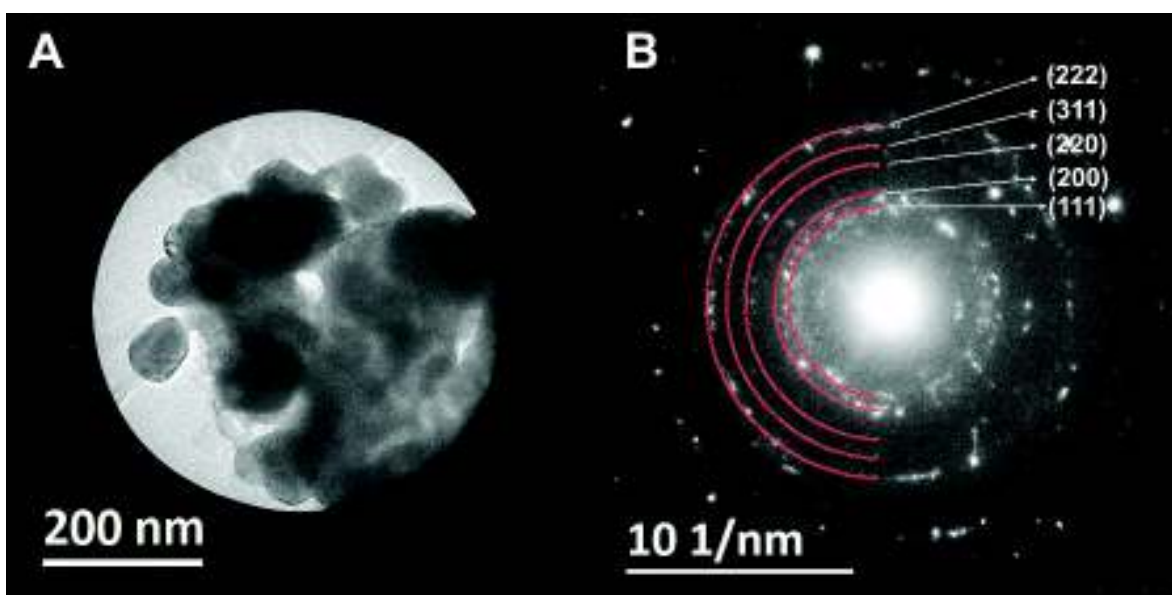


**Figura 5.12.** La micrografía de dos nanopartículas de plata (AgMRNPs) se muestra en (A). El correspondiente espectro de energías dispersivas de rayos X y la correspondiente concentración de elementos químicos se muestran en (B).



**Figura 5.13.** Micrografía de Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula de plata sintetizada con mangle rojo (A). La imagen en (B) corresponde a la Transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada en (A). En (C) se observa la imagen reconstruida a partir de la integración de (B) obteniéndose los planos característicos de la región seleccionada en (A).

La naturaleza cristalina de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de mangle rojo se evaluó mediante la obtención del patrón de difracción de electrones de área selecta (SAED). En la figura 5.14A se observa el grupo de nanopartículas de plata sobre el cual se enfocó el haz de electrones para obtener el patrón de difracción correspondiente. Los puntos brillantes de difracción de la figura 5.14B corresponden a los planos de reflexión de Bragg (111), (200), (220), (311) y (222) asociados a la estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc) de la plata [11].



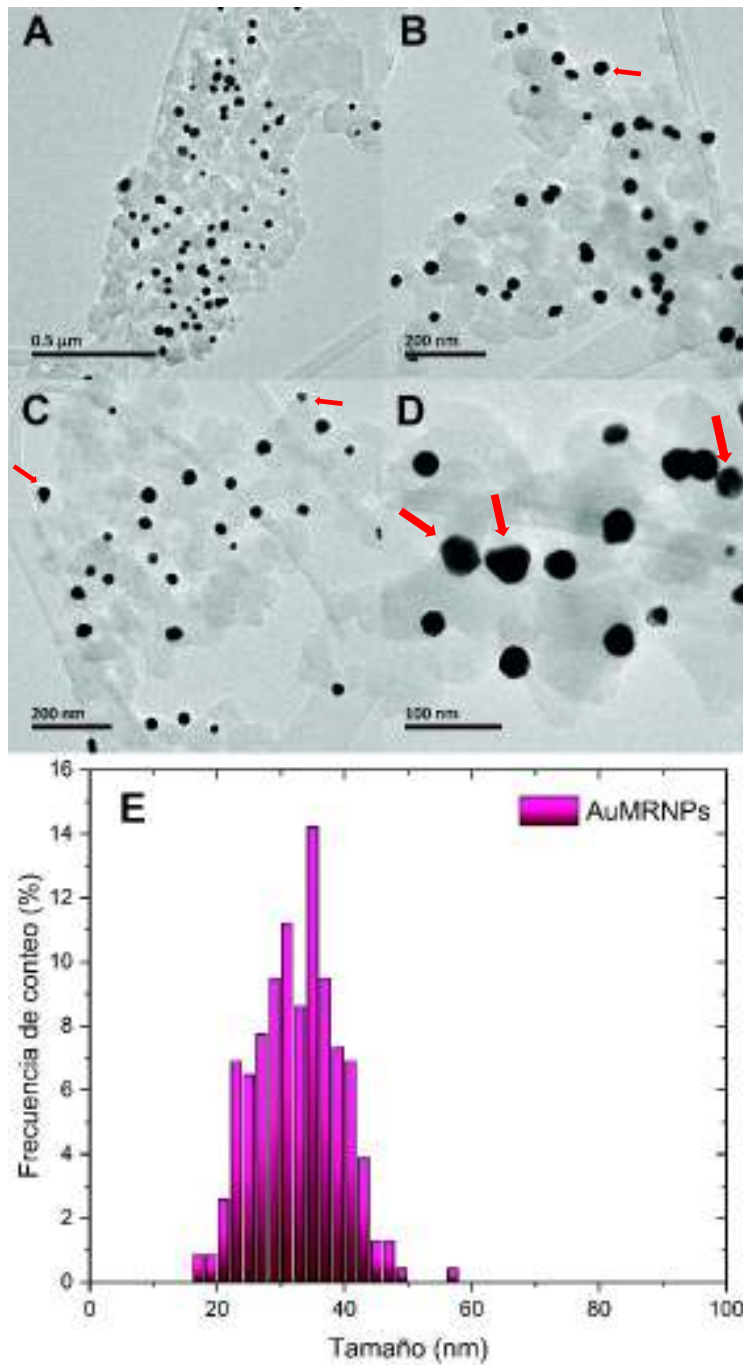
**Figura 5.14.** La micrografía en (A) corresponde al conjunto de nanopartículas de plata seleccionado para el estudio de la difracción de electrones. En (B) se muestra el patrón de difracción de electrones obtenido y la asignación de los distintos planos de Bragg asociados a la estructura cristalina fcc de la plata.

#### 5.2.3.2 Sistema de nanopartículas de oro sintetizadas con Mangle rojo (AuMRNPs)

Las formas y tamaños de las nanopartículas de oro sintetizadas con el extracto de mangle rojo se muestran en la figura 5.15. Se pueden observar las nanopartículas a distintas ampliaciones donde éstas se encuentran separadas unas de otras y sin detectarse agregados de nanopartículas o indicios de recristalización como en el caso de la plata. Las formas



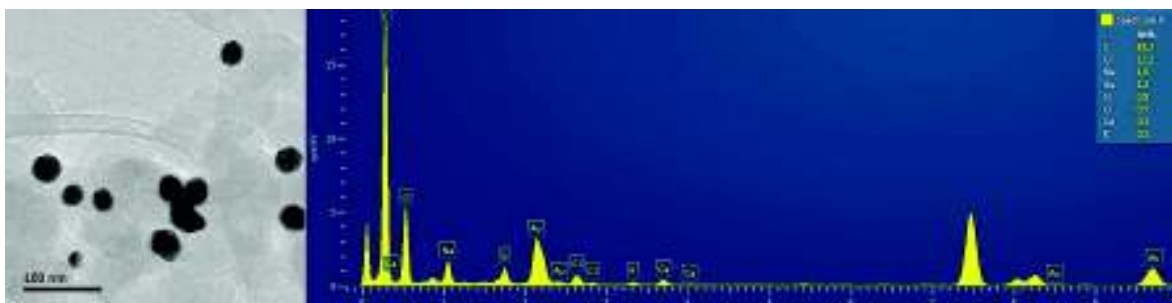
dominantes son isotrópicas (cuasi esférica) detectándose también partículas con geometrías regulares y aristas bien definidas indicadas por las flechas rojas. Particularmente en la figura 5.15D se observan la presencia de nanopartículas con geometrías de triángulos trancos e icosaédricas. En 5.15E se muestra el histograma correspondiente a la distribución de tamaños de las nanopartículas.



**Figura 5.15.** Micrografías TEM del sistema de nanopartículas AuMR (A-D) a distintas ampliaciones y su histograma de frecuencia de tamaños (E) construido con 300 partículas.

A diferencia de las partículas de plata, los tamaños promedio de las nanopartículas de oro son en promedio más grandes ( $32.7 \pm 6.6 \text{ nm}$ ), sin embargo, los tamaños se distribuyen en un rango más pequeño [15-60 nm] que en el caso de las partículas de plata [5-100 nm].

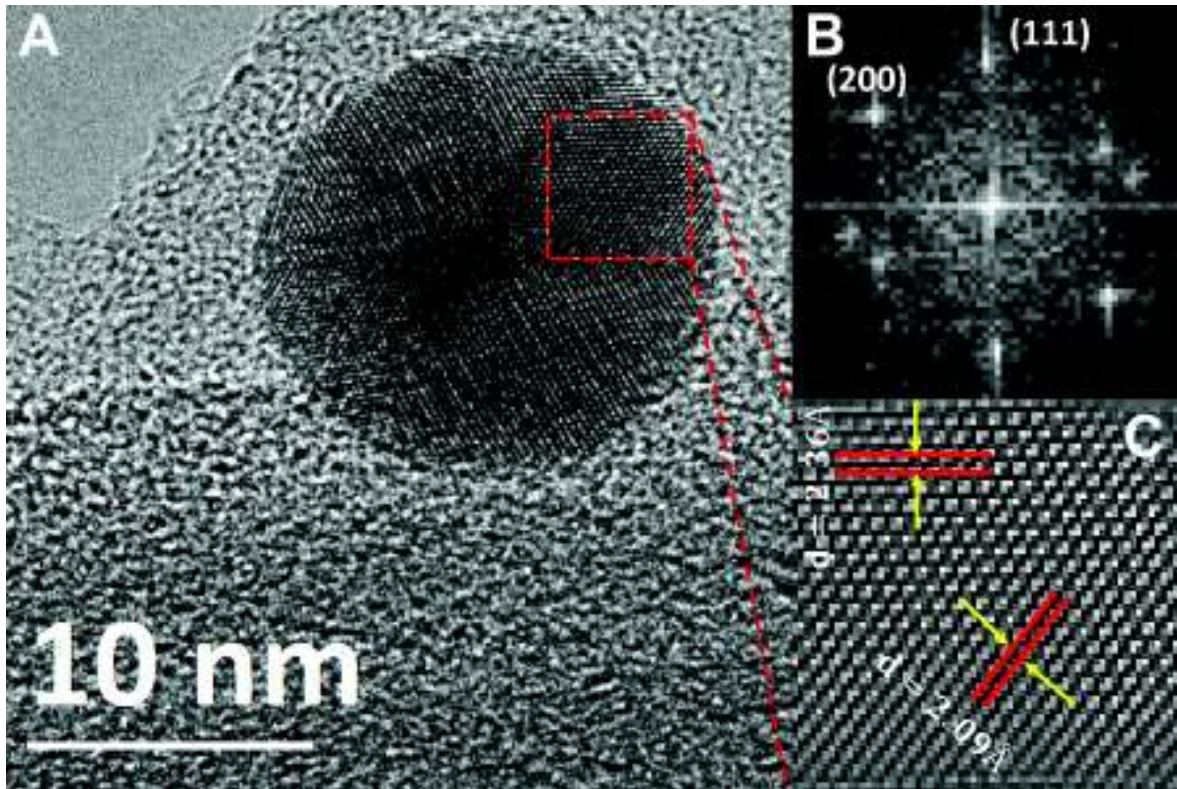
En la figura 5.16 se muestra el espectro de energías dispersivas de rayos x de un grupo de nanopartículas de oro (AuMR). Se observa en la imagen que las nanopartículas se encuentran inmersas en una matriz traslúcida a los electrones. La abundancia de elementos como C y O indica que las nanopartículas coexisten con abundantes moléculas asociadas al extracto que aún prevalece después del proceso de limpieza aplicado al sistema de nanopartículas. También en el espectro se muestra la presencia del oro cerca de 2.1 keV (transición  $M_{\alpha}$ ) y en 9.7 keV (transición  $L_{\alpha}$ ), corroborando que las partículas son de oro. Al igual que en el caso de las partículas de plata, se detecta Na y Cl asociados a la sal del ambiente marino donde crece el mangle rojo.



**Figura 5.16.** Espectro de energías dispersivas de rayos X y la correspondiente concentración de elementos químicos de un conjunto de nanopartículas de oro sintetizadas con mangle rojo.

La micrografía de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula de oro es mostrada en la figura 5.17. Se ha seleccionado una región en el lado derecho de la partícula indicada por un recuadro rojo para su análisis cristalográfico (5.17A). La correspondiente transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada se muestra en la figura 5.17B y a partir de ésta, con el software Digital Micrograph, es posible obtener la imagen integrada IFFT (Figura 5.17C) para reconstruir los planos cristalinos y con el mismo software estimar la distancia interplanar asociada al arreglo periódico como se señala en la imagen. Se han logrado

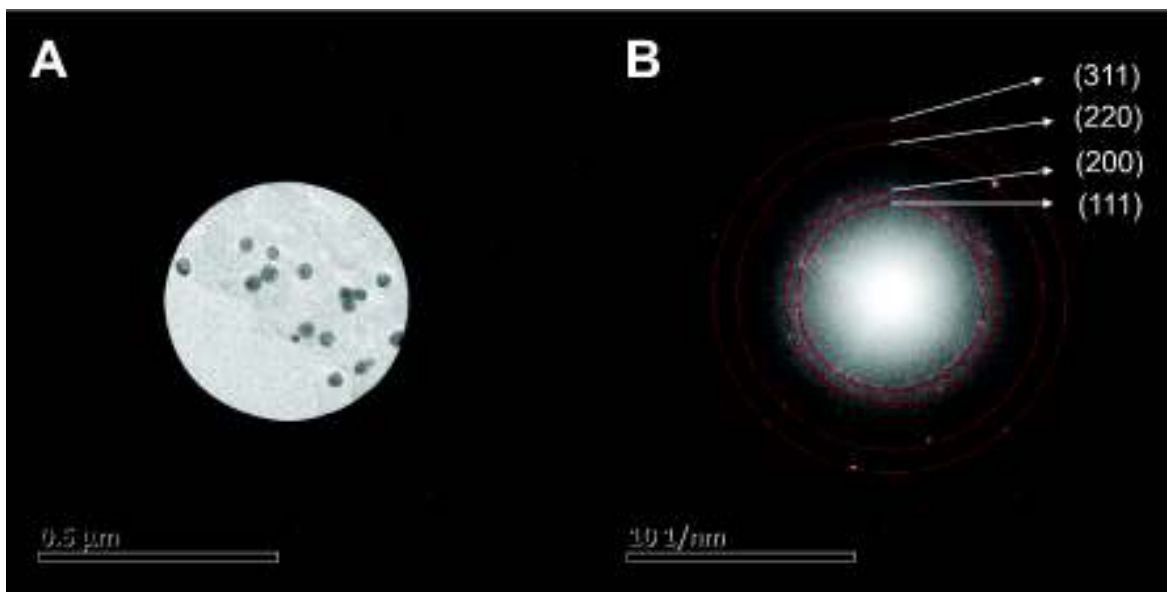
caracterizar dos planos cristalinicos diferentes cuyas distancias son  $d_1=2.36 \text{ \AA}$  y  $d_2=2.09 \text{ \AA}$ , las cuales se asocian a los planos (111) y (200), respectivamente, correspondientes a la estructura fcc (cúbica centrada en las caras) de un cristal de oro [12].



**Figura 5.17.** Micrografía de Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de una nanopartícula de oro sintetizada con mangle rojo (A). La imagen en (B) corresponde a la Transformada rápida de Fourier (FFT) de la región seleccionada en (A). En (C) se observa la imagen reconstruida a partir de la integración de (B) obteniéndose los planos característicos de la región seleccionada en (A).

La cristalinidad de las nanopartículas de oro sintetizadas con extracto de mangle rojo se evaluó mediante la caracterización del patrón de difracción de electrones de área selecta (SAED). En la figura 5.18A se observa un grupo de 15 nanopartículas de oro sobre el cual se enfocó el haz de electrones para obtener el patrón de difracción correspondiente. Los puntos brillantes de difracción de la figura 5.18B corresponden a los planos de reflexión de Bragg

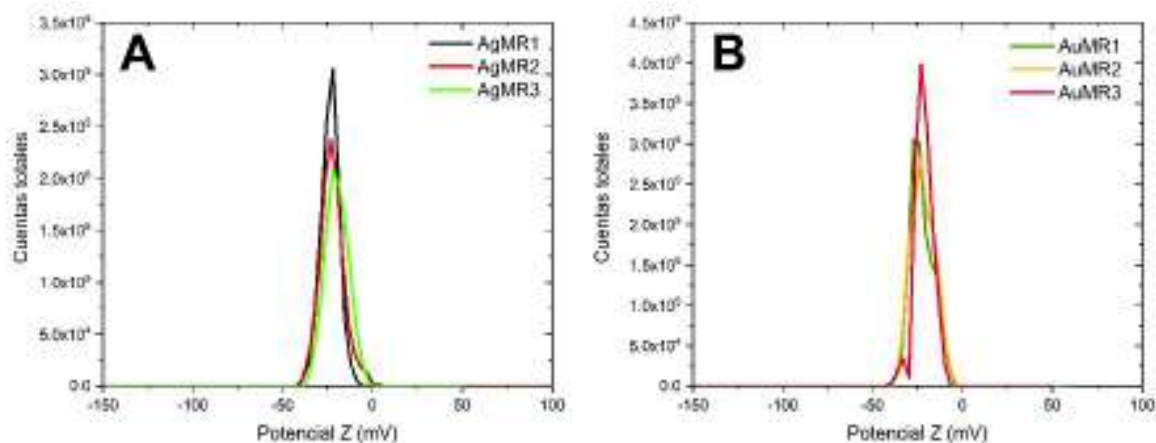
(111), (200), (220) y (311) asociados a la estructura cristalina cúbica centrada en las caras (fcc) del oro [13].



**Figura 5.18.** La micrografía en (A) corresponde al conjunto de nanopartículas de oro seleccionado para el estudio de la difracción de electrones. En (B) se muestra el patrón de difracción de electrones obtenido y la asignación de los distintos planos de Bragg asociados a la estructura cristalina fcc del oro.

Adicionalmente a la caracterización por TEM para ambos sistemas de nanopartículas (AgMR y AuMR) se evaluó la carga superficial de ambas dispersiones coloidales de nanopartículas en agua ultrapura mediante la cuantificación de los potenciales zeta. Para el sistema AgMR el potencial zeta es  $\xi_{AgMR} = -21.9 \pm 1.94 \text{ mV}$  y para el sistema AuMR  $\xi_{AuMR} = -22.3 \pm 2.09 \text{ mV}$ . Los valores negativos de estos potenciales pueden asociarse a los compuestos polifenólicos ricos en grupos -OH presentes en los sistemas de nanopartículas. Generalmente en la síntesis verde con extractos de plantas suelen reportarse valores absolutos de potenciales Z mayores a 30 mV [14], el cual es aceptado como criterio de estabilidad electrostática de los sistemas de partículas coloidales dispersar en solventes. La presencia de varios iones encontrados por EDS en nuestro sistema de partículas, asociados al origen mismo de la planta mangle rojo cuyo hábitat es el entorno marino, pueden contribuir notablemente al

apantallamiento de las interacciones electrostáticas. De hecho, para las nanopartículas AgMR se detectaron por TEM procesos de agregación y coalescencia de nanopartículas (ver figura 5.11) atribuible a este bajo potencial Z del sistema.



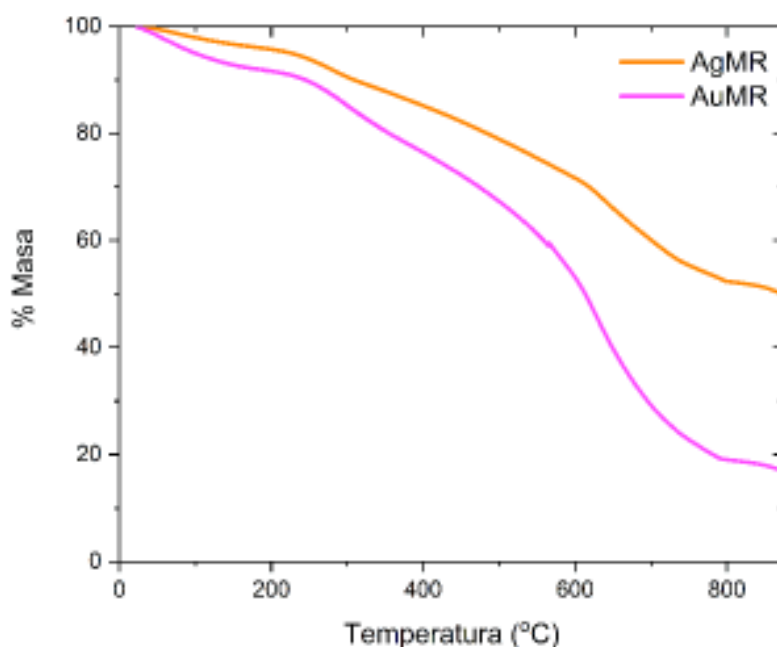
**Figura 5.19.** Potenciales zeta de los sistemas de dispersiones coloidales de nanopartículas de AgMR (A) y AuMR (B).

#### 5.2.4 TGA de Nanopartículas

De las curvas de TGA mostradas en la figura 5.20 se observa que en general el comportamiento de las curvas es muy similar y se distinguen al menos 4 regiones bien definidas. La primera parte comprende de 25 °C a 220 °C y se asocia al agua libre y ligada que se ha desincorporado de los nanomateriales formados por parte orgánica y metálica. Las regiones 220 °C - 590 °C y 590 °C - 780°C son asociadas a la degradación de los constituyentes del extracto hasta su eliminación. De 780 °C a 850 °C las curvas se aplanan y alcanzan el equilibrio indicando que en esta región se tiene la parte metálica libre de extracto. El contenido metálico de plata para las AgMR es del 49.81% de acuerdo a la gráfica y el contenido de oro para las AuMR es solamente del 17%. Lo anterior indica que el porcentaje de material orgánico es del 50.19% y 83 % para AgMR y AuMR, respectivamente. Para el caso de las nanopartículas de plata el valor aquí obtenido coincide con lo reportado en otras síntesis con extractos de plantas [15]. Interesantemente, estas curvas de TGA



coinciden con lo predicho por espectroscopía UV-vis (figuras 5.6 y 5.8) donde se observa que la relación de la intensidad de la banda de absorción asociada al extracto respecto al plasmón de resonancia de las partículas resulta menor para el caso de las AgMR que en el caso de AuMR indicando que el contenido de extracto es mayor para las nanopartículas de oro.



**Figura 5.20.** Curvas de termogravimetrías de las nanopartículas AgMR y AuMR.

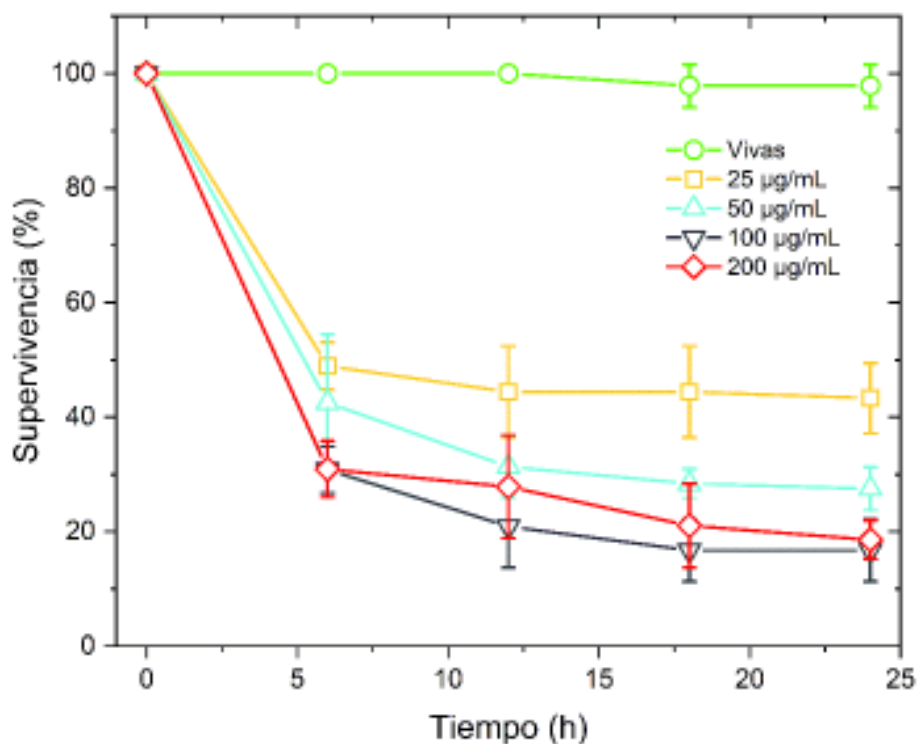
### 5.3 Ensayo de citotoxicidad en *Artemia Franciscana*

#### 5.3.1 Ensayo de supervivencia de *Artemia franciscana* alimentadas con nanopartículas AgMR

El estudio de toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas con mangle rojo en *Artemias salinas* indican un elevado efecto tóxico en la viabilidad aún en la concentración más baja del estudio (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y a partir de las primeras 6 horas. Este resultado tienen concordancia con algunos trabajos realizados previamente como el que reporta Pecoraro *et al.*, en el 2021 [16] donde al comparar nanopartículas con tamaño promedio de 50nm y sintetizadas químicamente de los metales de plata, oro y dióxido de

titanio, logran ver que tanto las nanopartículas de oro como las de titanio no tienen efectos adversos en el desarrollo del organismo una vez fuera del quiste, en cambio el efecto negativo en la supervivencia ante las nanopartículas de plata fue 5 veces mayor a la del oro. Otra razón de porque la plata es más tóxica es las nanopartículas momento de ingresar a un medio puede disolverse, formando con ello iones, iones que pueden agregarse, tener masa y morfología diferente dependiendo condiciones del sistema como el tiempo, temperatura y/o pH del medio. En el estudio comparativo de toxicidad *in vivo* utilizando peces cebra adultos de Ramachandran *et al.* del 2018 [17], se observó que las AgNPs generan altos niveles de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con las AuNPs.

En nuestro trabajo podemos observar que las nanopartículas de plata presentaron una baja en la supervivencia del organismo en las primeras 6 horas y se mantuvo durante el resto del ensayo (Figura 5.21).

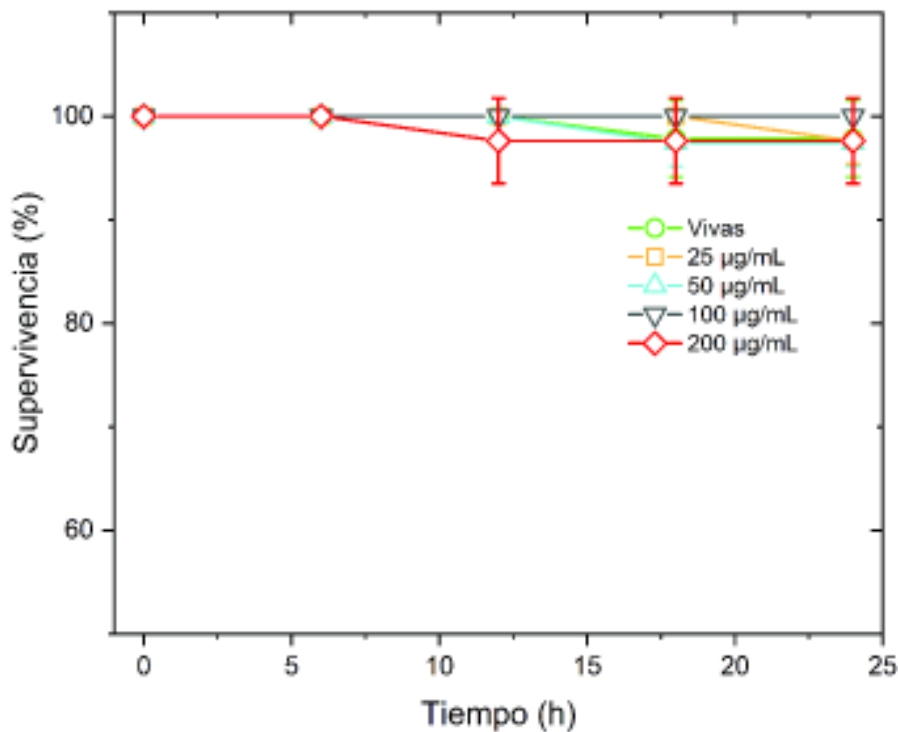


**Figura.5.21.** Supervivencia de *Artemia franciscana* durante 24 horas en presencia de nanopartículas de plata a distintas concentraciones.



### 5.3.2 Ensayo de supervivencia de *Artemia franciscana* alimentadas con nanopartículas AgMR

El estudio de toxicidad de las nanopartículas de oro sintetizadas con mangle rojo en *Artemia franciscana* indican un nulo efecto tóxico en la viabilidad aún en la concentración más alta del estudio (200 µg/mL) y a partir de las primeras 6 horas.



**Figura 5.22.** Supervivencia de *Artemia franciscana* durante 24 horas en presencia de nanopartículas de oro a distintas concentraciones.

En la figura 5.22 se puede apreciar que el efecto de las AuNPs sintetizadas con mangle rojo no presentan una diferencia al control de vivas en ninguna de sus concentraciones en porcentaje de supervivencia. Diversos estudios de nanopartículas de oro en organismos marinos, incluyendo la artemia ha demostrado ejercer una nula toxicidad en estos. En el estudio de Solanki *et al.* del 2021 [18] evaluaron la toxicidad de nanopartículas de oro obtenidas mediante síntesis verde en modelo de *Artemia franciscana*, en dicho estudio

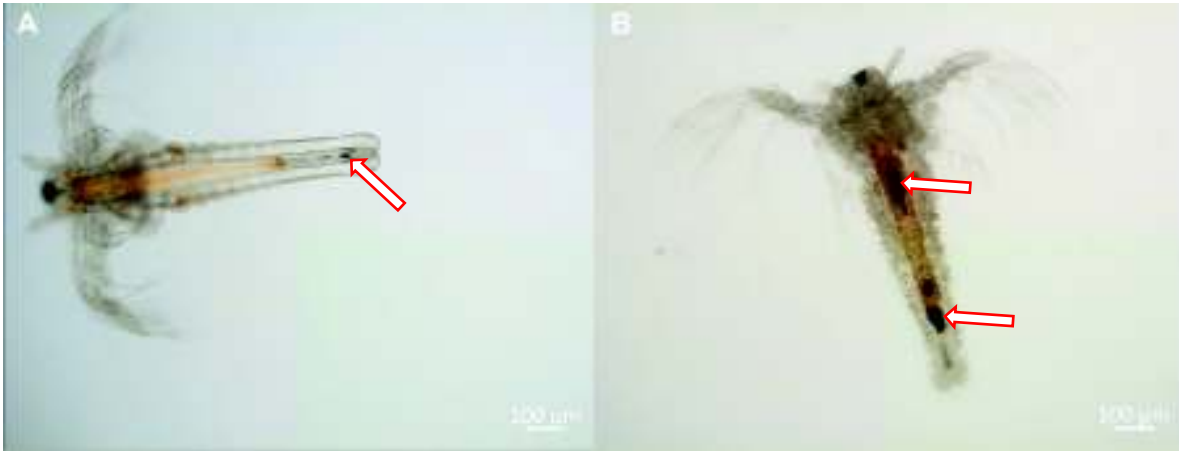
reportaron la nula toxicidad del oro en los organismos al probar distintos rangos de concentraciones. A su vez se logró observar en los organismos la acumulación del material previamente reportado por Alvarez *et al.*, 2019 [19].



**Imagen 5.23.** *Artemia franciscana* con acumulación de nanopartículas de plata reportada por Alvarez *et al.*, 2019 [19].

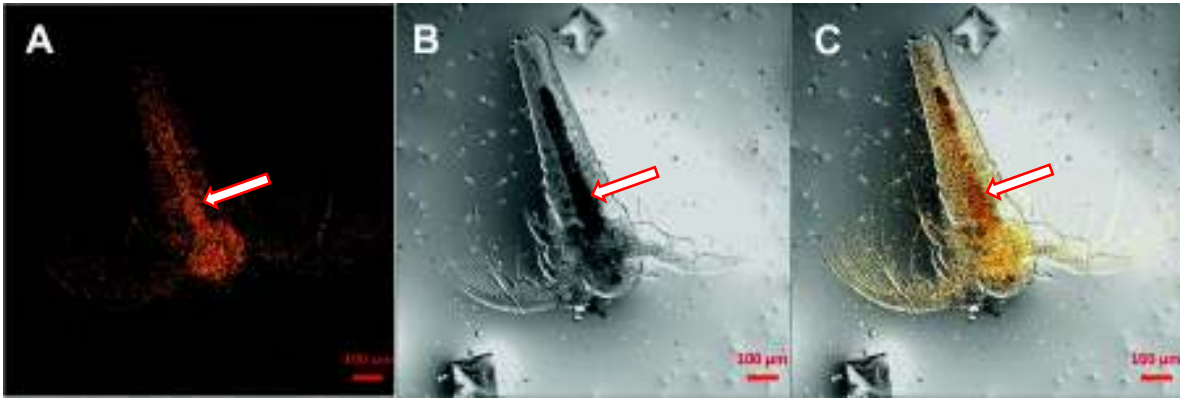
### 5.3.3 Retención de nanomateriales por *Artemia franciscana*

Se considera a la artemia como un organismo filtrador no selectivo [20], por lo cual la acumulación de materiales en su tracto digestivo es aprovechado por la industria para proveer medicamentos y nutrientes a organismos que así lo necesitan.



**Figura 5.24.** Imágenes de campo claro de *Artemias franciscana* tratadas con nanopartículas AgMR a 200 µg/mL. En (A) y (B) las flechas indican las regiones dentro del tracto digestivo donde se observan porciones del material ingerido.

En la figura 5.25 se muestra el ejemplar de una *Artemia franciscana* que posee aún alimento (nanopartículas AgMR) en su tracto digestivo como se observa en la figura 5.25B correspondiente a la imagen de campo claro por luz laser transmitida. El microscopio confocal de barrido laser permite capturar simultáneamente la imagen de campo claro y fluorescencia al excitar la muestra con luz laser de 488 nm a 3 % de máxima potencia (10 mW) y coleccionar la emisión en la región 500-587 nm (figura 5.25A). Como se observa en la imagen construida al barrer la superficie (1.25 mm × 1.25mm) en 20s, la intensidad de la fluorescencia del tracto digestivo cargado con nanopartículas AgMR (ver flecha) contrasta notoriamente con el resto de la autofluorescencia del cuerpo de la *Artemia* que está principalmente conformado por quitina. Esto es particularmente claro en la imagen 5.25C que resulta de superponer 5.25A y 5.25B. Lo anterior indica que aún después de 12 horas de haber ingerido el nanomaterial, la *Artemia franciscana* retiene un contenido importante de éste lo que puede contribuir a su alto efecto tóxico en la viabilidad.



**Figura 5.25.** Especimen de *Artemia franciscana* analizada por microscopía confocal de barrido laser donde la imagen de fluorescencia excitando a 488 nm se muestra en (A). La imagen de campo claro en (A). La imagen de campo claro y la fusión de ambas imágenes se presentan en (B) y (C), respectivamente.



**Figura 5.26.** Imágenes de campo claro de *Artemias franciscanas* tratadas con nanopartículas AgMR a 100 µg/mL. En (A) y (B) las flechas indican las regiones dentro del tracto digestivo donde se observan porciones del material ingerido.

Lo observado en nuestro trabajo fue algo reportado previamente por Pecoraro *et al* en el 2021 [16] que observó una acumulación de nanomateriales obtenidos mediante síntesis química en el intestino de la artemia (figura 5.27), a su vez Alvarez et al. en el 2019 [19] reportó las 18

horas como el tiempo después de la administración de nanopartículas donde se observan con mayor acumulación de nanomaterial en su interior (figura 5.28).



**Figura 5.27.** Imagen modificada de Pecoraro et al., 2021[16] donde se observa la acumulación de nanopartículas de titanio, oro y plata en ese orden.

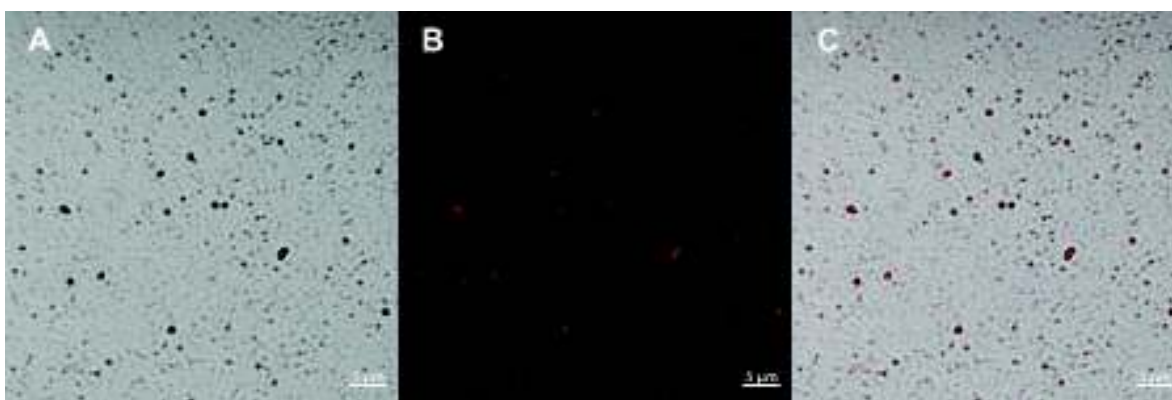


**Figura 5.28.** Imagen modificada de Alvarez et al. 2019 [19]. Nanopartículas de plata sintetizadas con *Rumex hymenosepalus*

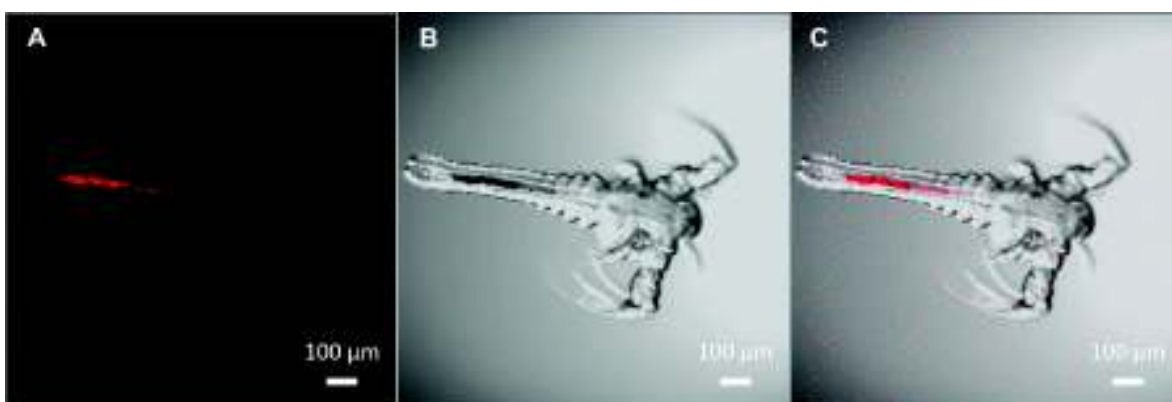
#### 5.3.4. Estudio de las nanopartículas AgMR y AuMR por Microscopía Confocal de Barrido Laser

Las imágenes de las nanopartículas AuMR caracterizadas en el equipo del microscopio confocal Zeiss LSM800 son mostradas en la figura 5.29. Para la observación se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para las nanopartículas AgMR. Las imágenes se colectaron empleando un objetivo Plan-Apocromático 40X/0.95 con un pinhole de 49.35  $\mu\text{m}$  y un área de captura con ampliación 3X de 53.24  $\times$  53.24  $\mu\text{m}$ . El tiempo de colecta para las imágenes fue de 7.45 s para toda la superficie barrida. La figura 5.29A corresponde a la imagen de campo claro obtenida con láser de 561 nm en el modo de luz transmitida. Los agregados de nanopartículas AuMR formados por el proceso de secado en el cubreobjetos tienen tamaños promedio de 795  $\pm$  160 nm, determinados con el software imageJ. La Figura 5.29B corresponde a la reflectancia asociada a las nanopartículas de oro expuestas al laser de 561 nm y a diferencia de las nanopartículas de plata (AgMR), la autofluorescencia asociada al extracto remanente en las nanopartículas al ser excitadas a 561 nm es de muy baja intensidad. Esta alta reflectividad del oro puede aprovecharse en la microscopía confocal para colectar eficientemente la luz laser reflejada por las nanopartículas y efectuar capturas de procesos temporalmente rápidos por esta técnica. Para ilustrar esto, en la figura 5.30 se muestra un espécimen de *Artemia franciscana* después de alimentarse con nanopartículas de oro AuMR. El espécimen se encuentra aún vivo al momento de colectar la imagen por confocal por lo que se requirió un tiempo de barrido muy breve para integrar la imagen completa. El tiempo total empleado en esta imagen fue de  $t = 0.96$  s, con un barrido de línea de 3.64 ms y un área total de imagen de 1.26 mm  $\times$  1.26 mm. Como se observa en las tres imágenes correspondientes a la imagen de reflectancia (figura 5.30A), imagen de campo claro (figura 5.30B) y la fusión de ambas (figura 5.30C), la artemia aún conserva alimento en su tracto digestivo (figura 5.30B) y al ser expuesta a luz laser de 561nm el contenido en el tracto emite intensamente (figura 5.30A). Interesantemente en la figura 5.30C se observa claramente que la luz roja colocaliza perfectamente con el compuesto de oro ingerido por la artemia y que aún preserva en el tracto después de 12 horas. De igual forma se aprecia la ausencia de autofluorescencia proveniente del cuerpo de la artemia lo cual difiere sustancialmente con la imagen confocal de artemia conteniendo nanopartículas AgMR. Esto puede explicarse por las diferentes longitudes de onda de los laser de excitación empleados

(488 nm para artemia con AgMR y 561 nm para artemia con AuMR) y por los diferentes tiempos de colecta implementados (20 s para AgMR y 0.96 s AuMR). Este resultado nos permite establecer que es factible rastrear y ubicar espacialmente nanopartículas por microscopía confocal basados en las propiedades fluorescentes y/o reflectivas de ellas, siendo en nuestro caso más eficiente para las nanopartículas de oro debido a su mayor reflectividad que hace posible su uso en proceso temporalmente cortos ( $t < 1$  s). Así mismo, el estudio por microscopía confocal de *Artemias franciscanas* alimentadas con las diferentes nanopartículas sintetizadas con mangle rojo permite asegurar la eficiente ingesta y retención de los nanomateriales.



**Figura 5.29.** Nanopartículas AuMR por microscopía confocal de barrido láser en modo de luz láser transmitida (A) y en modo de emisión (B). La figura (C) corresponde a la fusión de las imágenes (A) y (B).

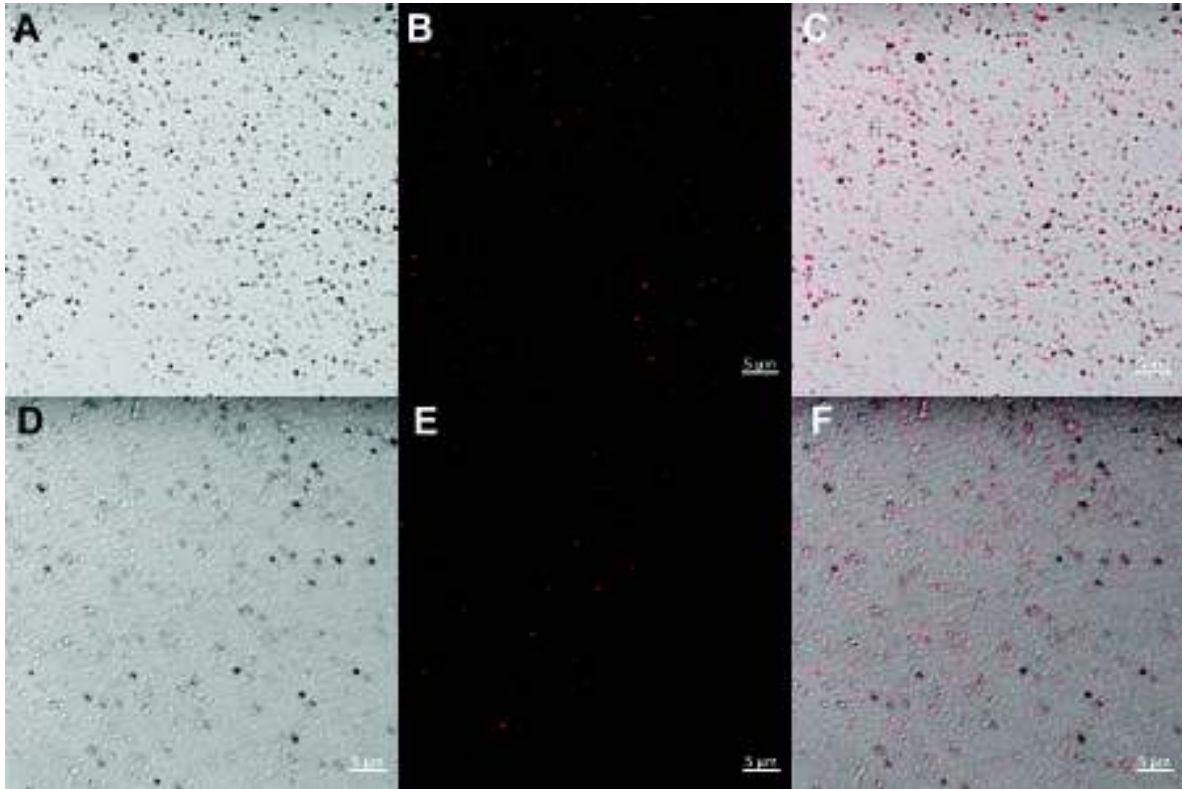


**Figura 5.30.** Especimen de *Artemia franciscana* alimentada con AuMR analizada por microscopía confocal de barrido láser. La imagen (A) es formada por la reflectividad del material de oro. La imagen de campo claro y la fusión de ambas imágenes se presentan en (B) y (C), respectivamente.

### 5.3.5 Estudio de las nanopartículas AgMR por Microscopía Confocal de Barrido Laser

Las imágenes de las nanopartículas AgMR caracterizadas en el equipo del microscopio confocal Zeiss LSM800 son mostradas en la figura 5.31. Para la obtención de las imágenes, 20  $\mu$ L de la dispersión coloidal de nanopartículas son depositados en un cubreobjetos de 17  $\mu$ m de espesor. La gota se deja secar a temperatura ambiente y se procede a su estudio en el equipo mencionado. Las figuras 5.31A y 5.31C corresponden a imágenes de campo claro obtenidas con láser de 488 nm en el modo de luz transmitida. Los puntos negros corresponden a aglomerados de nanopartículas que se forman por el proceso de secado sobre el vidrio cuyos tamaños promedios son  $656 \pm 143$  nm determinados con el software imageJ. Las figuras 5.31B y 5.31E corresponden a la autofluorescencia de las nanopartículas en el mismo campo visual de las imágenes 5.31A y 5.31D analizadas por microscopía confocal de barrido laser. La señal autofluorescente fue estimulada con el láser de excitación de 488 nm a 3% de su potencia máxima (10 mW) colectándose la emisión en la región de 500-587 nm. Esta autofluorescencia es asociada a las moléculas del extracto que se encuentra acomplejadas a la superficie de las nanopartículas. Se conoce que las moléculas polifenólicas muestran respuesta fluorescente intensa en gran parte del espectro visible. Las figuras 5.31C y 5.31E corresponden a la fusión de las imágenes del campo claro (figuras 5.31A y 5.31D) con las imágenes de fluorescencia (figuras 5.31B y 5.31E), respectivamente. Como se observa, la posibilidad de colectar fluorescencia de las nanopartículas acomplejadas con las moléculas del extracto de mangle rojo provee una herramienta útil para ubicar espacialmente a estos nanomateriales dentro del tracto digestivo de las larvas de *Artemia franciscana* cuando son ingeridos por ellas.





**Figura 5.31.** Caracterización del sistema de nanopartículas AgMR por microscopía confocal de barrido laser en modo de luz laser transmitida (A) y (D) y en modo de emisión (B) y (E). (C) corresponde a la fusión de las imágenes (A) y (B) mientras que las imágenes (D) y (E) son fusionadas en (F).

## Referencias

- [1] Alexandre-Tudo, J. L., & Du Toit, W. (2018). The role of UV-visible spectroscopy for phenolic compounds quantification in winemaking. *Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages*, 1-21.
- [2] Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., & Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(3), 517-525.
- [3] Rodríguez-León, E., Rodríguez-Vázquez, B. E., Martínez-Higuera, A., Rodríguez-Beas, C., Larios-Rodríguez, E., Navarro, R. E., ... & Iñiguez-Palomares, R. A. (2019). Synthesis of gold nanoparticles using *Mimosa tenuiflora* extract, assessments of cytotoxicity, cellular uptake, and catalysis. *Nanoscale research letters*, 14(1), 1-16.
- [4] Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., & Rajbhandary, S. (2020). Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*, 2020.
- [5] Neiva, D. M., Araujo, S., Gominho, J., de Cássia Carneiro, A., & Pereira, H. (2018). Potential of *Eucalyptus globulus* industrial bark as a biorefinery feedstock: Chemical and fuel characterization. *Industrial Crops and Products*, 123, 262-270.
- [6] Lima, L., Miranda, I., Knapic, S., Quilhó, T., & Pereira, H. (2018). Chemical and anatomical characterization, and antioxidant properties of barks from 11 *Eucalyptus* species. *European journal of wood and wood products*, 76(2), 783-792.
- [7] Bharathi, D., Josebin, M. D., Vasantharaj, S., & Bhuvaneshwari, V. (2018). Biosynthesis of silver nanoparticles using stem bark extracts of *Diospyros montana* and their antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(1), 83-92.
- [8] Palluccio, T. D., Rybak-Akimova, E. V., Majumdar, S., Cai, X., Chui, M., Temprado, M., ... & Hoff, C. D. (2013). Thermodynamic and kinetic study of cleavage of the N–O bond of N-oxides by a vanadium (iii) complex: enhanced oxygen atom transfer reaction rates for adducts of nitrous oxide and mesityl nitrile oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 135(30), 11357-11372.

- [9] Polte, J., Erler, R., Thunemann, A. F., Sokolov, S., Ahner, T. T., Rademann, K., ... & Kraehnert, R. (2010). Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution. *ACS nano*, 4(2), 1076-1082.
- [10] Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (Rumex hymenosepalus extracts). *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9.
- [11] Das, D., Ghosh, R., & Mandal, P. (2019). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using S1 genotype of Morus alba leaf extract: characterization, antimicrobial and antioxidant potential assessment. *SN Applied Sciences*, 1(5), 1-16.
- [12] Villalobos-Noriega, J. M. A., Rodríguez-León, E., Rodríguez-Beas, C., Larios-Rodríguez, E., Plascencia-Jatomea, M., Martínez-Higuera, A., ... & Iñiguez-Palomares, R. A. (2021). Au@ Ag Core@ Shell Nanoparticles Synthesized with Rumex hymenosepalus as Antimicrobial Agent. *Nanoscale research letters*, 16(1), 1-19.
- [13] Ndeh, N. T., Maensiri, S., & Maensiri, D. (2017). The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(3), 035008.
- [14] Martínez-Higuera, A., Rodríguez-Beas, C., Villalobos-Noriega, J. M. A., Arizmendi-Grijalva, A., Ochoa-Sánchez, C., Larios-Rodríguez, E., ... & Iñiguez-Palomares, R. (2021). Hydrogel with silver nanoparticles synthesized by Mimosa tenuiflora for second-degree burns treatment. *Scientific reports*, 11(1), 1-16.
- [15] Kajani, A. A., Bordbar, A. K., Esfahani, S. H. Z., Khosropour, A. R., & Razmjou, A. (2014). Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles with potent anticancer activity using Taxus baccata extract. *Rsc Advances*, 4(106), 61394-61403.
- [16] Pecoraro, R., Scalisi, E. M., Messina, G., Fragalà, G., Ignoto, S., Salvaggio, A., ... & Brundo, M. V. (2021). Artemia salina: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. *Microscopy Research and Technique*, 84(3), 531-536.
- [17] Ramachandran, R., Krishnaraj, C., Kumar, V. A., Harper, S. L., Kalaichelvan, T. P., & Yun, (2018). In vivo toxicity evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles and gold nanoparticles on adult zebrafish: a comparative study. *3 Biotech* 8(10), 1-12.

- [18] Solanki, L. A., Sundari, K. S., & Rajeshkumar, S. (2021). In-vitro Cytotoxicity Evaluation of Green Synthesized Gold Nanoparticles and Its Indigenous Mouthwash. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(2), 735-743.
- [19] Alvarez-Cirerol, F. J., López-Torres, M. A., Rodríguez-León, E., Rodríguez-Beas, C., Martínez-Higuera, A., Lara, H. H., ... & Iñiguez-Palomares, R. A. (2019). Silver nanoparticles synthesized with *Rumex hymenosepalus*: A strategy to combat early mortality syndrome (EMS) in a cultivated white shrimp. *Journal of Nanomaterials*, 2019.
- [20] Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., & Farah, I. O. (2013). Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environmental monitoring and assessment*, 185(4), 3339-3348.

## Capítulo 6

### Conclusiones

El extracto de corteza de mangle rojo (MR) obtenido mediante maceración en etanol/agua (70/30 v/v) presenta una capacidad antioxidante relevante que permite emplear al extracto como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de plata y oro en el contexto de la síntesis “verde” de nanomateriales mediante un método sencillo y rápido que origina partículas estabilizadas por los mismos compuestos del extracto. El estudio de la cinética de formación indica que las nanopartículas de oro se forman en aproximadamente 1/3 del tiempo que se emplea en la síntesis de nanopartículas de plata y la cinética es bien descrita para estas últimas por el modelo de dos pasos o Redox-Cristalización. Las nanopartículas de plata presentan tamaños comprendidos entre 5-100 nm con la mayoría de la población por debajo de 20 nm mientras que la población de tamaños de las nanopartículas de oro está en 20-50 nm. Ambos materiales presentan en su escala nanométrica estructura cristalina fcc determinada por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y difracción de electrones de área selecta. La espectroscopía UV-vis, la microscopía electrónica y el análisis termogravimétrico indican que los productos obtenidos después del proceso de limpieza son materiales compuestos orgánico-metálicos donde las nanopartículas están embebidas en una matriz orgánica proveniente del extracto. La evaluación de la toxicidad de los nanomateriales de plata y oro producidos con extracto de MR en el modelo de *Artemia franciscana* indica que las partículas AgMR presentan toxicidad elevada (50-40 % supervivencia) a las 24 h a la concentración más baja del estudio (25 µg/mL) y el efecto tóxico se observa desde las primeras etapas del ensayo ( $t \leq 6 h$ ). Contrariamente las nanopartículas de oro no presentaron efectos tóxicos ni en la concentración más elevada (200 µg/mL) a lo largo del estudio de 24 h. Lo anterior plantea la necesidad de presentar especial atención y cuidado al destino final de los nanomateriales de plata pues impacta de forma relevante en el ecosistema marino de acuerdo con los resultados recabados en el presente trabajo.