

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y
Materiales

Tesis de Doctorado:

**Síntesis Verde y Química de Nanopartículas Metálicas y sus
Evaluaciones Citotóxicas**

Presentada por:

M en C. Blanca Esthela Rodríguez Vázquez

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencia de Materiales por la Universidad de Sonora.

Hermosillo, Sonora a julio de 2022.

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

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro
Jefe del Departamento

COMITÉ EVALUADOR DE TESIS

Presidente:	Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín
Secretario:	Dra. Ericka Rodríguez León
Sinodal:	Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Sinodal:	Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares
Sinodal:	Dr. César Rodríguez Beas
Sinodal Externo:	Dr. César Márquez Beltrán

DIRECCIÓN DE TESIS

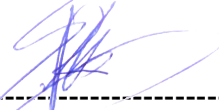
Director de Tesis:	Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín
Co-director de Tesis:	Dra. Ericka Rodríguez León

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de **BLANCA ESTHELA RODRÍGUEZ VÁZQUEZ** han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



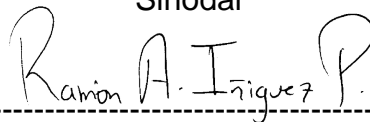
Dra. Rosa Elena Navarro Gaurtrín
Presidente



Dra. Ericka Rodríguez León
Secretario



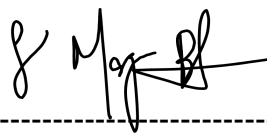
Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Sinodal



Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares
Sinodal



Dr. César Rodríguez Beas
Sinodal



Dr. César Márquez Beltrán
Sinodal Externo

A mis hermanas, mi mamá y Rohan,
gracias infinitas por inspirarme
y apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Ericka Rodríguez León y Dr. Ramón Iñíguez Palomares que han guiado mis pasos académicos y que han contribuido enormemente en mi formación profesional, por su apoyo invaluable en cada paso que doy.

A la Dra. Rosa Elena Navarro, por toda la paciencia y la disposición que mostró al aceptarme como su estudiante.

A cada uno de los miembros de mi comité doctoral que han contribuido a la realización de esta tesis: Dra. Hisila Santacruz Ortega, Dr. César Rodríguez Beas y Dr. César Márquez Beltrán.

A la Dr. Lourdes Bazán, Dr. Rubén Mendoza por su apoyo en la caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido.

A Dra. Yedith Soberanes y Dr. Alex Salazar, por su apoyo en la realización de esta tesis y en los artículos publicados.

A mi familia, que siempre está apoyando mis proyectos, especialmente a los que no están, pero siguen siendo mi inspiración para cada paso que doy.

A Rohan, por ser y estar, por enseñarme y darme tanto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por su apoyo con la beca de doctorado.

CONTENIDO

CONTENIDO	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS	5
ANTECEDENTES	6
1.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	6
1.2 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	7
1.2.1 Síntesis verde	9
1.2.2 Síntesis química	10
1.3 <i>MIMOSA TENUIFLORA</i>	11
1.4 RESVERATROL	12
1.5 APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 “SPECTROSCOPIC ANALYSIS AND NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE FOR SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED WITH TRANS-RESVERATROL AND CIS-RESVERATROL”	15
2.1.1 Materiales	15
2.1.2 Métodos	16
2.1.2.4 Síntesis de nanopartículas de plata	16
2.1.3 Caracterización	17
2.1.3.1 Espectroscopía UV-Vis	17
2.1.3.2 Actividad antioxidante. Método DPPH	17
2.1.3.3 Fenoles totales	18
2.1.3.4 Dispersión dinámica de luz	18
2.1.3.5 Potencial Z	19
2.1.3.6 Espectroscopía infrarroja (FTIR)	20
2.1.3.7 Espectroscopía raman	20
2.1.3.8 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H)	20
2.1.3.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	20
2.1.3.10 Estabilidad y agregación cinética	21
2.2 “SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING <i>MIMOSA TENUIFLORA</i> EXTRACT, ASSESSMENTS OF CYTOTOXICITY, CELLULAR UPTAKE, AND CATALYSIS”	21

2.2.1 Materiales	22
2.2.2 Métodos	23
2.2.2.1 Preparación del extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i>	23
2.2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro	23
2.2.3 Caracterización	24
2.2.3.1 Espectroscopía UV-Vis	24
2.2.3.2 Actividad antioxidante. Método DPPH	24
2.2.3.3 Fenoles totales.....	25
2.2.3.4 Dispersión dinámica de luz	25
2.2.3.5 Potencial Z	25
2.2.3.6 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	25
2.2.3.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	26
2.2.3.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
2.2.3.9 Microscopía confocal	26
2.2.3.10 Difracción de rayos X	27
2.2.3.11 Estabilidad.....	27
2.2.3.12 Citotoxicidad.....	28
2.2.3.13 Análisis estadístico.....	28
2.2.3.14 Internalización celular	29
2.2.3.15 Catálisis	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1 “SPECTROSCOPIC ANALYSIS AND NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE FOR SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED WITH TRANS-RESVERATROL AND CIS-RESVERATROL”	31
3.2 “SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING <i>MIMOSA TENUIFLORA</i> EXTRACT, ASSESSMENTS OF CYTOTOXICITY, CELLULAR UPTAKE, AND CATALYSIS”	45
CONCLUSIONES	71
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS	74
TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS	78
ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de formación de las <i>NPs</i> siguiendo la aproximación top-down o bottom-up. Adaptación de [19].	7
Figura 2: Árbol de tepezcohuite en su hábitat natural [39].	11
Figura 3: Estructuras químicas de los isómeros del resveratrol [51].	13

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Relación reductor:precursor en la síntesis de <i>NPs</i> de plata con resveratrol.	17
Tabla 2: Relación de precursor:reductor en la síntesis de <i>NPs</i> de oro.....	24

RESUMEN

En el desarrollo de esta investigación doctoral se realizó la síntesis de nanopartículas metálicas, de oro y plata, siguiendo dos métodos de síntesis: la síntesis verde, utilizando como agente reductor un extracto de *Mimosa tenuiflora* y la síntesis química donde el agente reductor es la molécula orgánica de resveratrol.

Los productos obtenidos se caracterizaron mediante distintas técnicas: Espectroscopía UV-Vis, infrarroja (FTIR), raman, resonancia magnética nuclear de protón (RMN), se determinó la estabilidad mediante de electroforesis, obteniendo el potencial Z (ζ) y mediante dispersión dinámica de luz (DLS) se obtuvo el radio hidrodinámico de los nanomateriales.

La caracterización microestructural se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de área selecta (SAED) y energía dispersiva de rayos X (EDS). Se hicieron evaluaciones de toxicidad celular en células HUVEC.

Dentro de los resultados obtenidos se pudo comprobar que con ambas rutas de síntesis se obtuvieron nanopartículas metálicas, pudiendo controlar su tamaño, únicamente al variar la relación precursor reductor en la síntesis. Es posible realizar una síntesis química de bajo impacto ecológico, controlando esta relación y utilizando una menor cantidad de solventes.

Se realizó una síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando la *Mimosa tenuiflora* como agente reductor, obteniendo materiales con una baja polidispersidad que son propicios a utilizarse en aplicaciones biológicas. La síntesis es de bajo impacto ecológico y de bajo costo.

ABSTRACT

In this doctoral research, the synthesis of metallic nanoparticles, gold and silver was carried out, following two synthesis methods: the green synthesis, using an extract of *Mimosa tenuiflora* as a reducing agent and the chemical synthesis where the reducing agent is the Resveratrol, a organic molecule.

The products obtained were characterized by different techniques: UV-Vis Spectroscopy, infrared (FTIR), raman, proton nuclear magnetic resonance (NMR). The stability was determined by (ζ) Z potential and the size were obtained by dynamic light scattering (DLS).

The microstructural characterization was performed by transmission electron microscopy (TEM), select area diffraction (SAED) and energy dispersive X-rays (EDS). Cellular citotoxicity assessments were made on HUVEC cells.

Among the results obtained, they highlight that with both synthesis routes, metallic nanoparticles are needed, controlling their size, only making variations in the precursor-reducer ratio of the synthesis. It is possible to carry out a chemical synthesis with a low ecological impact, controlling this relationship and using a smaller amount of solvents.

A green synthesis of gold nanoparticles was carried out using *Mimosa tenuiflora* as a reducing agent, obtaining materials with a low polydispersity that are suitable for use in biological applications. The synthesis is of low ecological impact and low cost.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la nanotecnología es un tema que ha ocupado a la comunidad científica desde algunas décadas atrás. En la década de los setenta Norio Taniguachi lo utilizó para referirse a la ingeniería de materiales nanométricos, que va desde la síntesis, diseño y aplicación de estos [1].

El gran interés en su desarrollo recae en la capacidad que tienen los materiales nanométricos de diferenciarse de los materiales a escala normal. La diferencia, en estas propiedades, se asocia al tamaño, al área superficial y a la posibilidad de funcionalizarlos con otras moléculas o compuestos que los proveen de características únicas.

La posibilidad de llevar estos materiales hasta aplicaciones que resuelvan problemáticas actuales, tales como la contaminación de aguas, el bajo efecto de algunos medicamentos, la mejora de imágenes de diagnóstico es lo que mantiene el interés de la comunidad científica en su diseño y funcionalización. En ese sentido, se buscan rutas de síntesis que den como resultados productos estables.

En particular las nanopartículas (NPs) de metales nobles, como el oro y la plata, son de gran importancia en diferentes áreas de aplicación como catálisis [2], sensores [3], electrónica [4] y medicina [5].

La síntesis de NPs metálicas utilizando extractos de plantas naturales, conocida también como síntesis verde, es un método ecológicamente amigable, que permite la obtención de las NPs en un solo paso, ya que el extracto natural, actúa como agente reductor y al mismo tiempo estabilizante [6].

Por lo que, en este trabajo, se desarrollan, tanto la síntesis verde como la

síntesis química de bajo impacto. Al utilizar estos métodos de síntesis, se obtienen materiales que resultan con un atractivo mayor para las aplicaciones biológicas, lo que permite recubrir las nanopartículas con estos materiales y proveerlas de características adicionales, que resultan más atractivas.

Derivado del trabajo de investigación durante el doctorado se publicaron dos artículos, por lo que según los lineamientos establecidos en el programa se accede a una opción de titulación distinta, donde la tesis desarrollada es modificada con una versión donde se agregan los artículos publicados. Ese es el formato que sigue el presente documento de tesis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sintetizar y caracterizar NPs metálicas de oro y plata con síntesis verde y síntesis química, así como evaluar su citotoxicidad.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de la corteza de *Mimosa tenuiflora*.
- Caracterizar el extracto de la corteza de *Mimosa tenuiflora*.
- Realizar la síntesis verde de NPs de oro utilizando el extracto de de *Mimosa tenuiflora*.
- Caracterizar NPs de oro.
- Caracterizar la molécula de resveratrol.
- Sintetizar NPs de plata utilizando la molécula de resveratrol.
- Caracterizar NPs de plata.
- Determinar citotoxicidad de los nanomateriales obtenidos.

JUSTIFICACIÓN

Las NPs metálicas, de oro y plata, tienen un gran potencial de uso en distintas aplicaciones médicas, especialmente cuando se funcionalizan con fármacos o se utilizan para el mejoramiento de imágenes de diagnóstico. Especialmente las NPs de plata se han reportado como antibacterianas. Considerando, las posibles aplicaciones biomédicas que se les da, es de gran importancia realizar una síntesis con la menor cantidad de productos químicos que representan un problema para la salud, como los estabilizadores típicamente utilizados, o bien realizar síntesis químicas con una menor cantidad de productos tóxicos.

Los agentes reductores en la realización de la síntesis de las nanopartículas son: el extracto de *Mimosa tenuiflora* es un compuesto que ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional de distintos países como tratamiento a algunos tipos de lesiones como quemaduras, ya que ayuda a la cicatrización y se le asocian propiedades antibacteriales y el resveratrol es una molécula de alto interés biológico por su alta capacidad antioxidante, es antibacterial, cardioprotector, entre otras.

En este trabajo se estudiaron dos rutas de síntesis de NPs metálicas y se caracterizaron los productos obtenidos por distintas técnicas. También se llevaron a cabo pruebas de citotoxicidad e internalización celular.

HIPÓTESIS

La síntesis verde de NPs metálicas permite un proceso más limpio, sin el uso de agentes estabilizadores o reductores tóxicos. El control de tamaño de las NPs puede darse a través de variaciones en la relación precursor:reductor.

La síntesis química de NPs puede ser mejorada, reduciendo la cantidad de solventes utilizados y agentes estabilizadores externos, haciendo uso de moléculas con alta capacidad antioxidante.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Nanopartículas Metálicas

Hoy en día, es bastante común escuchar sobre avances en el campo de los nanomateriales. La novedad de estos materiales es que, a escala nanométrica, es decir, 10^{-9} m, presentan propiedades distintas a las conocidas en bulto. Aunque existen diversas definiciones para el término nanotecnología, la más ampliamente aceptada, sitúa el tamaño de los nanomateriales entre 1 – 100 nm [7].

En ese sentido, las NPs son materiales que tienen un tamaño situado en ese rango. Los principales metales utilizados para su fabricación son: oro [8-9], plata [10], paladio [11], cobre [12], hierro [13], entre otros.

Actualmente, las NPs metálicas son ampliamente utilizadas en distintas áreas como biomedicina [14], ingeniería [15] y electrónica [16]. La principal ventaja de estos materiales es que pueden sintetizarse y modificarse con varios grupos funcionales químicos que les permiten adquirir propiedades adicionales [17] y por tanto conjugarse con anticuerpos, ligandos y fármacos de interés y, por lo tanto, abren una amplia gama de aplicaciones potenciales en biotecnología, separación magnética y preconcentración de analitos objetivo, dirigidos administración de fármacos y vehículos para la administración de genes y fármacos, así como poder ser utilizados en imágenes de diagnóstico.

En ese sentido, es importante utilizar métodos de síntesis de NPs metálicas que permitan, en el mismo proceso de síntesis, la funcionalización de las NPs.

1.2 Métodos De Síntesis De Nanopartículas

La síntesis de NPs metálicas se realiza básicamente por dos aproximaciones *top-down* y *bottom-up*, las generalidades de ambas aproximaciones pueden observarse en la Figura 1 [18-19], mientras que el primero busca la obtención de NPs a partir de la división de un compuesto madre, por métodos físicos como la molienda, el segundo lo hace mediante el crecimiento de las NPs a través de un átomo.

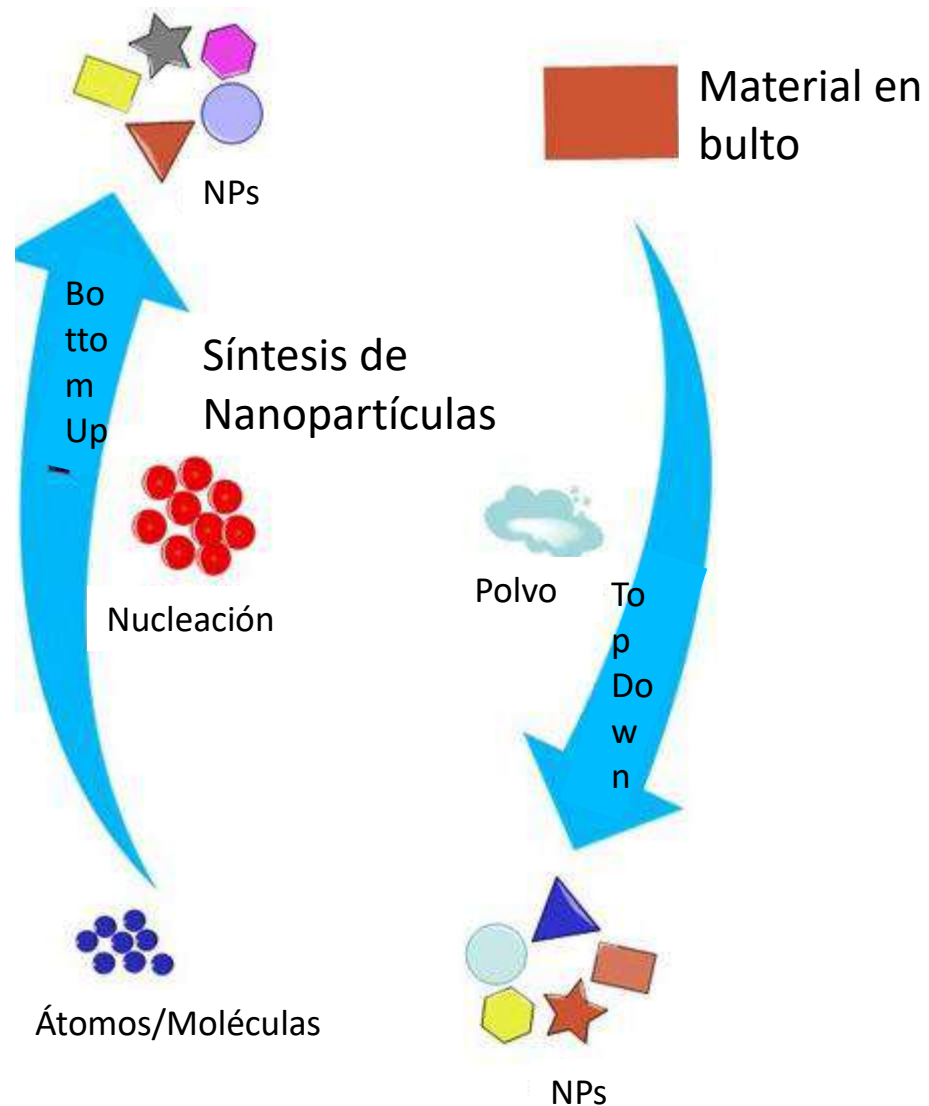


Figura 1: Esquema de formación de las NPs siguiendo la aproximación top-

down o bottom-up. Adaptación de [19].

Es este último método el más utilizado para la producción de NPs, siendo la síntesis química la más popular, en donde se involucran productos que funcionan como agentes reductores y que generalmente resultan nocivos o no deseados en el producto final [20], pero que permiten un mejor control de parámetros determinados como el tamaño, la funcionalización, la carga superficial, entre otros.

Dentro de los métodos físicos para la formación de NPs, correspondiente a la aproximación *top-down*, podemos encontrar diversas técnicas como son: ablación por láser pulsado, plasma, irradiación por microondas, deposición química de vapor, fluidos supercríticos, entre otras, mientras que para la síntesis química, correspondiente a la aproximación *bottom-up* podemos encontrar diversas vertientes como: reducción química de sales metálicas, síntesis electroquímica, descomposición térmica de sales metálicas y formación de micro emulsiones [21]. La importancia de las NPs recae en el poder de funcionalización que tienen, se pueden utilizar para múltiples aplicaciones que van desde fotónica, electrónica, magnetismo, ensayo químico y biológico, su aplicación en medicina y catálisis por mencionar algunos de ellos [6].

Las principales propiedades de las NPs metálicas se asocian al metal, su forma, el tamaño y funcionalización, por lo que es de gran importancia el control de su forma y tamaño, control que provee la síntesis química. Sin embargo y a pesar de los procesos de limpieza por el que pasan antes de llegar al producto final, las NPs tienen residuos de los agentes reductores que se utilizaron en su formación, que no son deseables en algunas de las aplicaciones antes mencionadas, sobre todo si nos referimos a las aplicaciones en áreas médicas; es por ello, que se buscan alternativas a este método, que ofrezcan al mismo tiempo, control de morfología, tamaño y NPs biocompatibles.

Debido a esta preocupación de la comunidad científica y en la búsqueda por

encontrar productos biológicamente compatibles, surgen modificaciones a la síntesis química convencional, que si bien, funciona exactamente igual que el proceso de reducción química común, este se realiza a través del uso de agentes reductores no nocivos, de menor costo y fácil obtención, utilizando principalmente moléculas bioactivas con alta capacidad reductora o extractos de plantas. [22].

1.2.1 Síntesis verde

La síntesis verde, es una corriente de la química verde, que promueve la utilización de agentes reductores no tóxicos en la producción de nanomateriales [23]. Es un enfoque, de abajo hacia arriba, similar a la síntesis por reducción química, con la diferencia de que el agente químico reductor es reemplazado por extractos de plantas naturales [24], enzimas [25] o polisacáridos [26], que tienen propiedades inherentes de estabilización. Además, las NPs quedan recubiertas por el material. La relación entre los precursores metálicos y las entidades biológicas en diferentes concentraciones influye en el tamaño y la forma de las NPs.

Una de las principales razones por las que se prefiere la síntesis verde en la producción de NPs metálicas es que es un método más económico y limpio [27]. Los métodos químicos convencionales generalmente están compuestos por más de una especie o molécula química que podría aumentar la reactividad y toxicidad de las partículas y podría dañar la salud humana [28].

Algunos de los inconvenientes que se presentan en este método es la gran diversidad de aproximaciones, es decir, antes de encontrar la síntesis adecuada, hay que probar con distintas proporciones y no siempre un material, por ejemplo, un extracto de una planta se comporta igual a otro, a pesar de que sean de la misma especie. Los extractos, varían de acuerdo con el tiempo de extracción, la zona de la planta que se utilizó, si es fresca o se sometió a un proceso de secado, incluso varían de acuerdo con la zona geográfica de donde se recolecto.

Las principales ventajas que presenta este método de síntesis son el uso de

productos naturales, baja nocividad y ecológicamente amigables por el bajo uso de solventes y productos químicos. El factor común en los artículos publicados donde se utilizan extractos de plantas como: *Camellia sinensis* [29], *Curcuma longa* [30], *Aloe vera* [31] o *Rumex hymenosepalus* [32] es la presencia de moléculas antioxidantes, que funcionan como el agente reductor en la síntesis de las NPs metálicas. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta este método es que no solamente se utiliza la molécula que está funcionando como reductor, si no una mezcla de productos que si bien, son naturales, presentan la dificultad de tener un exceso de material orgánico en las NPs.

1.2.2 Síntesis química

Las NPs pueden sintetizarse siguiendo distintos métodos fisicoquímicos [33]. Sin embargo, estos métodos generalmente requieren mucho capital debido al alto costo de los reactivos y presentan algunos inconvenientes, incluidos el uso de solventes tóxicos y la generación de subproductos peligrosos superficie [28].

En general la síntesis de NPs por reducción química consiste en dos pasos [34]:

1. El uso de agentes reductores como borohidruros, cítricos y ácidos oxálicos, polioles, peróxido de hidrógeno, sulfitos, entre muchos otros. Su función es proporcionar electrones para reducir los iones del metal, llevándolo así a su estado de oxidación 0.
2. Se utilizan agentes estabilizadores como ligandos de azufre, ligandos de fósforo, polímeros, tensioactivos (en particular bromuro de cetiltrimetil amonio, CTAB) y otros [35]. Estabilizan NPs contra la agregación imputando una fuerza repulsiva que controla crecimiento de las NPs en términos de velocidad, tamaño final o forma geométrica. Es posible que el agente estabilizador sea la misma molécula que actúa como agente reductor [36].

La síntesis de nanomateriales es altamente sensible a cualquier variación en el proceso, lo que influye en factores como la agregación, el pH de la solución puede

cambiar el diámetro promedio y por tanto la distribución de tamaño. Otra cuestión importante es que el tamaño y la forma pueden influir en su función. Se ha reportado que el tamaño y la carga superficial de las NPs de oro determina la absorción a través barreras intestinales y acumulación en órganos diana secundarios después de la administración oral [37].

Es por ello, sobre todo para aplicaciones biológicas, que se prefieren utilizar métodos de síntesis que estén libres de agentes tóxicos.

1.3 *Mimosa tenuiflora*

La *Mimosa tenuiflora*, conocida también como tepezcohuite o jurema prieta, forma parte de la familia los *Fabaceae* [38], es un árbol espinoso grande nativo de Brasil, pero que crece en algunos países de Latinoamérica como México, donde crece en los estados de Oaxaca y Chiapas, principalmente. La Figura 2 es una imagen de este árbol en su estado natural.



Figura 2: Árbol de tepezcohuite en su hábitat natural [39].

Se utiliza tradicionalmente, pulverizando la corteza y colocando este polvo sobre heridas superficiales de la piel, ya que se le han asociado históricamente, propiedades cicatrizantes [40]. En Brasil, es común utilizarla para preparar una

bebida psicoactiva y embriagante, que forma parte de una ceremonia tradicional de los nativos, conocida como Yurema [41].

En la medicina tradicional se emplea como antiinflamatorio, antioxidante, cicatrizante y agente antimicrobiano [42]. También presenta propiedades alucinógenas debido a la presencia del alcaloide N,N-dimetiltriptamina (DMT) [43], el cual es una sustancia tóxica.

Recientemente, se ha probado su capacidad como antinociceptivo¹ orofacial, asociando su eficacia con la presencia de compuestos antioxidantes. Estos compuestos pueden eliminar los radicales libres que se producen en los procesos nociceptivos y que son los encargados de modular el dolor [44].

1.4 Resveratrol

El 3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno, popularmente conocido como resveratrol es un estilbeno, un tipo de fenol, que se encuentra de manera natural en diversas plantas y en algunos frutos como: arándanos, frambuesas, moras y la piel de las uvas. En general, las plantas lo producen como respuesta al estrés del ambiente o ante la presencia de plagas [45].

Algunas propiedades asociadas al resveratrol son: cardioprotector [46], antiinflamatorio [47], anticancerígeno [48], anticoagulante [49], antialérgico [50], entre otras.

Está formado por la unión de dos anillos fenólicos a través de un doble enlace estireno que da lugar a las formas isoméricas cis y trans del resveratrol, como se muestra en la Figura 3. El isómero trans es la forma más estable desde el punto de vista estérico [51].

¹ Se refiere a la acción o proceso de bloquear la detección de un estímulo doloroso o dañino por las neuronas.

Algunas de las características fisicoquímicas del resveratrol son:

- Insoluble en agua.
- Fotosensible.
- Temperatura de almacenaje: - 20 °C.
- Peso molecular: 228.24 g/mol
- Se encuentra en estado sólido.

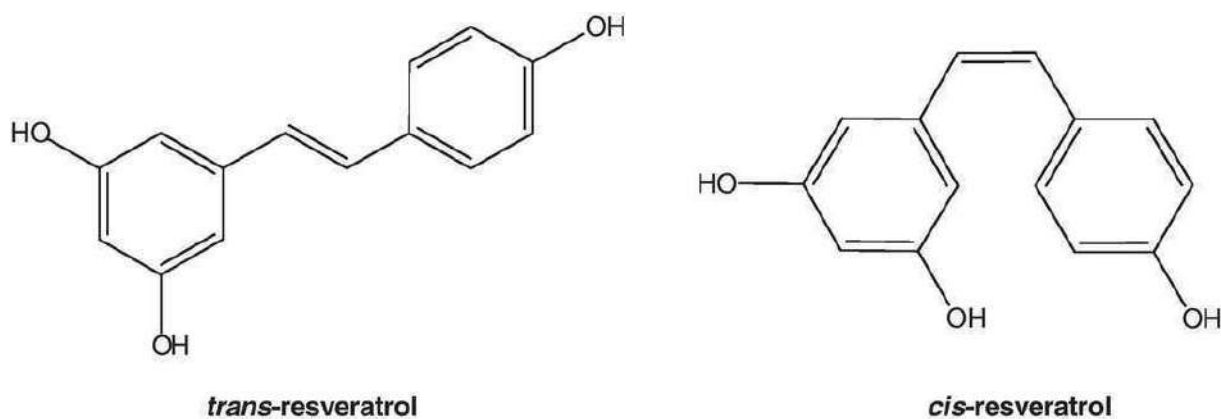


Figura 3: Estructuras químicas de los isómeros del resveratrol [51].

1.5 Aplicaciones de las nanopartículas metálicas

Algunos investigadores predijeron que las NPs en un rango de tamaños de entre 1-10 nm, las NPs presentarían propiedades, que no son las que presenta el material en bulto ni el de las moléculas individuales [52], teniendo una fuerte dependencia en el tamaño de las NPs, su forma, la distancia entre ellas y la capa orgánica que las cubre, lo que va a repercutir directamente en las posibles aplicaciones de estas.

Las NPs tienen un gran número de aplicaciones en áreas como electrónica, medicina, química, catálisis, óptica entre otras. Sus aplicaciones son tan variadas debido a las propiedades del material utilizado (oro, plata, zinc, titanio, carbono, polímeros) que a su vez se potencializan por sus tamaños nanométricos. Para la utilización como transportadores de fármacos, se buscan principalmente,

NPs que presenten propiedades magnéticas para casos en los que se pretende controlar a largo alcance, con tamaños que puedan introducirse en las estructuras celulares de interés y manipularse fácilmente, asegurando la entrega del fármaco en la zona afectada [53].

También se han utilizado NPs de diversos materiales como agentes catalizadores tales como el cobre, las aplicaciones de este tipo de partículas en nano catálisis son ciclo adición ácido-alcalina, reacciones de Ullman, electrocatálisis, fotocatálisis entre otras [54].

En particular las NPs de oro se han utilizado en procesos de reconocimiento molecular, sensores y catálisis, entre otros [55]. La síntesis de NPs de oro, desde una aproximación supramolecular, es decir, con enlaces no covalentes, ha resultado una buena estrategia en la producción de ellas, ya que las NPs generadas son mayormente estables, se han reportado síntesis que utilizan puentes de hidrógeno, enlaces π - π o interacciones de van der Waals [56].

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 “Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol”

En este capítulo se detallan los materiales y métodos utilizados en el desarrollo del trabajo de investigación que dio origen al artículo titulado “Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol” donde se realiza la síntesis química de NPs de plata (AgResvNPs), utilizando como agente reductor la molécula del resveratrol, dicha síntesis es de gran importancia debido a las posibles aplicaciones como nanoportadores de resveratrol.

2.1.1 Materiales

Los materiales que se utilizaron en la síntesis de las NPs metálicas de oro se enlistan a continuación. Todos fueron adquiridos comercialmente a menos que se indique lo contrario.

- Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$, 99% de pureza, de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Nitrato de Plata ($AgNO_3$, 99% de pureza, de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Etanol (C_2H_6O , 99% de pureza, Fermot).
- Agua ultrapura (Resistividad de 18.2 M Ω).
- DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, 99% de pureza, de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Óxido de deuterio (D_2O , 99.9%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

- DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco).

2.1.2 Métodos

En esta sección se describen a detalle los métodos utilizados en la preparación de los materiales estudiados.

2.1.2.4 Síntesis de nanopartículas de plata

Se prepararon soluciones a 0.01 M de AgNO_3 , bajo agitación y en ausencia de luz durante 1 h., a 0.01 M de resveratrol en una mezcla de solventes EtOH:H₂O, 70:30, v/v.

Se mezclaron los reactivos de los puntos anteriores, siguiendo las proporciones descritas en la Tabla 1. Todos los reactivos se coloraron siguiendo el orden: precursor metálico, reductor, mezcla de solventes.

La mezcla de reactivos se colocó durante 24 h bajo la exposición de una lámpara UV de 20 W de potencia con una longitud de onda de 380 nm en oscuridad y a temperatura ambiente, permitiendo que la síntesis se llevara a cabo. Posteriormente, se retiró de la exposición de la lámpara y se colocó a exposición de luz solar durante 4 h.

Se obtuvieron las NPs, que se sometieron a un proceso de limpieza mediante centrifugación a 13,0000 rpm durante 1 h. Las NPs se resuspendieron en 70:30 EtOH:H₂O, v/v.

Tabla 1: Relación reductor:precursor en la síntesis de NPs de plata con resveratrol.

Muestra	AgNO ₃ (0.001 M) μL	Resveratrol (0.01 M) μL	Mezcla de solventes mL
AgResv1NPs	150	150	2.7
AgResv2NPs	150	300	2.55
AgResv3NPs	1500	1500	----
AgResv4NPs	1000	2000	----
AgResv5NPs	500	150	2.35

2.1.3 Caracterización

2.1.3.1 Espectroscopía UV-Vis

La caracterización se realizó en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 45, utilizando celdas de cuarzo, en un rango de 200 a 900 nm, a temperatura ambiente con una velocidad de barrido de 480 nm/min.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones 1:10 en la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v.

2.1.3.2 Actividad antioxidante. Método DPPH

La actividad antioxidante se determinó siguiendo el ensayo de DPPH, el fundamento de dicho ensayo consiste en que el radical DPPH tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia un amarillo debido a la reacción que se da con la presencia de una sustancia antioxidante. Se sigue la absorbancia del radical libre DPPH, alrededor de 520 nm [57]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las concentraciones de NPs utilizadas fueron 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 μg/mL. Se agregaron 100 μL de cada concentración a 100 μL de una solución a 300 μM de DPPH y se dejaron incubando durante 1 h en ausencia de luz, para posteriormente medir la absorbancia a 520 nm en una lectora de placas Multiskan

FC, Thermo Scientific. Los resultados se compararon con Trolox (70 $\mu\text{M/L}$). La actividad antioxidante se determinó con la Ecuación 1:

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

2.1.3.3 Fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se determinó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu [58], comparados con equivalentes de ácido gálico. El método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul cuyo máximo de emisión se ubica en 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles [59]. Las mediciones se realizaron en una lectora de placas Multiskan FC, Thermo Scientific, siguiendo la absorbancia en 749 nm.

Se colocaron 10 μL de las muestras en cada pozo de la placa, en la mezcla de reactivos para el ensayo de fenoles totales. Se realizó el ensayo por triplicado.

2.1.3.4 Dispersión dinámica de luz

Se determinó el diámetro hidrodinámico (d_H) de las muestras utilizando el equipo Zetasizer Nano de Malvern, siguiendo la ecuación de Stokes-Einsten, Ecuación 2. La viscosidad del solvente depende de la mezcla EtOH:H₂O.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

Donde k es la constante de Boltzman, T temperatura, η es la viscosidad, y D , el coeficiente de difusión.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones 1:10 en la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente por triplicado.

2.1.3.5 Potencial Z

El potencial z (ζ) se determinó a partir de la movilidad electroforética de las muestras utilizando el equipo Zetasizer Nano de Malvern. La movilidad electroforética se determinó siguiendo la Ecuación 3.

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (3)$$

Donde μ_e es la movilidad electroforética, E el campo eléctrico y v la velocidad de la nanopartícula en el campo eléctrico. Para obtener el potencial ζ se utilizó el modelo de Smoluschowski, que depende de la conductividad y polaridad del solvente. Como se muestra en la Ecuación 4.

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \mu_e \quad (4)$$

Donde ε es la constante dieléctrica definida como la relación entre la permitividad del solvente y la permitividad del medio. Debido a que el solvente es una mezcla de solventes, se utilizaron los valores de $\varepsilon = 40.52$ [60] y $\eta = 2.2249 \times 10^{-3}$ Pa s a 25 °C.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones 1:10 en la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente por triplicado.

2.1.3.6 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo Perkin Elmer de transformada de Fourier, usando la técnica de ATR con 16 scans. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, haciendo un barrido de 4000 a 800 cm^{-1} en modo transmitancia.

El resveratrol se utilizó en polvo, mientras que las NPs se secaron en horno a 40 °C durante 24 h.

2.1.3.7 Espectroscopía raman

Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro iHR320 Horiba Jobin Yvon, excitando con un láser de 785 nm con una potencia de 100 mW, con un tiempo de exposición de 100 s y un objetivo de 10x.

Se colocaron 30 μL de cada muestra en un portaobjetos de vidrio y se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente.

2.1.3.8 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H)

Se utilizó un equipo Avance III de Bruker con una frecuencia de 400 MHz. Para llevar a cabo las mediciones se colocaron 500 μL de la muestra en un tubo de resonancia. Las muestras se prepararon en una mezcla de solventes deuterados 70:30 EtOH- d_6 : D_2O , v/v.

2.1.3.9 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización por TEM se realizó en un Microscopio de Transmisión Jeol-ARM 200F, se obtuvieron micrografías, energía dispersiva de rayos X (EDS) y difracción de electrones de área selecta (SAED).

30 μL de la muestra se colocaron en una rejilla comercial de oro con soporte de carbón. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h.

2.1.3.10 Estabilidad y agregación cinética

Las pruebas de estabilidad y agregación se realizaron monitoreando el potencial ζ y el cambio en el tamaño en función del tiempo.

Las muestras sintetizadas en viales de vidrio fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 1 h en tubos Eppendorf de 2 mL. El sobrenadante se retiró para su posterior análisis. El sedimento de cada tubo se resuspendió mediante sonicación (15 min) en 0,5 ml de agua ultrapura. De las muestras, AgResv1NPs y AgResv3NPs se obtuvieron alrededor de 2 mL en cada caso. Las muestras se dejaron reposar toda la noche para los ensayos de estabilidad. Para la estimación del diámetro hidrodinámico por DLS, se diluyó el stock original de AgResvNPs en agua ultrapura en proporción 1:10, y se empleó un mL de esta dilución en las mediciones. De estas mismas muestras, se midió el potencial ζ en condiciones ordinarias. La estabilidad se verificó a las 0, 24 y 48 h.

Se analizó la estabilidad de AgResv1NPs y AgResv3NPs con DMEM suplementado (10% suero fetal bovino SFB): en un tubo Eppendorf de 2 mL se agregaron 600 μ L de NPs y 200 μ L de DMEM suplementado. Para el potencial ζ , se usaron 50 μ L de muestra colocada en el fondo de la celda U con puntas de pipeta Gel-Well. El resto del solvente puesto por ambas aberturas de la celda es agua ultrapura (400 μ L de cada lado). Para la medida del tamaño se tomaron 100 μ L de la muestra preparada y se dispersaron en 900 μ L de agua ultrapura.

2.2 “Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Mimosa tenuiflora* Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis”

En este capítulo se detallan los materiales y métodos utilizados en el desarrollo del trabajo de investigación que se reportó en el artículo del mismo nombre, donde se desarrolla la síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNPs) con extractos de plantas, dicha síntesis ha ganado gran interés en el campo de la biomedicina debido a la gran variedad de aplicaciones para la salud. En el presente

trabajo se sintetizaron AuNPs con *Mimosa tenuiflora* (Mt) extracto de corteza a diferentes concentraciones de precursores metálicos. El extracto de Mt se obtuvo mezclando la corteza del árbol en etanol-agua.

2.2.1 Materiales

Los materiales que se utilizaron en la síntesis de las NPs metálicas de oro se enlistan a continuación, todos fueron adquiridos comercialmente a menos que se indique lo contrario.

- Corteza de *Mimosa tenuiflora*.
- Ácido cloroaúrico (HAuCl_4 , 99% de pureza, de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 99% de pureza, Fermot).
- Agua ultrapura (Resistividad de 18.2 M Ω).
- Vitamina C (Ácido ascórbico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).
- DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, 99% de pureza, de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).
- Catequinas (Sigma Aldrich).
- DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco).
- Folin Cicolcaut (Sigma Aldrich).
- Carbonato de Sodio (Sigma Aldrich).
- Células sanas del cordón umbilical (HUVEC).
- MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$, Sigma Aldrich).
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$).
- FITC (Isotiocianato de fluoresceína).
- Anti B actina.
- Azul de Metileno (Cloruro de metiltionina, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$, Sigma Aldrich).

2.2.2 Métodos

En esta sección se describen a detalle los métodos utilizados en la preparación de los materiales estudiados.

2.2.2.1 Preparación del extracto de *Mimosa tenuiflora*

Primeramente se pesaron 15 g de la corteza comercial seca de *Mimosa tenuiflora* y se preparó la mezcla de solventes EtOH:H₂O, 70:30, v/v.

Posteriormente se colocaron los 15 g de *Mimosa tenuiflora* en 100 mL de la mezcla de solventes. Se dejó en extracción durante 15 días y en ausencia de luz.

Finalmente, la solución resultante se filtró utilizando filtros Whatman de 8 µm en primera instancia y posteriormente utilizando un acrodisco de 0.20 µm.

2.2.2.2 Síntesis de nanopartículas de oro

Se preparó una solución a 0.01 M de ácido tetracloroaurico (HAuCl₄), en ausencia de luz. El extracto se utilizó como reductor. En la Tabla 2 se muestran las proporciones utilizadas en cada síntesis.

En un tubo de 50 mL se agrega el extracto, seguido de agua ultrapura y finalmente el precursor metálico, posteriormente se agita utilizando un vortex a 3000 rpm durante 10 s. La síntesis se llevó a cabo bajo iluminación de laboratorio a 25 °C.

Se obtuvieron las NPs y se limpiaron mediante centrifugación a 14,000 rpm durante 1 h. El sobrenadante se descartó y se añadió agua ultrapura. Se redispersó mediante sonicación durante 5 min. El proceso de limpieza se repitió dos veces. Finalmente, el precipitado se deja secar en horno a 40 °C.

Tabla 2: Relación de precursor:reductor en la síntesis de NPs de oro.

Muestra	HAuCl₄ 0.01M V (mL) pH=2.02	Extracto 121.8 mg/mL Vol (mL) pH=5.10	Agua Ultrapura Vol (mL) pH=6.47
AuMt1	3,2	1,6	1,20
AuMt2	1,6	1,6	2,8

2.2.3 Caracterización

2.2.3.1 Espectroscopía UV-Vis

La caracterización se realizó en un espectrofotómetro de haz doble Perkin Elmer Lambda 45, utilizando celdas de cuarzo, a temperatura ambiente en un rango de 200 a 400 nm en el caso del extracto y en un rango de 250 a 875 nm en el caso de las NPs de oro, con una velocidad de barrido de 240 nm/min.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones 1:10 en la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v.

2.2.3.2 Actividad antioxidante. Método DPPH

La actividad antioxidante se determinó siguiendo el ensayo de DPPH, donde se sigue la absorbancia del radical libre DPPH. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para este ensayo, el extracto fue liofilizado para posteriormente solubilizar y determinar las concentraciones. Se utilizaron las concentraciones de 25, 12.5, 6.25 y 3.125 µg/mL. Se agregaron 100 µL de cada concentración a 100 µL de una solución a 300 µM de DPPH y se dejaron incubando durante 1 h en ausencia de luz para posteriormente medir la absorbancia a 517 nm. Los resultados se compararon con Vitamina C y Catequina (70 µM/L).

2.2.3.3 Fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se determinó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu [58], comparados con equivalentes de ácido gálico. Se utilizaron las concentraciones 25, 12.5, 6.25 y 3.125 $\mu\text{g/mL}$.

Se colocaron 10 μL de las muestras y se realizó el ensayo por triplicado, monitoreando los cambios en la absorbancia a 750 nm.

2.2.3.4 Dispersión dinámica de luz

Se determinó el diámetro hidrodinámico de las muestras utilizando el equipo Zetasizer Nano de Malvern y siguiendo la ecuación de Stokes-Einsten, (Eq. 2).

Se realizaron diluciones 1:10 entre las muestras y la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente por triplicado.

2.2.3.5 Potencial Z

Se determinó el potencial z (ζ) a partir de la movilidad electroforética de las muestras utilizando el equipo Zetasizer Nano de Malvern. La movilidad electroforética se determinó siguiendo la ecuación 3.

De cada una de las muestras se prepararon diluciones 1:10 en la mezcla de solventes 70:30 EtOH:H₂O, v/v. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente por triplicado.

2.2.3.6 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo Perkin Elmer de transformada de Fourier, usando la técnica de ATR con 16 scans. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, haciendo un barrido de 4500 a 500 cm^{-1} en modo

transmitancia, con una resolución de 2 cm^{-1} .

Se utilizó el extracto liofilizado y las NPs de oro se secaron en horno a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, de donde se obtuvo un polvo que fue caracterizado.

2.2.3.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La caracterización se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo PHI 5100, con una resolución basada en el ancho medio de banda del pico $\text{Ag}3d_{5/2}$ a 0.80 eV , con una fuente de rayos X dual estándar (Mg/Al) que opera a 15 kV , 300 W y 20 mA . El escaneo se realizó a una velocidad de 0.5 eV/s y para los análisis de mayor resolución se disminuyó la velocidad a 0.025 eV/s .

Se depositaron cinco gotas de cada muestra en un cuarto de cubreobjeto cada cierto tiempo. Se depositaba hasta cubrir el área totalmente (cinco gotas) y se dejaba secar durante 4 h. Se repitió 3 veces.

2.2.3.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización por TEM se realizó en un Microscopio de Transmisión de emisión de campo Jeol 2010 F, operado a 200 keV . Se obtuvieron micrografías en baja magnificación, micrografías de alta resolución y energía dispersiva de rayos X (EDS). El detector de EDS es un equipo Bruker Quantax 200, acoplado al microscopio.

$10 \text{ }\mu\text{L}$ de la muestra se colocaron en una rejilla comercial de cobre con soporte de carbón. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se introdujo en una cámara de vacío durante 12 h.

2.2.3.9 Microscopía confocal

El análisis por microscopia confocal se realizó utilizando un equipo LSM 800 de Carls Zeiss. Se utilizaron tres láseres de 405 , 488 y 640 nm con un poder de 5,

10 y 5 mW respectivamente. La fluorescencia se colectó usando detectores de GaAsP de alta sensibilidad. Las imágenes de campo claro se obtuvieron mediante una colección de luz láser transmitida en un tubo fotomultiplicador (PMT).

La fluorescencia de las NPs en el ensayo vivo/muerto y la distribución de NPs en el estudio de células HUVEC, se utilizó un objetivo seco Plan-Apochromatic $\times 40/0,95$. Para las celdas de reconstrucción 3D con AuMt, se utilizó un objetivo de aceite Plan-Apochromatic $\times 63/1.40$.

La caracterización de la fluorescencia de NPs de oro se obtuvo, se depositando una gota de 20 μL de dispersión coloidal de NPs en un cubreobjetos y se secó a temperatura ambiente antes de un análisis por microscopia confocal. Se empleó un láser de 640 nm como fuente de excitación al 0,5 % de potencia y la fluorescencia se recogió entre 650 y 670 nm. Las imágenes AuMt de campo brillante se formaron utilizando un láser de 488 nm (0,2% de potencia) en modo de luz transmitida. La fluorescencia y el campo brillante se recogieron en canales separados.

2.2.3.10 Difracción de rayos X

Los datos se recopilaron utilizando un difractómetro Bruker D8 QUEST, equipado con un monocromador de espejo multicapa y un tubo sellado CuK α Microfocus ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$). Los difractogramas se recopilaron a $T = 300 \text{ K}$.

2.2.3.11 Estabilidad

La estabilidad de las NPs se evaluó en s-DMEM mediante DLS y potencial ζ . El diámetro hidrodinámico se midió a 37 °C en agua ultrapura y s-DMEM en concentraciones entre 25 y 200 $\mu\text{g/mL}$

Las NPs se agregaron a un tubo Eppendorf con s-DMEM previamente termalizado y se agitó en el vórtex a 3000 rpm durante 30 s. Se mantuvo la

incubación a 37 °C durante 15 min antes de realizar las mediciones a la misma temperatura.

2.2.3.12 Citotoxicidad

El efecto citotóxico de las NPs se evaluó en células HUVEC utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GibcoBRL) a 37 °C y 5% de CO₂. Las células HUVEC se contaron en una cámara de Neubauer y la viabilidad se determinó mediante la prueba de exclusión con azul de tripano (Sigma-Aldrich).

Para el ensayo de MTT, las células se ajustaron a 100 000 células/mL y se colocaron 100 µL por pozo en placas de 96 pozos. Las NPs de oro se evaluaron en concentraciones de 200, 100, 50 y 25 µg/mL. Las células tratadas se incubaron durante 24 y 48 h a 37 °C, 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, la placa se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió solución de MTT y se incubó durante 4 h. Se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de MTT. La absorbancia se midió a 570 nm en un lector de placas multimodo (Synergy HTX, BioTek), utilizando el software Gen5. La viabilidad celular se calculó utilizando la ecuación siguiente:

$$Viabilidad\ Celular = 100 \left(\frac{A_{muestra}}{A_{control}} \right) \quad (5)$$

Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra y $A_{control}$ es la absorbancia del blanco.

2.2.3.13 Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias ± desviaciones estándar (DE).

Las diferencias significativas entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Tukey o ANOVA de una vía según corresponda. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El software Origin Pro 9.1 se utiliza para la gestión de datos, el análisis estadístico y la generación de gráficos. El rendimiento con el tratamiento de las NPs y el grupo control se comparó durante 24 y 48 h.

Para el ensayo vivo/muerto, las células HUVEC se sembraron en portaobjetos de vidrio y se trataron con NPs. Después de 24 h de incubación, los portaobjetos se tiñeron con el kit de viabilidad/citotoxicidad vivo/muerto (ThermoFisher) según las recomendaciones del fabricante. Las muestras se observaron mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM800, Carl Zeiss).

2.2.3.14 Internalización celular

Para la internalización de NPs de oro en células HUVEC, el núcleo se tiñó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y las fibras de actina con anticuerpo anti- β actina acoplado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) para delimitar el borde celular. DAPI se excitó con un láser de 405 nm al 1,0% de potencia y FITC con un láser de 488 nm al 0,20%. Las emisiones de DAPI y anticuerpos anti- β actina se recolectaron entre 410 - 500 nm y 500 - 700 nm, respectivamente. Las NPs de oro se excitaron con un láser de 640 nm (0,50% de potencia) y la emisión se recogió entre 650 - 700 nm.

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales de las emisiones de las NPs de oro y proyecciones ortogonales a partir de 30 imágenes en modo apilamiento en Z (longitud Z total = 8 μ m), recolectando fluorescencia de DAPI, FITC y NPs de oro como se describió anteriormente. Las señales fluorescentes se recolectaron en pistas separadas para cada posición Z. Para mayor claridad, se omitió la señal FITC en una reconstrucción 3D.

Se realizó una comparación relativa de la captación celular de NPs. Para esto, la intensidad de fluorescencia media de las NPs de oro en células HUVEC se

determinó a partir del análisis de imágenes confocales utilizando el software ImageJ.

2.2.3.15 Catálisis

La actividad catalítica sobre azul de metileno, a una concentración de $3,33 \times 10^{-5}$ M, se analizó mediante espectroscopia UV-Vis. En catálisis homogénea, se agregaron 90 μ L de NPs de oro (2 mg/mL) directamente en la celda de cuarzo con azul de metileno y 200 μ L de NaBH_4 a una concentración de 100 mM. la muestra se homogenizó por agitación magnética dentro de la celda del espectrofotómetro. La reacción se llevó a cabo a 25 °C.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 “Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol”

En este capítulo se detallan los resultados que fueron obtenidos durante el trabajo de investigación.


Se sintetizaron nanopartículas de plata con trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno (resveratrol) irradiado bajo luz ultravioleta. Las AgResvNPs se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión de energía, espectroscopia de rayos X (EDS), difracción de electrones de área selecta (SAED), espectroscopia UV-Vis, espectroscopia infrarroja (FTIR), espectroscopia raman, resonancia magnética nuclear (RMN), potencial zeta, dispersión dinámica de la luz (DLS) y estudio de la cinética de agregación y la estabilidad coloidal de este sistema en agua y s-DMEM y se evaluó la capacidad antioxidante con ensayo de conteo de fenoles totales. La irradiación con luz ultravioleta promueve la síntesis de AgResvNPs y modifica la estructura conformacional del resveratrol.

Los cambios en el resveratrol fueron confirmados por RMN. Las aplicaciones en SERS son una aplicación importante de este sistema.

Los resultados fueron publicados en la revista Colloid and Polymer Science, donde aparezco como primer autor. Se presenta el artículo integro, así como el material suplementario correspondiente.



Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol

Blanca E. Rodríguez Vázquez¹ · Cesar Rodríguez-Beas² · Ramón Alfonso Iñiguez-Palomares² · Hisila Santacruz-Ortega¹ · Rubén Mendoza-Cruz³ · Lourdes Soledad Bazán-Díaz³ · Yedith Soberanes¹ · Ericka Rodríguez-León²  · Rosa Elena Navarro¹

Received: 5 October 2021 / Accepted: 30 January 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

The synthesis of silver nanoparticles with polyphenolic molecules (AgResvNPs) is important due to potential applications as nanocarriers of resveratrol. Silver nanoparticles were synthesized with trans-3,5,4'-trihydroxystilbene (resveratrol) and irradiated under UV light. Further AgResvNPs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), selected area electron diffraction (SAED), UV–Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy with surface-enhanced Raman scattering (SERS), nuclear magnetic resonance (NMR), zeta potential, and dynamic light scattering (DLS) and study of aggregation kinetic and colloidal stability for this system in water and s-DMEM and evaluate the antioxidant capacity with total phenols count assay. Ultraviolet light irradiation promotes the synthesis of AgResvNPs and modifies the conformational structure of resveratrol. NMR confirmed these changes structurally in the molecule. Applications in SERS are an important application of this system.

Keywords Spectroscopy · Optical · Infrared · Raman scattering · Nanoparticles · Microscopy · Electron · Nuclear magnetic

Introduction

Noble metal nanoparticles, such as gold and silver, have had a great significance in different areas of application such as photochemical, catalysis [1, 2], sensor materials [3], electronics [4], and medicine, in that they awaken considerable interest into the scientific community that seek to synthesize them with the necessary properties for each application. In particular, silver is of great biological interest because it has historically been used to treat burns [5] for its antimicrobial

properties. Then, it is natural to seek the synthesis of stable silver nanoparticles, which allow the development of nanomedicine to be expanded.

There are numerous synthesis pathways in which different compounds are used as polymer solutions [6] or conventional synthesis with NaBH₄. In the search to improve the control and shape of nanoparticles, support systems have been incorporated, such as the case of kaolinite [7–9] and mineral surfaces [8], and green synthesis methods have emerged, using plant extracts with a high content of phenolic molecules that allow the reduction of ions. From silver to metallic silver [10]; however, because maintaining control of the size and shape of the nanoparticles is complicated, several research groups have proposed to carry out the synthesis processes with the main components of these extracts, such as EGCG [11] or resveratrol [12].

Regarding applications in nanomedicine, silver nanoparticles have various areas of development, such as treatment in ovarian cancer, antibacterial agents [13], anti-inflammatory agents, and drug delivery systems [14], all thanks to the unique properties associated with the size, shape, or surface charge of the nanoparticles.

✉ Ericka Rodríguez-León
ericka.rodriguezleon@gmail.com

✉ Rosa Elena Navarro
rosaelena.navarro@unison.mx

¹ Departamento de Investigación en Polímeros Y Materiales, Universidad de Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

² Departamento de Física, Universidad de Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

³ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

The bioavailability of EGCG [15] and resveratrol [16] is very low in foods or teas, so it is necessary to implement systems that serve as carriers for use as a treatment, such as noble metal nanoparticles; silver nanoparticles are an excellent candidate for the antioxidant molecules to be transported; it is necessary to preserve them from high temperatures to prevent their particular conformation from being modified. When switching from trans-resveratrol to cis-resveratrol, properties of resveratrol change. Antioxidant properties are more critical in trans-resveratrol than cis-resveratrol. The antioxidant properties, cardioprotective and anticancer, are associated with trans-resveratrol by this ratio is necessary to avoid its isomerization. Stability of silver nanoparticles has been investigated in lamellar liquid crystalline systems [17], which could be appropriate to enhance bioavailability in biological systems for AgResvNPs.

The synthesis of silver nanoparticles uses resveratrol and irradiation with ultraviolet light generated by hydrogen ions release. Structural modification of the molecule is produced when irradiation is at small distances. Aggregation kinetic and colloidal stability for water and s-DMEM were performed for size and zeta potential. The spectroscopic characterization by SERS shows that signals associated with resveratrol are amplified when this molecule functionalizes the silver nanoparticles (AgResvNPs). Additionally, the modification of the resveratrol conformation was also studied using NMR and UV–Vis spectroscopy.

Materials and methods

Materials

AgNO₃ for nanoparticle synthesis was purchased from Sigma-Aldrich with a purity of 99%. Resveratrol (3,4',5-Trihidroxi-*trans*-stilbene,5-[(1*E*)-2-(4-Hidroxifenil)ethenil]-1,3-benzenediol, C₁₄H₁₂O₃, purity of 99% Sigma-Aldrich). Ethanol (99% pure) used in the cleaning nanoparticles process was acquired from Fermont, and ultrapure water (milli-Q) was used in experiments.

Synthesis of AgResvNPs

For the silver nanoparticles, different amounts of silver nitrate were used, as shown in Table 1. AgNO₃ [0.001 M] was previously stirred for 1 h in the absence of light, and resveratrol [0.01 M] was added in a mixture of solvents 70:30 EtOH:H₂O (v:v). To each synthesis, the necessary quantity of the solvent mixture 70:30 EtOH: H₂O (v: v) was added to finish with a final volume of 3 mL at room temperature.

The synthesis was carried out for 24 h under a UV lamp of 20 W of power with wavelength 380 nm in a dark room

Table 1 Reductor precursor ratio in the synthesis of AgResvNPs

Sample	AgNO ₃ [0.001 M] μL	Resveratrol [0.01 M] μL	Solvent mL
AgResv1NPs	150	150	2.7
AgResv2NPs	150	300	2.55
AgResv3NPs	1500	1500	---
AgResv4NPs	1000	2000	---
AgResv5NPs	500	150	2.35

and room temperature, and subsequently, it was left under exposure to sunlight for 4 h. Each of the samples was subjected to a cleaning process employing centrifugation at 13,000 rpm for 1 h, and then the precipitate was resuspended in 70:30 EtOH:H₂O (v:v).

The isomerization is position-dependent on vials (5 mL) containing trans-resveratrol and silver nitrate. If the distance is less than 5 cm, it produces isomerization of the molecule; whether the samples are localized to a higher distance keeps without changing structure. Figure 1 shows the change conformational of the structure by irradiation with UV light.

UV–Vis spectroscopy

The measurements were carried out in a PerkinElmer Lambda 45 spectrophotometer, in quartz cells, at room temperature in a range of 200 to 900 nm with a speed of 480 nm/min. Thirty microliters of the AgResvNP colloidal solution was added along with 2950 μL of the EtOH:H₂O solvent mixture in a 70:30 ratio (v:v).

DPPH

The scavenging activity was determined to follow the DPPH assay, which monitors the absorbance for the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate). The method is based on an electron transfer that produces a violet solution in ethanol. All tests were done by triplicate with different AgResv1NPs, and AgResv3NP concentrations (400, 200, 100,

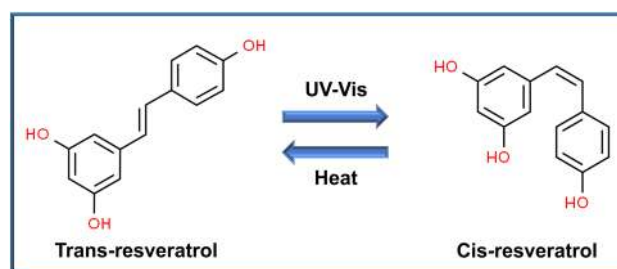


Fig. 1 Isomerization of trans-resveratrol for UV light irradiation

50, 25, 12.5, and 6.25 $\mu\text{g/mL}$) were tested. A total of 100 μL of every concentration was added to 100 μL of DPPH solution in ethanol (300 μM). Samples were incubated for 1 h in the dark before measuring absorbance at 520 nm on a microplate reader Multiskan FC, Thermo Scientific. The obtained results were compared with Trolox (70 $\mu\text{mol/L}$). The scavenging activity percentage was calculated with Eq. (1).

$$\% \text{ Scavenging Activity} = 100 \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \quad (1)$$

FTIR

The equipment used for all samples was a Perkin Elmer Fourier Frontier transform infrared (FT-IR) spectrophotometer, using the ATR technique with 16 scans. Measurements were made at room temperature. Polyphenolic molecules were used in powder, while the nanoparticles were dried in an oven at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The recovered powder was what was measured.

^1H NMR spectroscopy

Avance III equipment with a field frequency of 400 MHz Bruker was used. For the case of resveratrol and the silver nanoparticles generated with this molecule, a 70:30 mixture was used in EtOH- d_6 : D_2O , (v:v), using the signals of deuterated water as a reference.

Raman spectroscopy

It was performed in an iHR320 Horiba Jobin Yvon spectrophotometer, exciting with a laser at a wavelength of 785 nm with a power of 100 mW. It had an exposure time of 100 s, objective of 10 \times . Samples of 30 μL were placed on a glass slide, dried for 24 h at room temperature. The nanoparticle sample was obtained with the mixture EtOH: H_2O (70:30, v/v), at a 5 mM of resveratrol concentration and 0.01 M of silver nitrate.

Zeta potential and DLS

Zeta potential was measured using a Zetasizer Nano of Malvern. All measurements were made by triplicate, at room temperature.

Electrophoretic migration is determined by:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (2)$$

where μ_e is electrophoretic mobility, E is the electric field, and v is the velocity of nanoparticle in E . Zeta potential ζ is obtained using Smoluchowski model ($f=1$), depending on size and conductivity and polar or non-polar solvent. Henry equation is

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\epsilon} \mu_e \quad (3)$$

where ϵ is the dielectric constant defined as the ratio between solvent permittivity to vacuum permittivity, and η is the viscosity [18]. Since the solvent is a mixture of EtOH: H_2O (70:30, v/v) then ϵ is 40.52 [19] and η is 2.2249×10^{-3} Pa s at 25 $^{\circ}\text{C}$ [20].

Size determination was computed using a Stokes–Einstein equation, where solvent viscosity is a parameter that depends on a mixture of EtOH: H_2O .

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (4)$$

where k is Boltzmann constant, T temperature, η solvent viscosity, D diffusion coefficient, and d_H the hydrodynamic diameter of nanoparticles in solution.

Aggregation kinetic and colloidal stability in water and S-DMEM

Samples synthesized in glass vials were centrifuged at 14,000 rpm by 1 h on Eppendorf tubes of 2 mL. The supernatant was retired for their posterior analysis. The pellet of each tube was resuspended by sonication (15 min) in 0.5 mL of ultrapure water. Of the samples, AgResv1NPs and AgResv3NPs were obtained around 2 mL in each case. The samples were rested all night for stability assays. For the hydrodynamic diameter estimation by DLS, the original stock of AgResvNPs was dilute in ultrapure water in 1:10 proportion, and one mL of this dilution was employed in measurements. Of these same samples, the zeta potential was measured in ordinary conditions. Stability was verified at 0, 24, and 48 h. Interaction of AgResv1NPs and AgResv3NPs with supplemented DMEM (10% serum fetal bovine SFB): in an Eppendorf tube of 2 mL, 600 μL de NPs and 200 μL of supplemented DMEM were added. For zeta potential, only 50 μL of sample collocated in the bottom of U cell with Gel-Well pipette tips was used. The rest of the solvent put by both apertures of the cell is ultrapure water (400 μL of each side). For zeta potential, the voltage reduces and the number of cycles too. For size measurement, 100 μL of the prepared sample was taken and dispersed in 900 μL of ultrapure water.

TEM

The Jeol JEM-ARM200F transmission electron microscopy (TEM) equipment was used to obtain the micrographs, EDS, and SAED analysis. Thirty microliters of the sample was deposited on commercial gold grids with carbon support. They were left to dry for 24 h at room temperature.

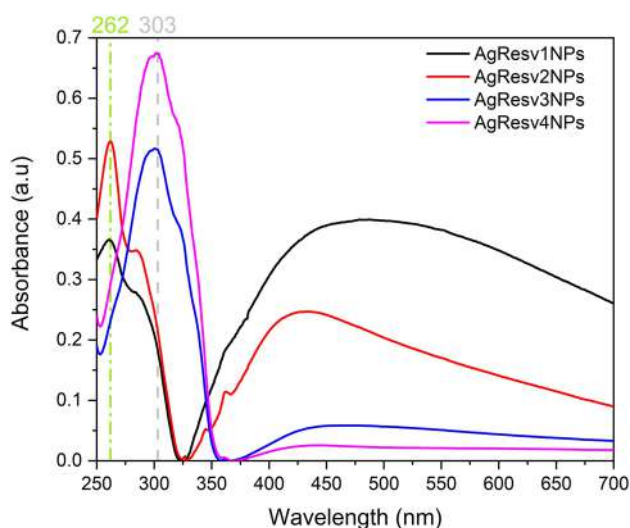


Fig. 2 UV–Vis spectra of AgResv1–4NPs show the absorption maxima associated with polyphenols and surface plasmons associated with nanoparticles

Results and discussion

Synthesis process

The synthesis of nanoparticles was carried out using a UV lamp to irradiate the system composed of silver nitrate and trans-resveratrol in the first process. The exposure time was 24 h. For the AgResv5NPs sample (see Table 1), the nanoparticles do not show a plasmon (Fig. S1). This indicates that nanoparticles sizes are of the order of 10 nm, as can be verified in the microstructural characterization process.

The absorption peak position of resveratrol is the same, but intensity decreases after the nucleation process. This is the only case in Table 1 where the formation of nanostructures was performed using a lower concentration for silver nitrate.

UV–Vis spectroscopy

The UV–Vis spectra shown in Fig. 2 correspond to AgResvNPs. UV–Vis spectroscopy shows a fundamental difference; the absorption peak of resveratrol is maintained for the case of samples placed at a greater distance from the ultraviolet lamp (such as shown in the diagram). While for the case of the samples at a shorter distance from the lamp, A.-L. Välimaa, et al., using UV light irradiation of stilbenoids, to obtain isomerization compound [21]. During this process, there was no change in the maximum absorption of resveratrol position for the AgResv3–5NPs samples and if there is a modification for samples 1 and 2. After this process was carried out in the dark, the AgResv1–4NPs samples were exposed to light solar for a period of 4 h. When measuring the UV–Vis spectrum, we could observe that the surface plasmons are more evident for the AgResv1–2NPs samples than for the AgResv3–4NPs samples. However, in the characterization process, we observed the formation of nanoparticles of sizes on the order of about 30–40 nm. Thus, we observe modifications to the structural conformation of resveratrol (using UV irradiation) and nucleation formation that forms stable nanoparticles when we use higher concentrations of resveratrol to silver nitrate. At the same time, nanoparticle nucleation is formed under sunlight (visible and infrared light, which only contains a small percentage of UV light). The temperature of the sample was kept constant during solar irradiation to avoid effects due to

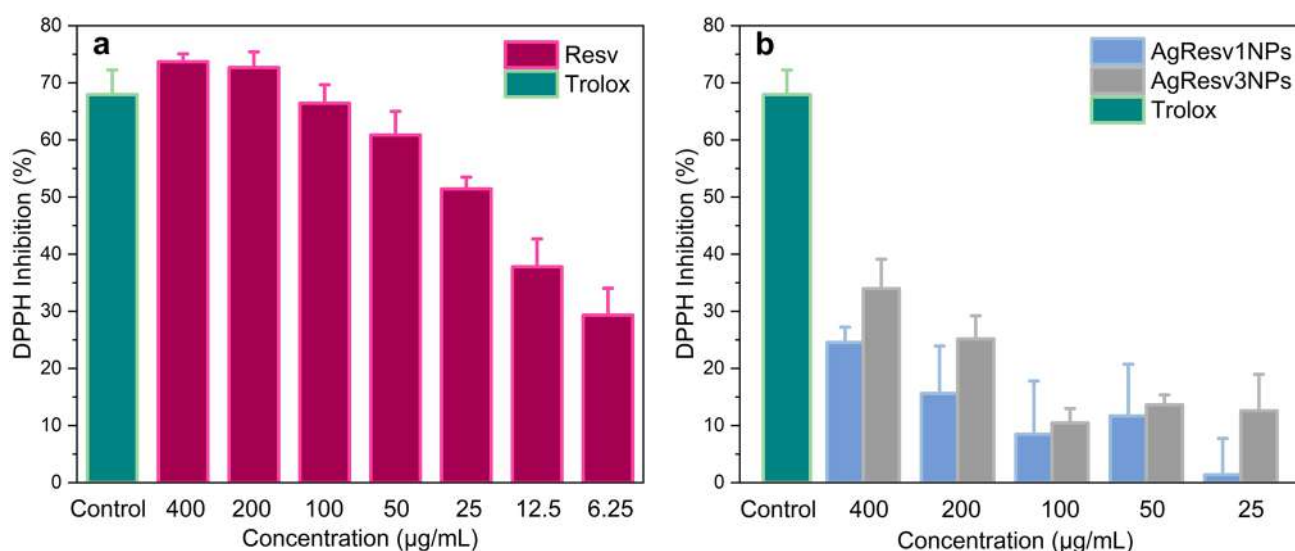


Fig. 3 DPPH inhibition percentage for **a** Resv and **b** AgResv1NPs and AgResv3NPs

temperature. The ultraviolet light generates changes in the structure of resveratrol. For sample AgResv3-4NPs, we have trans-resveratrol (t-resveratrol) at 303 nm, and for the case AgResv1-2NPs, cis-resveratrol at 262 nm; this refers to the spatial conformation of the molecule and match with UV–Vis spectra reported for this conformation [22]; on the other hand, we see that the plasmons associated with the nanoparticles around 425 nm, those obtained from cis-resveratrol, are more pronounced regarding trans-resveratrol [23].

DPPH and total phenols

The inhibition percentage for 400 µg/mL of resveratrol is around 70% with trans-resveratrol. For AgResv1NPs (Fig. 3a), conformation is cis-resveratrol with an inhibition percentage of 25%; for AgResv3NPs (Fig. 3b), conformation is trans-resveratrol and an inhibition percentage of 35% both results for a nanoparticles concentration of 400 µg/mL; this is in accordance with the data reported, trans-resveratrol (the para position) as the most active due to its lower O–H bond dissociation energy [24, 25].

By analyzing the total phenols, the amount of the phenol in the molecule was determined compared to those present in gallic acid, obtaining the results of Table 2. Although gallic acid equivalents are considerably reduced when nanoparticle synthesis is carried out, there is still the presence of phenolic molecules in the nanoparticles, indicating that even after the molecule acted as a reducing agent, the material remained to stabilize the nanoparticles. On the other hand, the data obtained in the AgResvNPs are approximately 42%, indicating a more significant presence of phenols stabilizing the nanoparticle.

FTIR

While Fig. 4 shows the infrared spectra corresponding to resveratrol and AgResv5NPs, the bands associated with the functional group OH of resveratrol are located at 3174 cm⁻¹. In contrast, this band moves towards 3248 cm⁻¹ with lower intensity for the silver nanoparticles, suggesting that resveratrol OH groups are involved in the reduction reaction in the synthesis or complexed with silver nanoparticles, as reported by Park and collaborators [26]. A band at 1732 cm⁻¹ associated with C=O is not present in resveratrol but gives us indications of how the reaction is taking place; the signal corresponding to C–O is found at 1215 and 843 cm⁻¹, the one corresponding to C–H.

Table 2 Total phenol count concerning gallic acid

Sample	Gallic acid mg/g sample
Resveratrol	657 ± 7
AgResv5NPs	274 ± 25

¹H NMR spectroscopy

The NMR spectrum of the silver and resveratrol nanoparticles was obtained, as can be seen in Fig. 5, where it is observed that the proton signals are shifted. The observed chemical displacements (δ) correspond to the protons assigned as H5 (δ = 0.009), H5' (δ = 0.009), and H2 (δ = 0.002); the rest did not present displacements. This indicates that the ring with two hydroxyl groups is an inactive zone within resveratrol. The change in the protons of the double bond and only one pair of protons of the other ring would indicate a conformational change of the molecule. Based on this, the electrons that would be intervening in reducing the metal salt would be those corresponding to the double bond in the molecule.

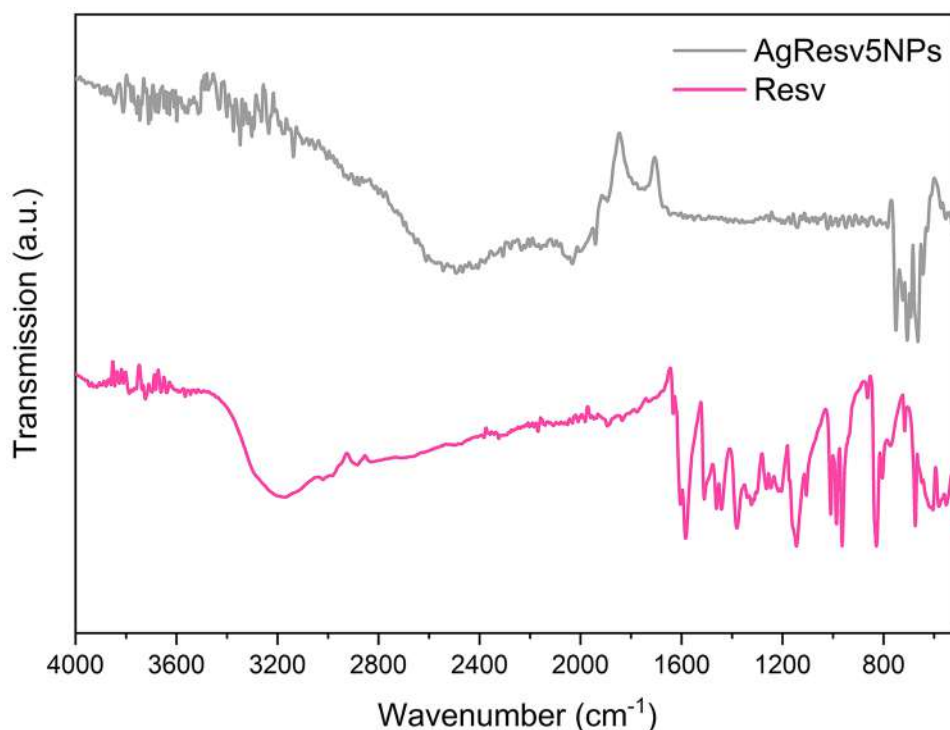
In Fig. 6, a comparison is made between the NMR spectrum of resveratrol and the AgResv5NPs. Rodríguez et al. have reported conformational changes by irradiating resveratrol with ultraviolet light, observed by NMR [24]. Additionally, our working group has used resveratrol as a reducing agent for silver nitrate and observed the displacements for trans-resveratrol.

Raman spectroscopy

In Fig. 7, we observe the characteristic curve of resveratrol that coincides with the graph reported by Vongsvivut et al. [27]. The slightly displaced points are due to the difference in the solvent. Raman spectroscopy with surface-enhanced Raman scattering (SERS) was also obtained using silver nanoparticles where we again obtain the characteristic curve for resveratrol; small displacements are observed for pure resveratrol. This figure is obtained from a sample containing AgResv5NPs, which are stabilized and complexed with resveratrol; the concentration of resveratrol is 350 times lower in the pink graph than the gray curve. What is observed is a proportional increase in the intensity of the curve and increases in the area of some peaks. The two highest peaks in the 1640–1600 cm⁻¹ for resveratrol reported by Pompeu D.R., Larondelle Y., and Rogez H. et al. match with our results, intense and resolved bands, presented in 1400–1000 cm⁻¹ region [28].

Tiwari et al., Michael and Jiang, and Wang et al. [29–31] point out that nanoparticles act by amplifying the electromagnetic field that generates the vibration of the molecule, which allows improving the resolution of the peaks; this amplification is found in the function of the size of the nanoparticles and their shape, being then that the more significant and with irregular shapes the nanoparticles will exponentially increase the vibration signal. This differs from our results in the sense that silver nanoparticles have a hemispherical shape and sizes of the order of 4 nm, and they are the ones that present the best increase and resolution in the signals.

Fig. 4 Infrared spectroscopy of resveratrol and AgResv5NPs, where a decrease in the intensity of the functional group OH is appreciated, as well as the emergence of C=O in 1752 cm^{-1}



While other authors point out that the amplification of the signals presents two phenomena, the chemo-adsorption on the nanostructures and the intensification of the electric field, the molecules of interest are adsorbed on the surface nanomaterials, forming bio-nanocomplexes. The new chemical bond generates a charge transfer mechanism between the molecule and the metal of the nanostructure;

this is the chemical contribution to the increase of the signal, which generates changes in the intensities of the order of 102. The electromagnetic contribution generates more significant increases on the signal through laser light's effect on plasmonic excitations through localized surface plasmon resonance (LSPR); this generates drastic increases in the electric field. The electromagnetic factor,

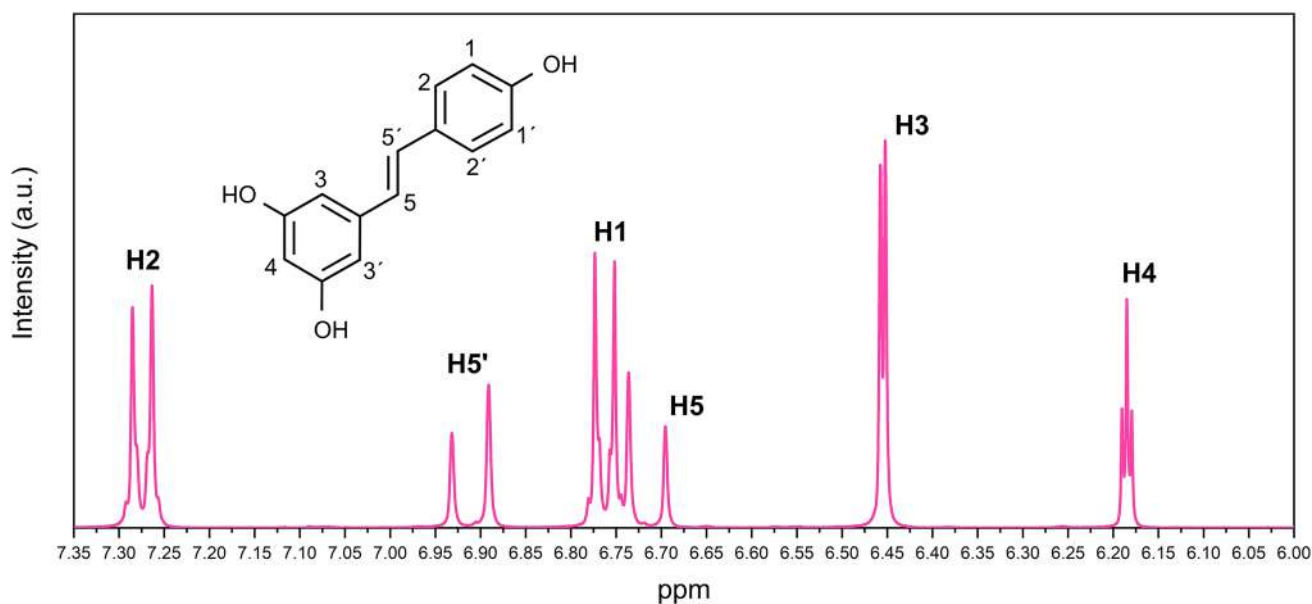


Fig. 5 ^1H NMR of resveratrol. The upper image shows the resveratrol molecule with the assigned protons

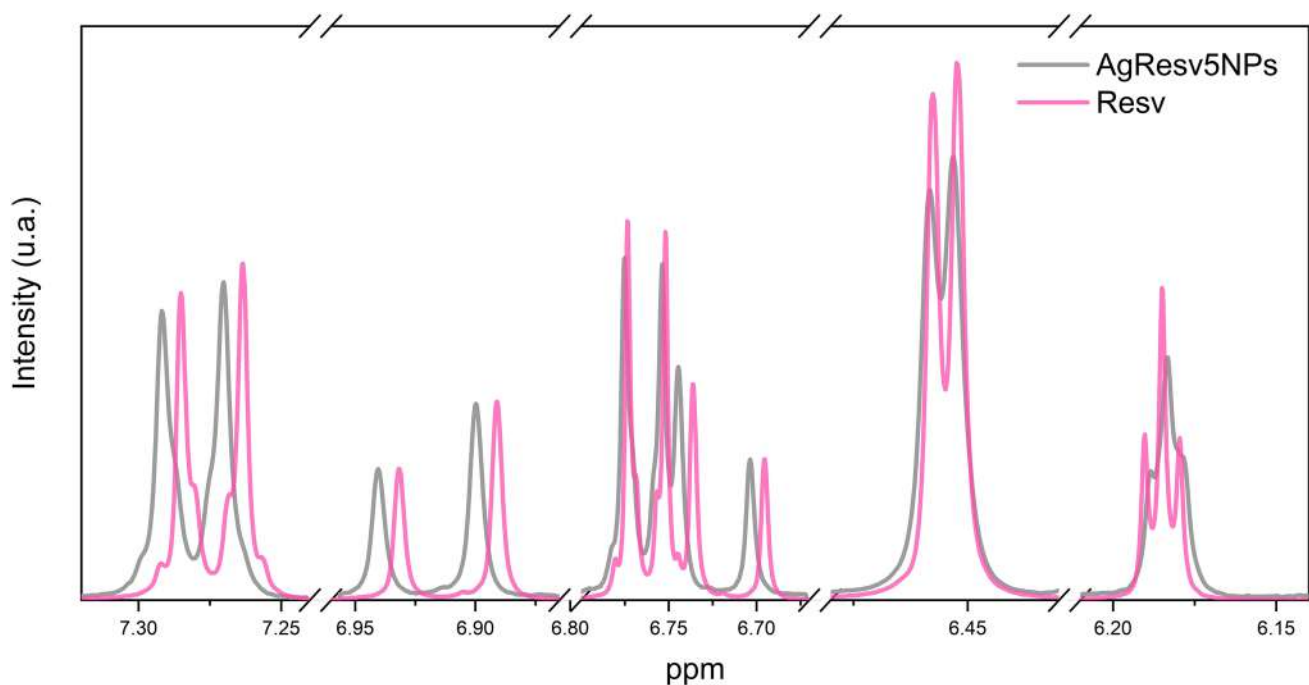


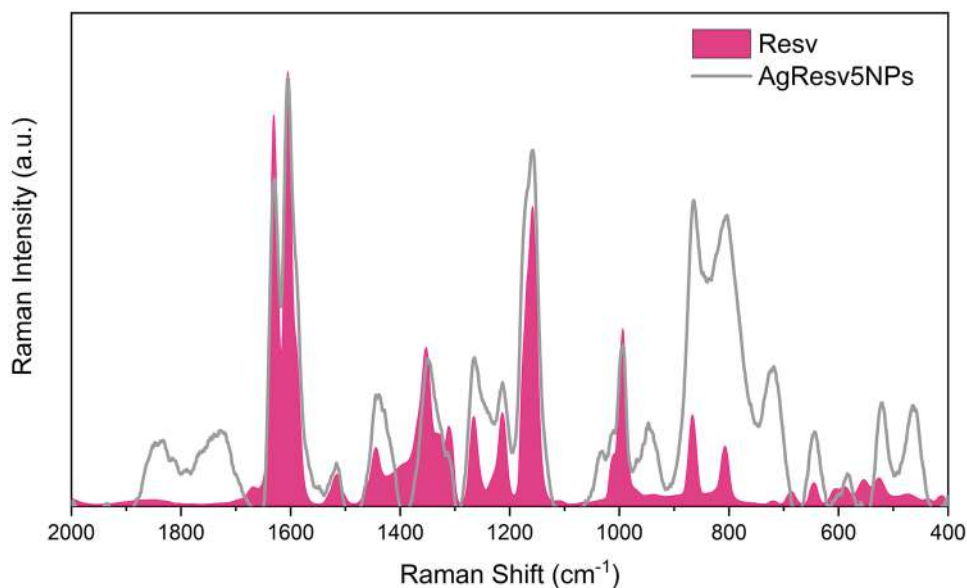
Fig. 6 ^1H NMR of resveratrol and AgResv5NPs, in a 70:30 ratio in EtOH- d_6 : D_2O , v: v

the ratio between the electric field of LSPR and the electric field without nanostructures, is of the order of power four [32, 33].

From the results obtained by the different characterization techniques, the mechanism of formation of the metallic nanoparticles is proposed, the evidence shown by the Raman and IR spectroscopic techniques, which show the formation of the carbonyl group once the synthesis has been carried out, thus as the displacements observed by NMR,

indicate that the oxidation is carried out by the hydroxyl group present in the aromatic ring corresponding to the proton H1. This preference has already been reported previously by Truong et al. [34], where it is observed that the oxidation of resveratrol occurs by the same proton. Resveratrol loses hydrogen, remaining in its radical form, which will reduce the metal ions to give rise to the nanoparticle formation, leaving these functionalized with oxidized resveratrol molecules.

Fig. 7 Raman spectroscopy of resveratrol and AgResvNPs. Nanoparticles are observed to amplify resveratrol signals



Zeta potential and DLS

Figure 8a shows the size distribution for AgResv1NPs, the Gaussian fit denotes $x_c = 48 \pm 0.8$ nm. Figure 8b corresponds to size distribution for AgResv3NPs, where the Gaussian fit denote $x_c = 37 \pm 0.7$ nm. The conformational structure of Resv is cis-Resveratrol for AgResv1NPs and trans-resveratrol by AgResv3NPs. Table 3 shows a similar zeta potential for AgResv1NPs and AgResv3NPs, indicative of stabilized nanoparticles, using as solvent a mixture of EtOH: H₂O (70:30, v/v). Viscosity and dielectric constant are modified when using ethanol and water in different proportions, the zeta potential changes. This demonstrated the importance of the chemical environment for nanomaterials.

Aggregation kinetic and colloidal stability in water and S-DMEM

Studies of aggregation kinetic and colloidal stability were performed in water, and s-DMEM, variations in the size were nonsignificant in the time for both samples, which indicate agglomeration non-effects (Fig. 9a). The zeta potential (Fig. 9b) was kept in stability margin for the AgResv1NPs and non-stability by AgResv3NPs, these results suggest that cis-resveratrol generates more stability (-30 mV at mean) than the sample with trans-resveratrol (with zeta potential around -20 mV). We observe aggregation in relation to the sample in ethanol: water, the samples in water increase their size around 2 times, this can explain observing that chemical environment of the sample determines the interaction's type. When the solvent is water the effects of hydration and interactions Van der Waals over molecule promote attractive interaction

Table 3 Zeta potential

Sample 300 µg/mL	Zeta potential mV
AgResv1NPs	-32 ± 0.7
AgResv3NPs	-31 ± 0.3

between nanoparticles [35]. When AgResv1NPs and AgResv3NPs are dispersed in sDMEM, the sizes of the nanoparticles non-increase (Fig. 9c) however zeta potential for AgResv1NPs (Fig. 9d) is around -30 mV while for AgResv3NPs is almost zero. These results suggest different interaction types of sDMEM with cis and trans-resveratrol and coincide with the results obtained by Jarosova et. al. when it was observed that the metabolism of trans-resveratrol (AgResv3NPs) is much lower than for cis-resveratrol (AgResv1NPs). In this sense, trans-resveratrol is a non-polar molecule that is unstable, not soluble in polar media; on the other hand, cis-resveratrol, due to its structural conformation, has a greater affinity with polar media [36]. sDMEM is a polar medium, which implies a poor interaction with AgResv3NPs, and the salts contained in it serve as an electrostatic screen that takes it to the isoelectric point; however, it should be noted that there are no significant increases in size as a consequence of the potential drop, but this can be explained in the sense that the system is shown isolation from the polar medium in which it is immersed; low solubility and low bioavailability of resveratrol has been widely reported [37].

TEM

The size distribution was carried out for the nanoparticles synthesized with resveratrol, with the previous obtaining

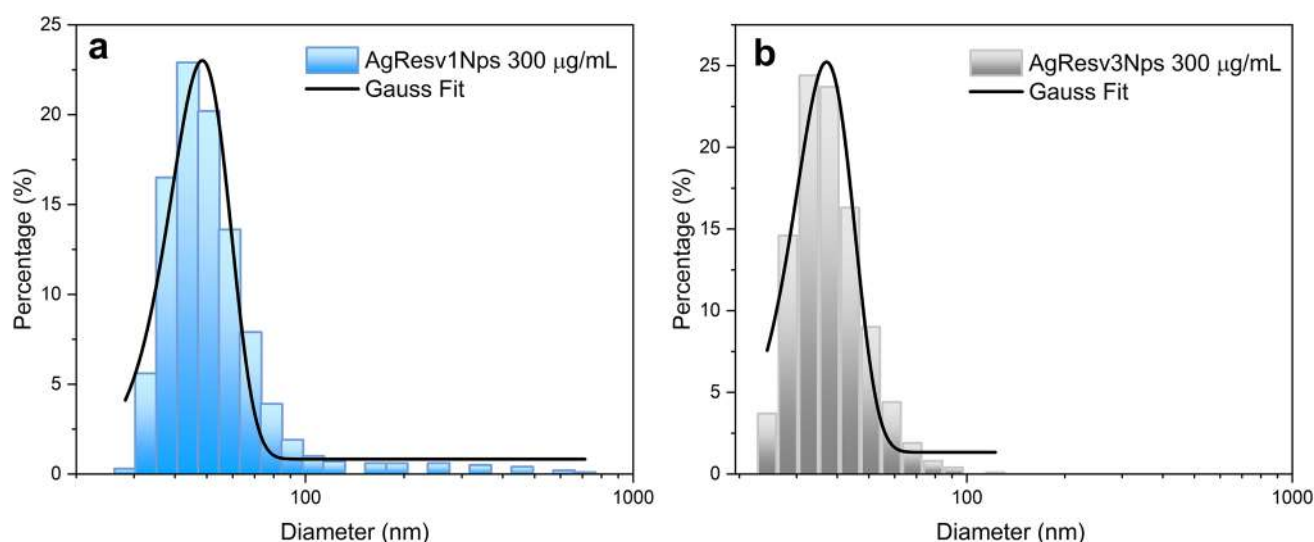


Fig. 8 Size distribution: **a** AgResv1NPs and **b** AgResv3NPs

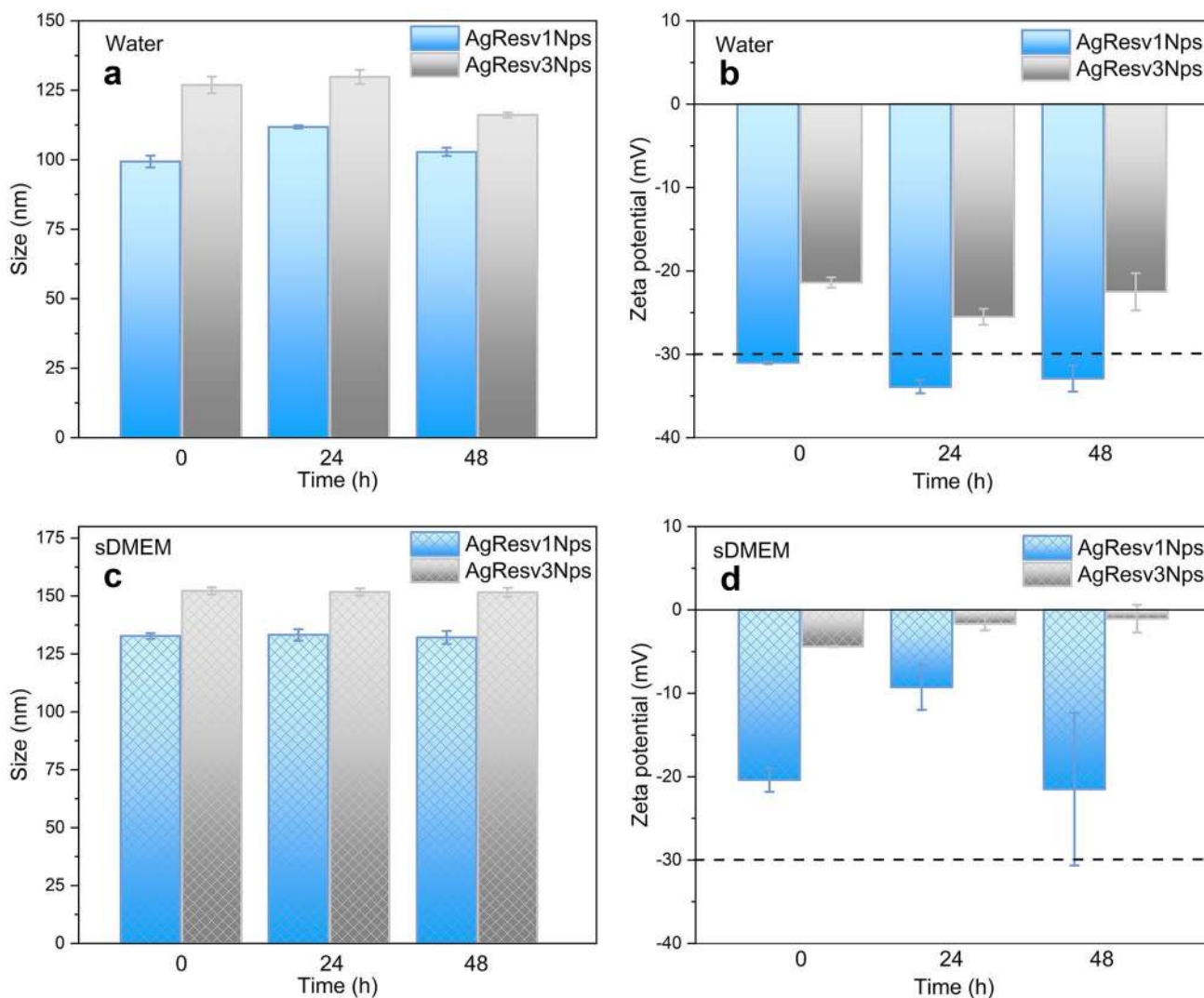


Fig. 9 Aggregation kinetic and colloidal stability of AgResv1Nps and AgResv3Nps after clean process at 0, 24, and 48 h for **a** size and **b** zeta potential in water and **c** size and **d** zeta potential in s-DMEM

of the corresponding micrographs by TEM. The results obtained are shown in Fig. 8, which includes the respective micrograph of their morphology and size distribution. The data referring to the average size and the PDI are reported in Table 4. The results indicate that both populations of nanoparticles have a low polydispersity index, which indicates that we have monodisperse populations.

The high-resolution micrographs presented in Fig. S2 correspond to the AgResvNPs syntheses, and the presence of metallic silver is confirmed through the analysis to determine the interplane distances using the Digital Micrograph software; employing the Fourier transform, an interplanar distance of $d = 2.38 \text{ \AA}$ was obtained, which is consistent with the crystallographic record for a metallic silver system, with a face-centered cubic structure (fcc), in the (111) plane. JCPDS file: 65–2871.

SAED

Diffraction rings obtained by the SAED technique show an fcc phase crystal structure. Fig. S3a, c show the SAED zone and Fig. S3b, d the diffraction with the Miller index associated [38, 39].

Conclusions

The synthesis of silver nanoparticles was performed using resveratrol and irradiation with UV light using ethanol:water as solvent. This synthesis process gave rise to metallic nanoparticles functionalized with polyphenolic molecules. The synthesis mechanism implies that the reducer, in this case, resveratrol, will donate electrons

so that the silver ions reach their zero-valent oxidation state, which one promotes nucleation. The oxidized molecules cover the surface of the nanoparticles, and isomerization of resveratrol by UV light produces modifications to the structure of resveratrol, but the synthesis of silver nanoparticles is modified in size measurement by DLS. An essential result of this work is the use of silver nanoparticles that have a size of around 3 nm that intensify the Raman spectroscopy signals by the SERS mechanism, which allows determining the characteristic signals of a molecule at very low concentrations of the order of mM. By infrared spectroscopy, the formation of the carbonyl group is found once the synthesis has been carried out, which is consistent with the oxidation process that gives rise to the metallic nanoparticles. Study of aggregation kinetic and colloidal stability in water and S-DMEM show the instability of AgResv3NPs for these solvents which implies that before use in biological systems must be encapsulated in liposomes or lamellar liquid crystalline systems. NMR determined that the electrons that would be intervening in reducing the salt functionally correspond to the molecule's double bond.

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00396-022-04957-3>.

Acknowledgements BERV would like to thank Conacyt for Doctoral Fellowship number 722868.

Funding TEM analysis was supported by LUME, Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica del Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Jiang Z-J, Liu C-Y, Sun L-W (2005) Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. *J Phys Chem B* 109:1730–1735. <https://doi.org/10.1021/jp046032g>
- Vidhu VK, Philip D (2014) Catalytic degradation of organic dyes using biosynthesized silver nanoparticles. *Micron* 56:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.10.006>
- Anker JN, Hall WP, Lyandres O et al (2009) Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nanoscience and Technology*. Co-Published with Macmillan Publishers Ltd, UK, pp 308–319
- Desireddy A, Conn BE, Guo J et al (2013) Ultrastable silver nanoparticles. *Nature* 501:399–402. <https://doi.org/10.1038/nature12523>
- Klasen HJ (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26:131–138. [https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(99\)00116-3](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(99)00116-3)
- Patakfalvi R, Viranyi Z, Dekany I (2004) Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. *Colloid Polym Sci* 283:299–305. <https://doi.org/10.1007/s00396-004-1138-8>
- Patakfalvi R, Oszkó A, Dékány I (2003) Synthesis and characterization of silver nanoparticle/kaolinite composites. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 220:45–54. [https://doi.org/10.1016/s0927-7757\(03\)00056-6](https://doi.org/10.1016/s0927-7757(03)00056-6)
- Németh J, Rodríguez-Gattorno G, Díaz D et al (2004) Synthesis of ZnO nanoparticles on a clay mineral surface in dimethyl sulfoxide medium. *Langmuir* 20:2855–2860. <https://doi.org/10.1021/la035097s>
- Patakfalvi R, Dékány I (2004) Synthesis and intercalation of silver nanoparticles in kaolinite/DMSO complexes. *Appl Clay Sci* 25:149–159. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2003.08.007>
- Ahmad S, Munir S, Zeb N et al (2019) Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine* 14:5087–5107. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200254>
- Saadh MJ, Aldalaen SM (2021) Inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) combined with zinc sulfate and silver nanoparticles on avian influenza A virus subtype H5N1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 25:2630–2636. https://doi.org/10.26355/eur-rev_202103_25427
- Yuan Y-G, Peng Q-L, Gurunathan S (2017) Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 12:6487–6502. <https://doi.org/10.2147/ijn.s135482>
- Mohammed AE, Al-Qahtani A, Al-Mutairi A et al (2018) Antibacterial and cytotoxic potential of biosynthesized silver nanoparticles by some plant extracts. *Nanomaterials (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/nano8060382>
- Burduşel A-C, Gherasim O, Grumezescu AM et al (2018) Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials (Basel)* 8:681. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>
- Almatroodi SA, Almatroodi A, Khan AA et al (2020) Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer. *Molecules* 25:3146. <https://doi.org/10.3390/molecules25143146>
- Nguyen C, Savouret J-F, Widerak M et al (2017) Resveratrol, potential therapeutic interest in joint disorders: A critical narrative review. *Nutrients* 9:45. <https://doi.org/10.3390/nu9010045>
- Patakfalvi R, Dékány I (2002) Preparation of silver nanoparticles in liquid crystalline systems. *Colloid Polym Sci* 280:461–470. <https://doi.org/10.1007/s00396-001-0629-0>
- Danaei M, Kalantari M, Raji M et al (2018) Probing nanoliposomes using single particle analytical techniques: effect of excipients, solvents, phase transition and zeta potential. *Heliyon* 4:e01088. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01088>
- Babu PRS, Subrahmanyam CVS, Thimmasetty J et al (1970) Solubility enhancement of cox-II inhibitors by Cosolvency approach. *Dhaka Univ J Pharm Sci* 7:119–126. <https://doi.org/10.3329/dujps.v7i2.2166>
- Khattab IS, Bandarkar F, Fakhree MAA, Jouyban A (2012) Density, viscosity, and surface tension of water+ethanol mixtures from 293 to 323K. *Korean J Chem Eng* 29:812–817. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0239-6>
- Välímäa A-L, Raitanen J-E, Tienaho J et al (2020) Enhancement of Norway spruce bark side-streams: Modification of bioactive and protective properties of stilbenoid-rich extracts by UVA-irradiation. *Ind Crops Prod* 145:112150. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112150>
- Vovk I, Glavnik V (2015) Analysis of dietary supplements. In: *Instrumental thin-layer chromatography*. Elsevier, pp 589–635
- López-Hernández J, Paseiro-Losada P, Sanches-Silva AT, Lage-Yusty MA (2007) Study of the changes of trans-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of trans- and cis-resveratrol in Spanish white wines. *Eur Food Res Technol* 225:789–796. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0483-x>

24. Rodríguez RÁ, Lahoz IR, Faza ON et al (2012) Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization. *Org Biomol Chem* 10:9175–9182. <https://doi.org/10.1039/c2ob26241j>
25. Mao Q (2015) The synthesis and antioxidant capacities of a range of resveratrol and related phenolic glucosides. <https://digital.library.adelaide.edu.au>
26. Park S, Cha S-H, Cho I et al (2016) Antibacterial nanocarriers of resveratrol with gold and silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 58:1160–1169. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.068>
27. Vongsivut J, Robertson EG, McNaughton D (2008) Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy of resveratrol. *Aust J Chem* 61:921. <https://doi.org/10.1071/ch08204>
28. Pompeu DR, Larondelle Y, Rogez H et al (2018) Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools. *Baseline*
29. Tiwari VS, Oleg T, Darbha GK et al (2007) Non-resonance SERS effects of silver colloids with different shapes. *Chem Phys Lett* 446:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.07.106>
30. Michaels AM, Jiang BL (2000) Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single rhodamine 6G molecules. *J Phys Chem B* 104:11965–11971. <https://doi.org/10.1021/jp0025476>
31. Wang R, Yao Y, Shen M, Wang X (2016) Green synthesis of Au@Ag nanostructures through a seed-mediated method and their application in SERS. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 492:263–272. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.11.076>
32. Xu D, Yang W, Zhang S, Chen J (2018) High surface roughness gold nanoparticle/centimeter level silver nanowire heterostructure detectors for SERS application. *Sens Actuators A Phys* 279:457–461. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2018.06.053>
33. Starowicz Z, Wojnarowska-Nowak R, Ozga P, Sheregii EM (2018) The tuning of the plasmon resonance of the metal nanoparticles in terms of the SERS effect. *Colloid Polym Sci* 296:1029–1037. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4308-9>
34. Truong V-L, Jun M, Jeong W-S (2018) Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors* 44:36–49. <https://doi.org/10.1002/biof.1399>
35. Gambinossi F, Mylon SE, Ferri JK (2015) Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles. *Adv Colloid Interf Sci* 222:332–349. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.07.015>
36. Jarosova V, Vesely O, Doskocil I et al (2020) Metabolism of cis- and trans-Resveratrol and Dihydroresveratrol in an Intestinal Epithelial Model. *Nutrients* 12:595. <https://doi.org/10.3390/nu12030595>
37. Chang Y-J, Chang Y-C, Liu RH et al (2018) Resveratrol can be stable in a medium containing fetal bovine serum with pyruvate but shortens the lifespan of human fibroblastic Hs68 cells. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/2371734>
38. Dhand V, Soumya L, Bharadwaj S et al (2016) Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 58:36–43. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.018>
39. Singh P, Kim YJ, Yang DC (2016) A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by *Panax ginseng* leaves. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44:1949–1957. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1115410>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Additional Information

Spectroscopic analysis and Nuclear Magnetic Resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-Resveratrol and cis-Resveratrol

Blanca E. Rodríguez Vázquez¹, Cesar Rodríguez-Beas², Ramón Alfonso Iñiguez-Palomares², Hisila Santacruz-Ortega¹, Rubén Mendoza-Cruz³, Lourdes Soledad Bazán-Díaz³ Yedith Soberanes¹, Ericka Rodríguez-León^{2*}, Rosa Elena Navarro^{1*},

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Rosales and Transversal, 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico

² Departamento de Física, Universidad de Sonora, Rosales and Transversal, 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico

³ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de Mexico, Mexico

Corresponding authors: ericka.rodriguezleon@gmail.com and rosaelena.navarro@unison.mx

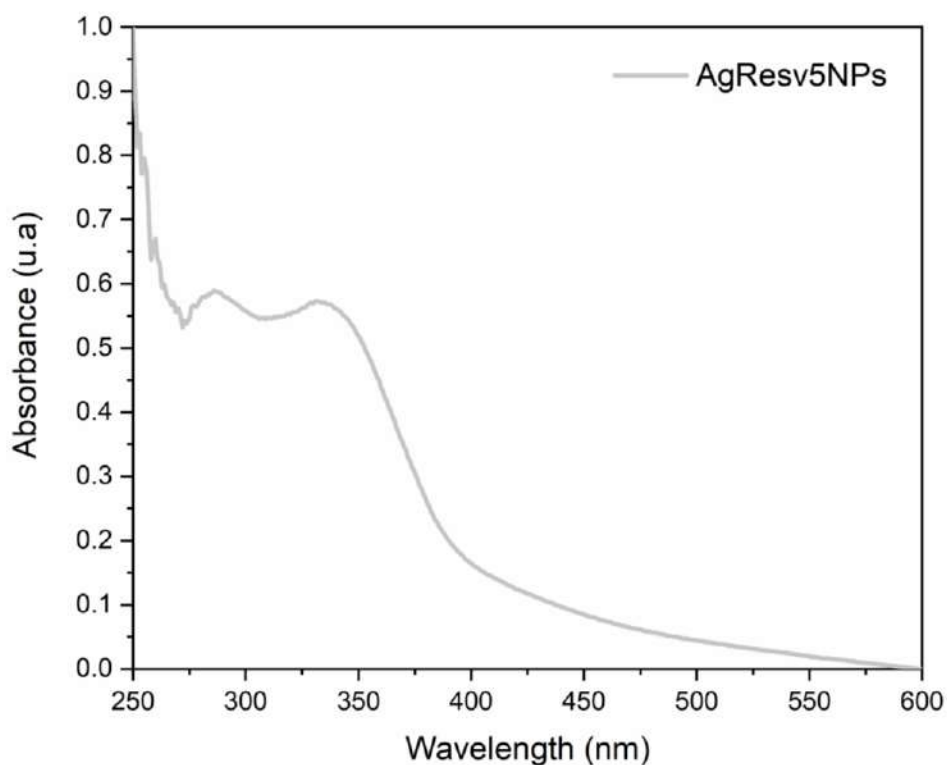


Figure S1. UV-Vis spectrum for ArResv5NPs. Silver nanoparticles with size less of 5 nm.

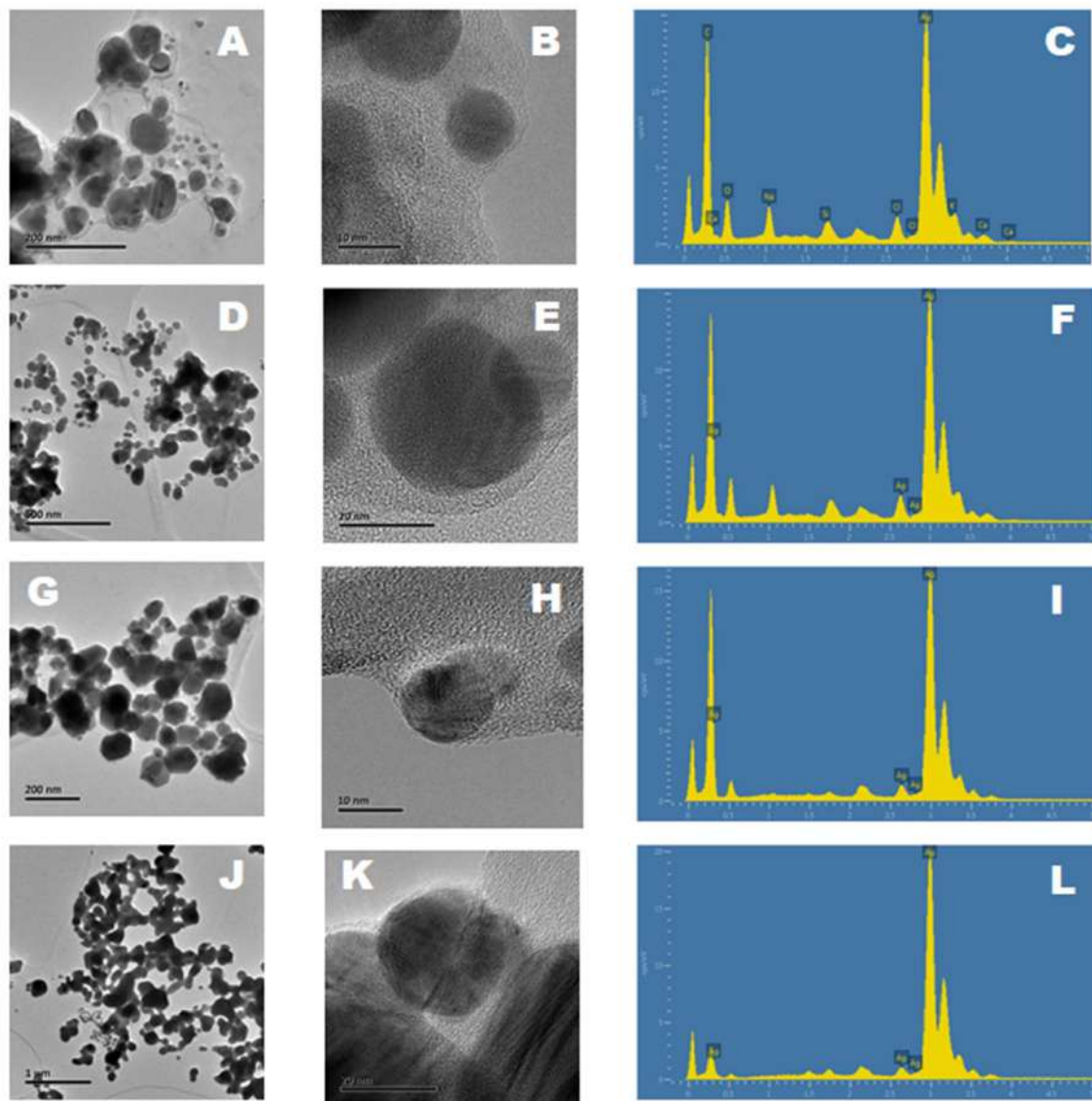


Figure S2. A,B and C) are the micrograph of TEM, HRTEM and EDS by AgResv1NPs, D,E and F) by AgResv2NPs, G,H and I) by AgResv3NPs and J,K and L) by AgResv4NPs.

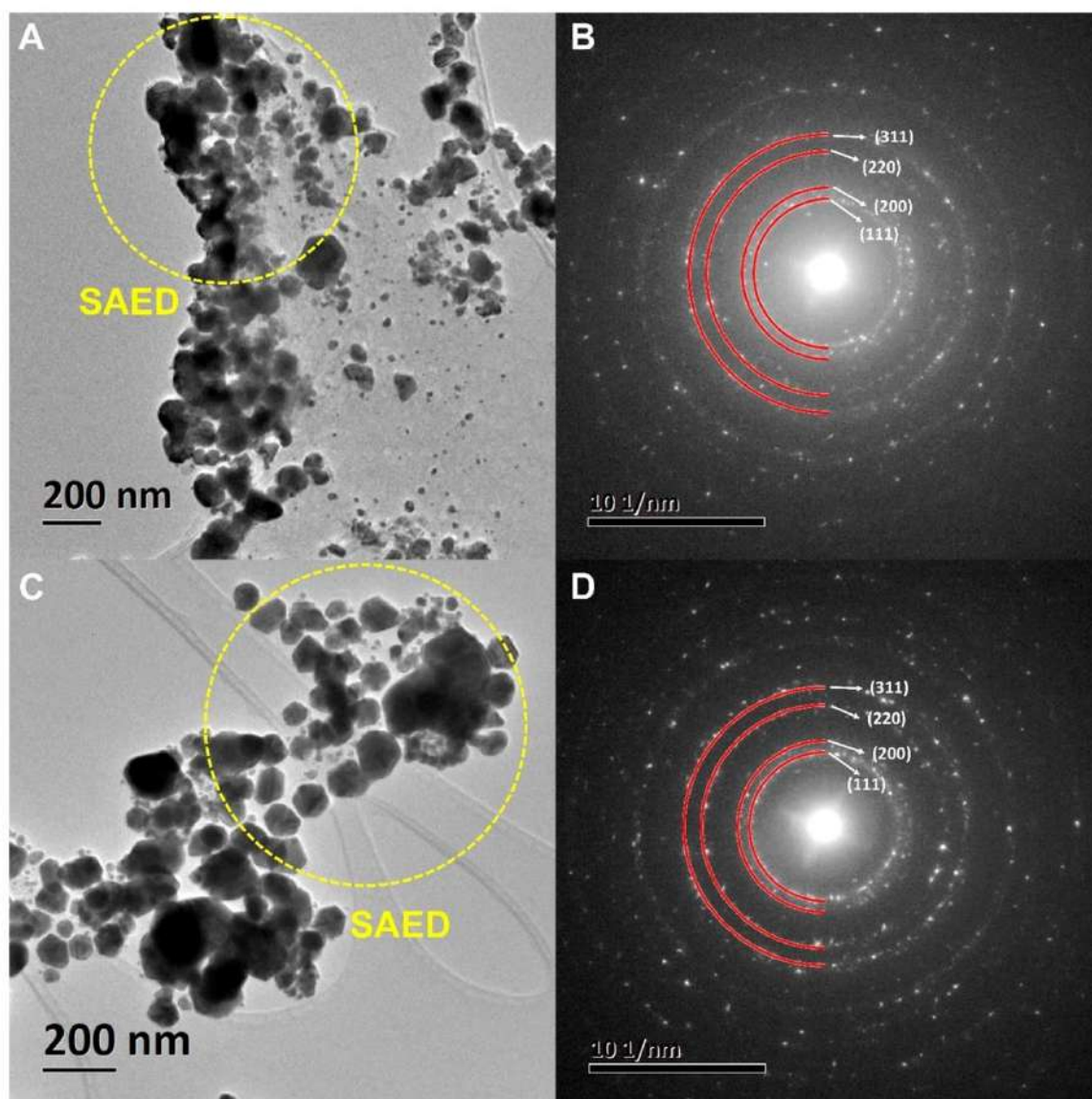


Figure S3. SAED A) and B) Diffraction of AgResv1NPs and C) and D) AgResv3NPs.

3.2 “Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Mimosa tenuiflora* Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis”

En esta sección se anexa el trabajo derivado de la investigación que fue publicado en un artículo del mismo nombre en la revista Nano Research Letters.

En este trabajo se realizó la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, utilizando la ruta de síntesis verde, utilizando extracto de *Mimosa tenuiflora* como agente reductor. Se determinó la capacidad antioxidante del extracto se evaluó utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (ensayo de DPPH) y conteo de fenoles totales. Las AuNPs se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X, UV-Vis, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y espectrometría fotoelectrónica de rayos X para la determinación de grupos funcionales sobre su superficie. Los AuMt (coloides formados por AuNP y moléculas de Mt) exhiben múltiples formas con tamaños entre 20 y 200 nm. Las AuMt se probaron en la degradación de azul de metileno en catálisis homogénea añadiendo borohidruro de sodio. Las NPs más pequeñas (AuMt1) tienen un coeficiente de degradación de 0,008/s y alcanzan el 50% degradación en 190s.

Se evaluó la viabilidad celular y la citotoxicidad en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), y se encontró un efecto citotóxico moderado a las 24 y 48 h. Sin embargo, la toxicidad no se comporta de forma dosis-dependiente. La internalización celular de AuMt en células HUVEC se analizó mediante escaneo por microscopia láser confocal. Para AuMt1, se puede observar que el material se encuentra disperso en el citoplasma, mientras que en AuMt2, el material se concentra en la periferia nuclear.


Actualmente, el artículo cuenta con más de 60 citas y derivado de esta investigación se obtuvo una patente. A continuación se anexa el artículo así como el material suplementario.

NANO EXPRESS

Open Access



Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Mimosa tenuiflora* Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis

Ericka Rodríguez-León¹, Blanca E. Rodríguez-Vázquez², Aarón Martínez-Higuera¹, César Rodríguez-Beas¹, Eduardo Larios-Rodríguez³, Rosa E. Navarro², Ricardo López-Esparza¹ and Ramón A. Iñiguez-Palomares^{1*} 

Abstract

Synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) with plant extracts has gained great interest in the field of biomedicine due to its wide variety of health applications. In the present work, AuNPs were synthesized with *Mimosa tenuiflora* (Mt) bark extract at different metallic precursor concentrations. Mt extract was obtained by mixing the tree bark in ethanol-water. The antioxidant capacity of extract was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and total polyphenol assay. AuNPs were characterized by transmission electron microscopy, X-ray diffraction, UV-Vis and Fourier transform infrared spectroscopy, and X-ray photoelectron spectrometry for functional group determination onto their surface. AuMt (colloids formed by AuNPs and molecules of Mt) exhibit multiple shapes with sizes between 20 and 200 nm. AuMt were tested on methylene blue degradation in homogeneous catalysis adding sodium borohydride. The smallest NPs (AuMt1) have a degradation coefficient of 0.008/s and reach 50% degradation in 190s. Cell viability and cytotoxicity were evaluated in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and a moderate cytotoxic effect at 24 and 48 h was found. However, toxicity does not behave in a dose-dependent manner. Cellular internalization of AuMt on HUVEC cells was analyzed by confocal laser scanning microscopy. For AuMt1, it can be observed that the material is dispersed into the cytoplasm, while in AuMt2, the material is concentrated in the nuclear periphery.

Keywords: Gold, Nanoparticles, Catalysis, Cellular uptake

Introduction

Plant-mediated biosynthesis of nanomaterials is an ecologically friendly method that allows NP synthesis in one-pot process. That is because the same bio-reducing agents of plant extracts act as stabilizing agents for the formed particles with a low rate of toxic compounds [1–3]. In this sense, *Mimosa tenuiflora* (Mt) bark has a high content of condensed tannins that have a structure of four flavonoid units [4], saponins, glucose, alkaloids (*N,N*-dimethyltryptamine), and starch [5–8]. These compounds (condensed tannins) can act as metal ion-reducing agents, but particularly, the flavonoid has been associated with metal complexation [4].

Mt ethanolic extract has been used as an antibacterial agent for gram negatives, gram positives, and yeast [9].

Also, as antiprotozoal (using flavonoids of leaves and flowers of Mt) [10] and on skin regeneration [6]. In addition, it has the potential to heal severe skin ulcers, whose properties were attributed to molecules and polyphenols of Mt bark [11]. Plant extracts show properties like antioxidants and particularly contain polyphenols that are used in green synthesis of metallic NPs such as Au, Ag, Fe, Pt, Pd, Cu, their alloys, and oxides [12, 13]. Optical properties of NP systems, as resonance frequency of surface plasmon resonance (SPR), are dependent of not only nanomaterials' intrinsic characteristics (size, shape, dielectric constant), but also environment properties that surround to NPs, as the solvent where they are dispersed or nature of stabilizing molecules, that cover to NPs. These parameters are decisive to define the peak position of SPR in NP systems [14–16].

On the one hand, AuNPs catalytic properties have been reported in several works, related to organic compounds

* Correspondence: ramonalfonso.iniguez@gmail.com

¹Physics Department, University of Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

degradation such as pesticides, phenolic compounds, and dyes [17–19] and are used in catalytic processes related to environment remediation, for example, as cleaning contaminated water [20]. Several reports have emerged in recent years about AuNPs synthesized with plant extracts as black cardamom [21] and catalytic activity evaluations in dye degradation used in the industry, such as methylene blue (MB) [22], methyl orange [19], or Rhodamine B [23]. However, in the opposite direction, some papers have reported that NPs coated with stabilizing molecules showed poor catalytic activity due to sites available for catalysis on NP surface that was occupied by organic molecules [24, 25]. Also, AuNPs have been used as molecular sensors, such as colorimetric detection of toxic metal ions [7] and theragnostic (therapeutic and diagnostic) applications [26].

Functionalized AuNPs with molecules onto the surface show optical and biological properties associated with composition, thickness, organization, and conformation that define their features [27]. Nanotechnology has various challenges, such as aggregation of AuNPs on bloodstream [28]. AuNPs at concentration less of 20 $\mu\text{g/mL}$ and with a size around 20 nm do not show cytotoxic effects in healthy and cancerous cell lines, and their use has allowed to analyze the interaction between NPs and cells [13, 29, 30]. Then, nanotechnology offers a possibility to interact at the same scale of cellular receptors [31] that allow to learn about cellular processes [32, 33] and antimicrobial properties [34], for example, in oxidative stress which generate a cascade of signaling for different effects, such as cytotoxicity or antioxidant defense response [35]. Further, functionalized AuNPs act as transporter vehicle of drugs, gene, or protein [36] and biomedical applications [37, 38]. Even more, AuNPs ligands as proteins and polymers generate a chemical environment that favors NPs internalization to reach the cytoplasm, nucleus, or keep out over the membrane [39].

In this work, AuNPs were synthesized using a rich polyphenolic Mt bark extract. AuMt cytotoxicity was evaluated in HUVEC cells, and cellular internalization was monitored by confocal microscopy at 24 h. AuMt catalytic activity on MB degradation, in the presence of sodium borohydride (NaBH_4) at room temperature, was evaluated. Our results were compared with respect to similar works of catalysis with AuNPs synthesized by “green” methods.

Materials and Methods

Materials and Chemicals

For AuMt synthesis, 15 g of Mt tree bark was cut into pieces and placed in a 100-mL flask. Seventy milliliters of ethanol (Fermont, 99% pure) and 30 mL of ultrapure water (18 M Ω , Millipore) were added, then it was covered with aluminum and left at room temperature for 15 days. The solution was filtered using Whatman filter paper (8 μm) and later with an acrodisc (0.20 μm). The obtained

solution was used as a reducing agent (Mt extract) for AuMt synthesis. A portion of the filtrate was rotoevaporated and then lyophilized for DPPH and total polyphenol assay and to construct a calibration curve of Mt extract. The concentration of Mt extract was 32.5 mg/mL, determined from a calibration curve. Tetrachloroauric acid (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich 99% pure) was used as a metallic precursor. Concentrations of precursors used in synthesis were 5.3 mM for AuMt1 and 2.6 mM for AuMt2. The reducing agent volume was kept constant (1.6 mL), and the total volume sample was completed to 6 mL with ultrapure water. Additional file 1: Table S1 shows formulations used in AuMt1 and AuMt2 synthesis as well as the pH values for each reactant. The synthesis was performed at 25 °C under laboratory lighting conditions. The protocol used was as follows. In a 50-mL tube, the Mt extract solution is added followed by the ultrapure water, and finally, the gold precursor solution, stirring immediately in the vortex at 3000 rpm for 10 s. The synthesis of the AuMtNPs was visually confirmed within a few minutes by the change in coloration of the mixture. NPs clean process consists of centrifuging of suspension at 14,000 rpm for 1 h, discarding supernatant, adding water, and dispersing by sonication, repeating the process twice. After adding ethanol, AuMt are dispersed again by sonication and centrifuged at 14,000 rpm for 1 h. The supernatant is discarded and precipitated and is dried in an oven at a temperature of 40 °C. Then, the nanocomposite obtained is composed of AuNPs with Mt extract molecules on the surface.

Time-Dependent pH Change of AuMtNP Synthesis

The pH of AuMtNP synthesis was measured as the reaction was carried out. For this, a multi-parameter pH/Conductivity Benchtop Meter (Orion™ VERSA STAR™) was used. The instrument was calibrated at 25 °C using a buffer reference standard solution for calibration at pH = 4.01. A recirculation bath was used to control the temperature of the samples at 25 °C (± 0.1 °C) in all measurements. pH was measured as the reaction was carried out for 180 s immediately after mixing the reagents. The same device was used in pH measurement of reactants.

UV-Vis Spectra, 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH), and Total Polyphenol Assay

A double-beam Perkin-Elmer Lambda 40 UV/Vis spectrometer was used to obtain the extract's UV-Vis spectrum, in a measurement range of 200–400 nm, with a scan rate of 240 nm/min. AuMt SPR was monitored between 250 and 875 nm.

AuMt formation kinetics was determined by measuring the absorbance at 550 nm every second while NP synthesis reaction was developed inside the quartz cell under magneto stirring.

For DPPH assays, all the tests were done by triplicate. Different Mt extract concentrations (25, 12.5, 6.25, and 3.125 µg/mL) were tested. One hundred microliters of ethanol was added to 100 µL of each concentration, in addition to the DPPH solution (300 µM). Subsequently, the samples were incubated for 2 h in the dark before measuring the absorbance at 517 nm. The results were compared with vitamin C and catechins (70 µmol/L), and both molecules were used as controls. For scavenging activity, DPPH radical dissolved on ethanol was used as a blank [40, 41]. The percentage of scavenging activity was computed with Eq. (1).

$$\% \text{Scavenging activity} = [(1 - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

where A_{sample} is the sample absorbance and A_{control} is the blank absorbance. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey multiple comparison tests.

For total polyphenol assay, the same concentrations were used by adding Folin-Ciocalteu at 0.25 N and sodium carbonate at 5% with a 1-h incubation in the absence of light. Absorbance was measured at 750 nm. The results are expressed as gallic acid equivalents [42, 43].

Zeta Potential and DLS Size Determination

Zeta potential (ζ) of NPs was measured with Zetasizer NS (Malvern, PA), and sizes were measured by dynamic light scattering (DLS) of Zetasizer NS (resolution of 0.5 nm). The instrument calculates the ζ by determining the electrophoretic mobility (μ_e) using Henry Eq. (2) [44]:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (2)$$

where ε , η , and $f(ka)$ denote the dielectric constant of the media, viscosity of media, and Henry's function, respectively. Two values are generally used as approximations for the $f(ka)$ determination, either 1.5 or 1.0. The electrophoretic determinations of ζ are the most commonly made in an aqueous solvent and moderate electrolyte concentration. $f(ka)$, in this case, takes the value of 1.5 and is referred to as the classical Smoluchowski approximation, Eq. (3) [45].

$$\mu_e = \varepsilon \frac{\zeta}{\eta} \quad (3)$$

The samples were placed into a U-shaped folded capillary cell for ζ measurements. Each sample was measured at room temperature (25 °C) in triplicate.

Evaluation of NP Stability in Supplemented Culture Medium (s-DMEM)

AuMtNP stability was evaluated in s-DMEM by DLS and ζ . The hydrodynamic diameter ($2R_H$) of AuMt1 and AuMt2 was measured at 37 °C in ultrapure water and s-DMEM at concentrations between 25 and 200 µg/mL. For AuMt1 and AuMt2 in s-DMEM, ζ was measured at 37 °C to establish if the culture media modifies the NP surface charge. Nanoparticles were added to an Eppendorf tube with s-DMEM previously thermalized and stirred in the vortex at 3000 rpm for 30 s. Incubation at 37 °C is kept for 15 min before taking the measurements at the same temperature.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Mt extract and the AuMt FTIR were obtained by a Perkin-Elmer Frontier FTIR using a solid sample. The spectrum was obtained on transmittance mode at a resolution of 2 cm⁻¹, from 4500 to 500 cm⁻¹.

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

XPS experiment was carried out using a Perkin-Elmer (Model PHI 5100, resolution based on the FWHM of the Ag3d5/2 peak 0.80 eV, XR source dual-standard anode (Mg/Al), and 15 kV, 300 W, 20 mA). Survey scan analyses were carried out with a scan rate of 0.5 eV/s. For high-resolution analyses, a scan rate of 0.025 eV/s was used.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

For TEM, 10 µL of the sample was deposited on copper grids covered with a formvar-carbon film (Electron Microscopy Sciences, 300 Mesh). Grids are left to dry for 1 h and placed in a vacuum chamber for 12 h. The electron microscopy equipment is a field emission Jeol 2010 F operated at 200 keV. Energy dispersive X-rays spectroscopy (EDS) is a detector Bruker Quantax 200, peltier cooled, and coupled to TEM system. Interplanar spacings of crystal planes revealed by high-resolution TEM (HRTEM) were determined by micrograph digital analysis (3.0 Gatan Version).

X-ray Diffraction

Data were collected using a Bruker D8 QUEST diffractometer system, equipped with a multilayer mirror monochromator, and a CuK α Microfocus sealed tube ($\lambda = 1.54178$ Å). Frames were collected at $T = 300$ K via scans.

AuMt Cytotoxic Effect

AuMt cytotoxic effect was evaluated in HUVEC cells using 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were grown on Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal bovine serum (GibcoBRL) at 37 °C and 5% of CO₂. HUVEC cells were counted in a Neubauer

chamber, and viability was determined by trypan blue exclusion test (Sigma-Aldrich).

For MTT assay, cells were adjusted to 100,000 cells/mL, and 100 μ L per well was placed in 96-well plates. AuMt1 and AuMt2 were evaluated at concentrations of 200, 100, 50, and 25 μ g/mL. Treated cells were incubated for 24 and 48 h at 37 °C, 5% of CO₂. After the incubation time, the plate was washed with phosphate-buffered saline (PBS) and MTT solution was added and incubated for 4 h. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to dissolve MTT crystals. Absorbance was measured at 570 nm on a multi-mode plate reader (Synergy HTX, BioTek), using the Gen5 software. Cell viability was computed using Eq. (4):

$$\text{Cell viability} = (A \text{ sample}/A \text{ control}) \times 100\% \quad (4)$$

where *A sample* is the absorbance of the sample and *A control* is the absorbance of blank [46, 47].

Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm standard deviations (SD). Significant differences between groups were analyzed by Tukey test, one-way ANOVA as appropriate. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant. Origin Pro 9.1 software is used for data management, statistical analysis, and graph generation. The signs used are **p* < 0.05. The performance with the treatment (AuMt1 and AuMt2) and the control group for 24 and 48 h was compared.

For live/dead assay, HUVEC cells were seeded on glass slides and treated with AuMt1 and AuMt2. After 24 h of incubation slides, these were stained using live/dead viability/cytotoxicity kit (ThermoFisher) under the manufacturer's recommendation. The samples were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM800, Carl Zeiss).

Confocal Laser Scanning Microscopy: Fluorescence of AuMt

Confocal microscopy analysis was carried out in a LSM 800 device (Carl Zeiss, Jena Germany) mounted on an inverted microscope Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Jena Germany). Three lasers of 405, 488, and 640 nm, with a respective maximum power of 5, 10, and 5 mW, were used for the study. The fluorescence was collected using highly sensitive GaAsP detectors. Bright-field images were obtained by a collection of transmitted laser light on Photo Multiplier Tube (PMT). For AuMt fluorescence, live/dead assay, and NP distribution on HUVEC cell study, a Plan-Apochromatic \times 40/0.95 dry objective was used. For 3D reconstruction cells with AuMt, a Plan-Apochromatic \times 63/1.40 oil objective was used.

For AuMt fluorescence characterization, a drop of 20 μ L of NP colloidal dispersion was deposited in a cover glass and dried at room temperature before an analysis by

CLSM. A 640-nm laser was employed as an excitation source at 0.5% of power, and the fluorescence was collected between 650 and 670 nm. Bright field AuMt images were formed using a 488-nm laser (0.2% of power) on transmitted light mode. The fluorescence and bright field were collected on separate tracks.

Cellular Internalization

For AuMt internalization on HUVEC cells, the nucleus was stained with 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) and the actin fibers with anti- β actin antibody coupled to fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) to delimit the cell border. DAPI was excited with a 405 nm laser at 1.0% of power and FITC with a 488-nm laser at 0.20%. Emissions of DAPI and anti- β actin antibody were collected between 410 and 500 nm and 500–700 nm, respectively. AuMt were excited with a 640 nm laser (0.50% power), and emission was collected between 650 and 700 nm.

3D cell-AuMt reconstructions and orthogonal projections were made from 30 images on Z-stack mode (total Z length = 8 μ m), collecting fluorescence from DAPI, FITC, and AuMt as described above. Fluorescent signals were collected on separate tracks for each Z position. For clarity, the FITC signal was omitted on a 3D reconstruction.

A relative comparison of nanoparticle cellular uptake was realized. For this, the mean fluorescence intensity of AuMt1 and AuMt2 in HUVEC cells was determined from confocal images analysis using ImageJ software [48].

Catalysis

Catalytic activity on MB, at a concentration of 3.33×10^{-5} M, was analyzed by UV-Vis spectroscopy. In homogeneous catalysis, 90 μ L of NPs (2 mg/mL) was added directly in the quartz cell that contains MB and 200 μ L of NaBH₄ at a concentration of 100 mM. The sample was homogenized by magnet stirring inside of the spectrophotometer cell. The reaction was carried out at 25 °C.

Results and Discussions

Synthesis

By visual inspection, it was detected that NPs synthesis is very fast in both systems. The most intense color of AuMt1 system shown in the inset of Additional file 1: Figure S1 indicates a higher content of NPs from this synthesis. This is because AuMt1 has a double concentration of metallic precursor compared to AuMt2. In Additional file 1: Table S1, reagents used in nanoparticle synthesis have acidic pH. Additional file 1: Figure S1 shows the changes in pH of the reactions as AuMtNPs syntheses are carried out. Reactions start in an acidic environment (pH < 2.65), and as NPs synthesis develops, acidity grows. This is due to deprotonation of hydroxyl groups present in polyphenolic molecules of Mt extract. In fact, this is the first step of an oxide-reduction process that results in the

transfer of electrons from deprotonated hydroxyl group to Au^{3+} ions. As products of oxide-reduction reaction, Au^{3+} ions are reduced to metal atoms Au^0 and polyphenolic ring that contributes 2 electrons is oxidized. The process is described in the inset of Additional file 1: Figure S1.

UV-Vis Spectra, DPPH, and Total Polyphenol Assays

Mt bark extract UV-Vis spectrum is shown in Fig. 1a, where signal consists in a well-defined band with a maximum in 280 nm and broad of 50 nm. This spectrum is very similar to reported for *Rumex hymenosepalus* root extract, which has a high content of polyphenolic compounds [49]. Determinating the polyphenolic content in Mt bark extract is important because these molecules can contribute significantly as reducing agents in AuNPs synthesis, providing the necessary electrons for reduction of Au^{3+} ion to metallic gold (Au^0). Once NPs are formed, polyphenolic compounds are absorbed on their surface providing stability to nanomaterials.

For DPPH assay, it was observed that for 12.5 mg/L of Mt extract, we obtained a 50% inhibition (L50), alike the values reported for Vitamin C and catechins (46 and 58%, respectively). This indicates that Mt extract possesses an antioxidant capacity very similar to pure compounds used as controls, Fig. 1b where significant differences ($*p < 0.05$) from control values are marked with an asterisk. The value of 425 mg/g obtained from total polyphenols assay indicates that almost half of the extracted mass is equivalent to gallic acid. The high antioxidant capacity and the high polyphenolic content in Mt extract suggest that it can be used as a good reducing and stabilizing agent nanomaterial synthesis within the framework of sustainable chemistry [50, 51].

Characterization

Kinetic of Formation and UV-Vis Spectra AuMt

Figure 2a shows a temporal evolution of absorbance on a SPR peak of AuNPs (550 and 560 nm for AuMt1 and AuMt2, respectively) as nanomaterial synthesis reaction

takes place. Experimental data are fitting with Boltzmann's sigmoidal function [52], where at least three stages of growth are observed. In the first one, absorbance grows slowly at the start of the synthesis reaction when Au^{3+} ions are reduced to Au^0 and form aggregates of a few atoms that join to form small NPs. In the second stage, the small NPs increase their size by autocatalytic growth and absorbance grows in a fast way. In the last stage, in NP recrystallization, absorbance reaches its stationary phase. As can be seen in Fig. 2, a maximum absorbance is reached in 60 s for AuMt1 and 120 s for AuMt2. Interestingly, the first stage of growth is 20 s for AuMt1, while it is almost null (less of 1 s) for AuMt2, which is explained due to the higher proportion of reducing molecules (Mt extract) with respect to the metallic precursor. This favors the fast formation of the nucleus in NPs of AuMt2 respect to AuMt1; nevertheless, the next stage of growth of the NPs is low for AuMt2, and NPs with larger size are obtained. It has been reported that AuNPs synthesis, using maltose and tween80 as stabilizing, shows a growth kinetic with a reaction time very similar for the reported in this work [53]. In another green synthesis report [54], it is pointed out that the lowest proportion of reducing/precursor agents generates smaller size NPs.

Figure 2b shows the characteristic absorption spectra of AuMt in the region comprised of 250–875 nm. SPR for AuMt1 shows a symmetric band with a maximum absorption in 550 nm and broad of 200 nm. AuMt2 plasmon peak suffers a slight red shift localized now in 560 nm with an asymmetric band and a larger width than 300 nm, which is due to the difference in sizes between the two nanomaterials ($d_{\text{AuMt1}} < d_{\text{AuMt2}}$)^{1,2}. A similar behavior has been reported in AuNPs synthesis with sodium citratum as reducing agent, where the red shift and plasmon broadening are attributed to higher oscillation modes that affect the extinction cross section by increasing the NP size [55]. Additionally, both spectra show the absorption band at 280 nm corresponding to

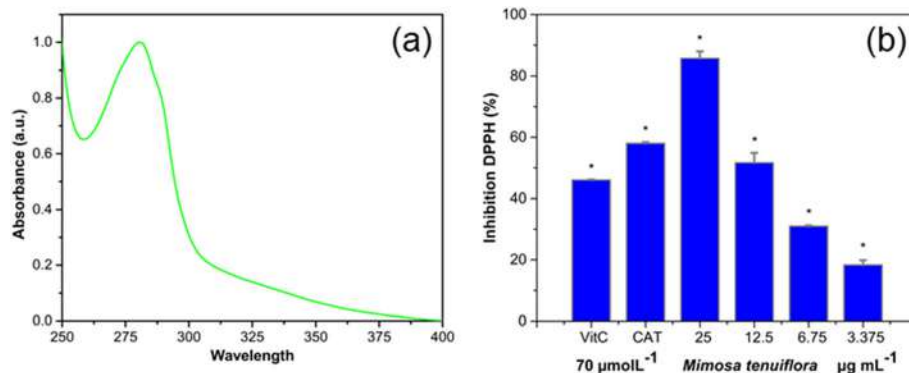


Fig. 1 Characterization of Mt Extract. **a** Mt extract UV-Vis spectrum and **b** DPPH inhibition with one-way ANOVA analysis ($*p < 0.05$)

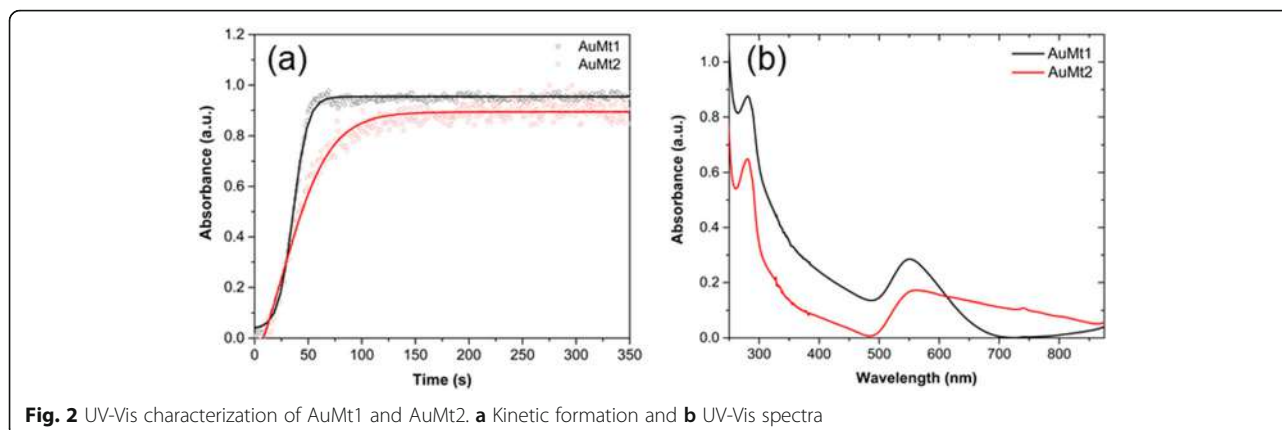


Fig. 2 UV-Vis characterization of AuMt1 and AuMt2. **a** Kinetic formation and **b** UV-Vis spectra

the polyphenolic molecules of the extract, which suggests that Mt extract acts as a stabilizer of the AuMtNPs.

Size, Zeta Potential, and Stability of AuMtNPs

AuMtNP sizes by DLS and Z-potential were tested at different conditions for one concentration (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as shown in Table 1. AuMt1 and AuMt2 shown high negative values (≤ 30 mV) in water, which favor electrostatic stability of both nanoparticle systems. According to Qu et al. [56], ζ value gradually increases with NP size; in our case, AuMt1 has a smaller size than AuMt2 in water, a size which is controlled by NP synthesis. These size values match with NP ζ values, where the higher ζ corresponds to NP higher size. Zeta potentials (ζ) of AuMtNPs dispersed in s-DMEM show less negative values with respect to those obtained in ultrapure water (Table 1). This reduction can be attributed to DMEM present cations and FBS present proteins that cover AuMtNP surfaces which cause a decrease in electrostatic interactions. Despite this ζ reduction, the value remains close to -25 mV for both systems which indicate that nanoparticles preserve their electrostatic stability after s-DMEM incubation [57]. Additionally, Table 1 shows the results obtained by DLS for AuMtNP hydrodynamic diameters ($2R_H$) measured at 37 $^\circ\text{C}$ in ultrapure water and culture media. In s-DMEM, the size of both systems increased due to protein adsorption on the nanoparticle surface [58]. For AuMt1, the growth of $2R_H$ due to

protein corona is 33.8 nm and for AuMt2 is 42.9 nm. It is expected that the greater the nanoparticle size will be greater than the surface for protein absorption [59]. This could explain the slightly smaller value on ζ for AuMt2 compared to AuMt1 in s-DMEM. For AuMt1 and AuMt2, the interaction with s-DMEM proteins is due to the extract molecules that are attached to the nanoparticle surface. These molecules differ slightly between AuMt1 and AuMt2, as shown on XPS results. We also measured the pH of solutions in the same concentration range. It was found that there is not a change in pH and whose mean value was around of 7.5 for both AuMt in ultrapure water and 7.2 in s-DMEM (Table 1).

Additional file 1: Figure S2 shows AuMtNP hydrodynamic diameters when dispersed in ultrapure water and s-DMEM at 37 $^\circ\text{C}$, in a concentration range between 25 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For each studied system, the hydrodynamic diameter does not change with nanoparticle concentration, and only for, AuMt2 s-DMEM at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the particle size increases with respect to the lowest evaluated concentration, which may indicate NP aggregation processes at these concentrations [32].

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectrum, shown in Fig. 3, corresponds to Mt extract, AuMt1, and AuMt2. The characteristic broad bands centered around 3250 cm^{-1} are associated with phenolic OH from tannins and flavonoids mainly. Peaks at 1594 cm^{-1} correspond to N-H bending vibration, at

Table 1 Size (Pdl), zeta potential, and pH

	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)	pH
AuMt1 in water (25 $^\circ\text{C}$)	117.3 \pm 1.07	0.195	-35.3 ± 1.12	7.56 \pm 0.16
AuMt1 in water (37 $^\circ\text{C}$)	145.1 \pm 8.67	0.389	–	–
AuMt1 DMEM (37 $^\circ\text{C}$)	178.9 \pm 7.69	0.288	-26.5 ± 2.19	7.2 \pm 0.51
AuMt2 in water (25 $^\circ\text{C}$)	314.13 \pm 3.00	0.172	-42.66 ± 1.08	7.51 \pm 0.35
AuMt2 in water (37 $^\circ\text{C}$)	330.7 \pm 11.4	0.194	–	–
AuMt2 DMEM (37 $^\circ\text{C}$)	373.5 \pm 9.85	0.258	-24.8 ± 2.37	7.18 \pm 0.43

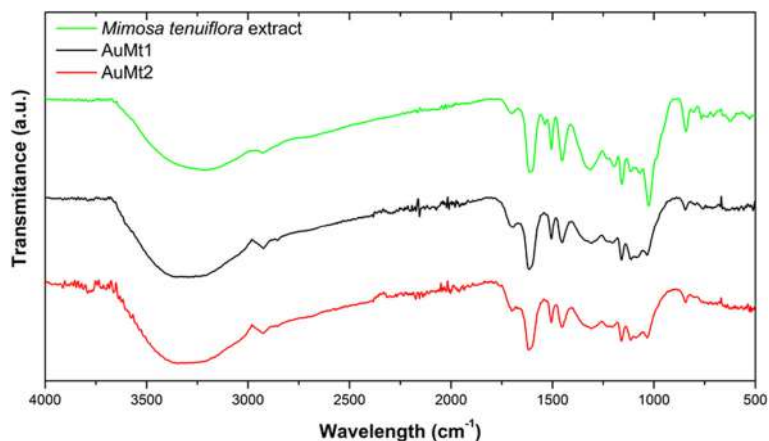


Fig. 3 FTIR spectra. Mt extract (green), AuMt1 (black) and AuMt2 (red)

1705 cm^{-1} to ketone acyclic stretch and region between 1000 and 1300 cm^{-1} to C–O stretch. Peaks in the range from 1600 to 500 cm^{-1} are identified with polyphenols, signals at 1235 and 1160 cm^{-1} are related with aromatic C–O bond stretching, and at 1020 cm^{-1} to aliphatic C–O band stretching and at 1235 cm^{-1} are specifically related with the characteristic of the cyclic nature of ether. These signals can be associated to the most abundant compounds in Mt extract as Mimosa tannin, flavone sakuranetin, triterpenoids saponins, chalcones, and the *N,N*-dimethyltryptamine alkaloid (Additional file 1: Figure S3). The samples AuMt1 and AuMt2 show the same characteristic peaks in the region of polyphenols confirming that NPs are stabilized by Mt extract molecules [60]. We observe a change of 1331

cm^{-1} in the width band and a decrease in peak intensity for the AuMt1 and AuMt2 corresponds with the bond between AuNPs and C–H group of polyphenols; 1723 cm^{-1} is shifted by oxidation of polyphenolic into carboxylic compounds during the reduction of Au^{3+} to Au^0 [51, 61, 62].

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

In the XPS survey scan analysis for AuMt1 and AuMt2, the samples have clearly shown the presence of oxygen (O 1s), carbon (C 1s) and gold (Au 4f), whose peaks are centered around of 532, 284, and 85 eV, respectively, as shown in Fig. 4a, b. High-resolution XPS experiments were made to establishing a relative abundance of different functional groups of molecules that coat AuNP surfaces. Au4f high-

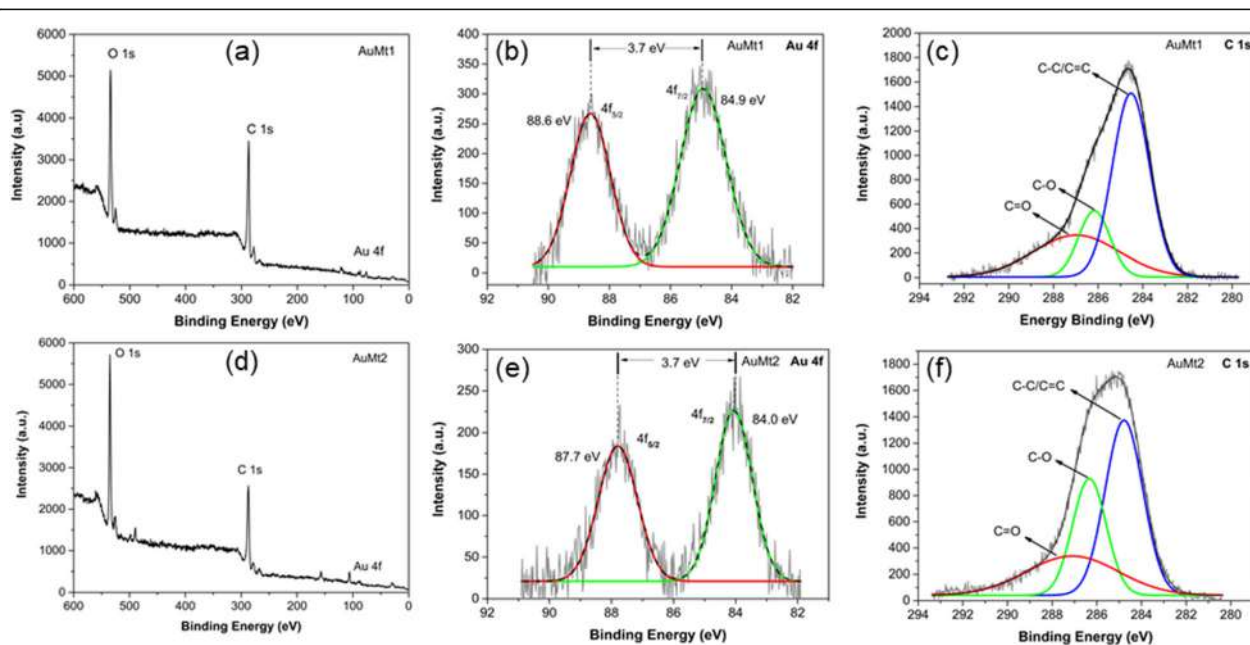


Fig. 4 XPS spectra of AuMt1 and AuMt2. **a, d** Survey spectra, **b, e** Au4f high resolution, and **c, f** C1s high resolution

resolution XPS spectra for AuMt1 and AuMt2 consist of two symmetric peaks separated by 3.7 eV (Fig. 4b, e). Peaks associated with $4f_{5/2}$ spin-orbital coupling are located on binding energy (BE) of 88.6 and 87.7 eV for AuMt1 and AuMt2, respectively. For $4f_{7/2}$, spin-orbital coupling peaks are located on 84.9 and 84.0 eV. The link of intensities ($I_{4f_{7/2}} > I_{4f_{5/2}}$) and location and separation ($\Delta BE = 3.7$ eV) between peaks confirm that gold ions (Au^{3+}) are reduced completely to metallic gold Au^0 [63]. $Au4f$ signals, for AuMt1, are slightly shifted (~ 0.9 eV) at higher energies with respect to sample AuMt2. This can be explained in terms of NP size differences between samples. AuMt1 has a half population of NPs with size less to 40 nm, while AuMt2 NPs have a mean diameter of 150 nm, determined by TEM. Peak shift for $Au4f$ signals, due to the presence of small NPs, has been reported by other authors who relate the $Au4f$ BE increase with decreasing NP size [64, 65]. Also, the shift effect could be due to the interaction of functional groups capped on surfaces of AuNPs [66]. In Fig. 4c, f, the high-resolution XPS spectra of C1s are shown for AuMt1 and AuMt2. Spectra were deconvoluted by 3 Gaussian bands associated with C=O, C–O, and C–C or C=C. For AuMt1, peaks are centered on 286.9, 286.1, and 284.5 eV, for AuMt2 on 287.0, 286.3, and 284.7 eV, respectively. Comparing the experimental XPS curves for C 1s, we see appreciable differences between AuMt1 and AuMt2. The main difference comes from a significant decrease in AuMt1 of the signal associated with C–O group. Comparing the percentage contributions of each group, obtained from the deconvolutions (Additional file 1: Table S2), we see that in AuMt2 contribution of C–O signal is 27.8% while in AuMt1 is 16.6%. This difference can be explained in terms of the oxide-reduction reaction that gives rise to

the process of AuNP formation. The synthesis of AuMt1 is added twice the metal precursor ($HAuCl_4$ is 0.01 M) than in synthesis of AuMt2. In both cases, the same amount of extract is used as a reducing agent, so in AuMt1, more hydroxyl groups (–C–OH) are consumed to reduce a greater number of Au^{3+} ions. Thus, a decrease of C–O signal in AuMt1 confirms that hydroxyl groups participate in the synthesis reaction. High-resolution XPS of O 1s revealed that carbonyl C=O is the most abundant group (Additional file 1: Figure S4 and Table S2). In addition, the content of the C=O group is higher in the AuMt1 sample, which confirms what was previously discussed.

XPS and FTIR indicate that AuMtNPs interact mainly with carbonyl groups (ketones) in addition to hydroxyl groups of Mimosa tannins, saponins, and other molecules that participate in the reduction of Au^{3+} to Au^0 and stabilization of AuMtNPs [63, 67, 68].

Transmission Electron Microscopy

AuMt1 TEM micrographs are shown in Fig. 5a, b and AuMt2 in Fig. 5d, e showing products' shape distribution. AuMt1 has the biggest diversity in shapes. AuMt shape is determined by the relationship between the variation of metal precursor concentration and Mt extract at a fixed concentration. In this case, NPs were observed without cleaning the extract to observe the interaction that forms around the AuMt. As observed in the micrographs, an extract is placed on the surface; however, NPs are kept dispersed and no aggregation is shown. Figure 5c, f show size distribution for each sample, and AuMt1 have an average size dispersion of 40 nm and AuMt2 of 150 nm.

In Fig. 6a, AuMt TEM micrographs were also analyzed by EDS (Fig. 6b), which showed Au presence. Other

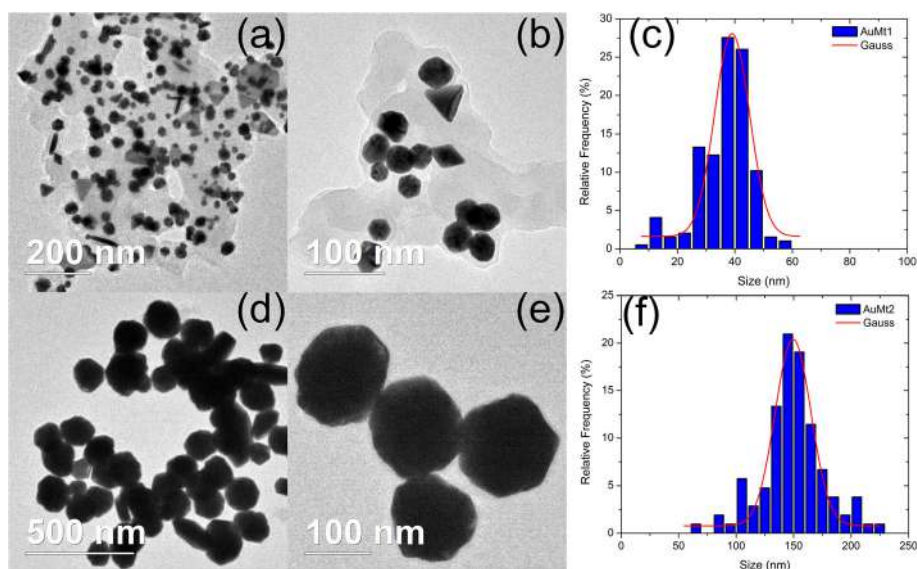


Fig. 5 Size distributions by TEM. **a, b, c** AuMt1 and **d, e, f** AuMt2

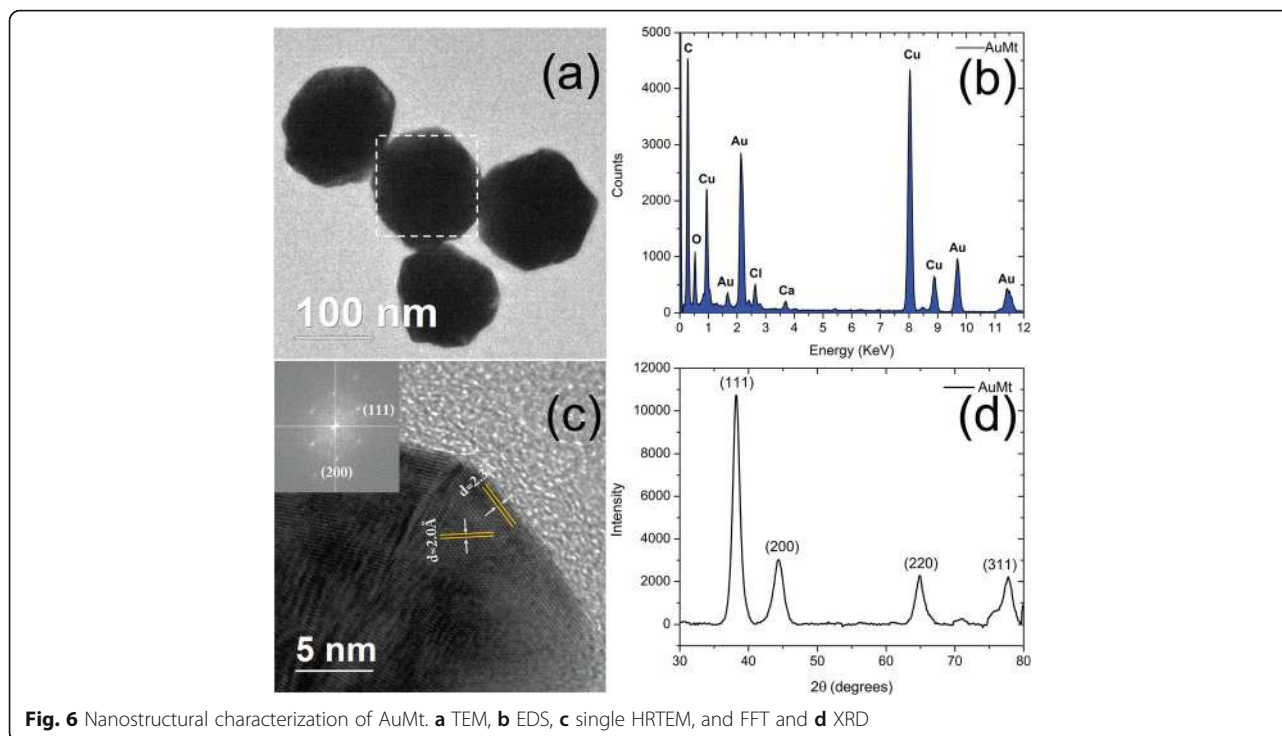


Fig. 6 Nanostructural characterization of AuMt. **a** TEM, **b** EDS, **c** single HRTEM, and FFT and **d** XRD

chemical elements such as Cl, O, and Ca, on EDS spectrum, come from the extract that surrounds NPs. According to the crystallographic tab (JCPDS file: 04-0784), the obtained distances between 2.35 and 2.03 Å (Fig. 6c) correspond to Au crystalline planes (111) and (200).

X-ray Diffraction (XRD)

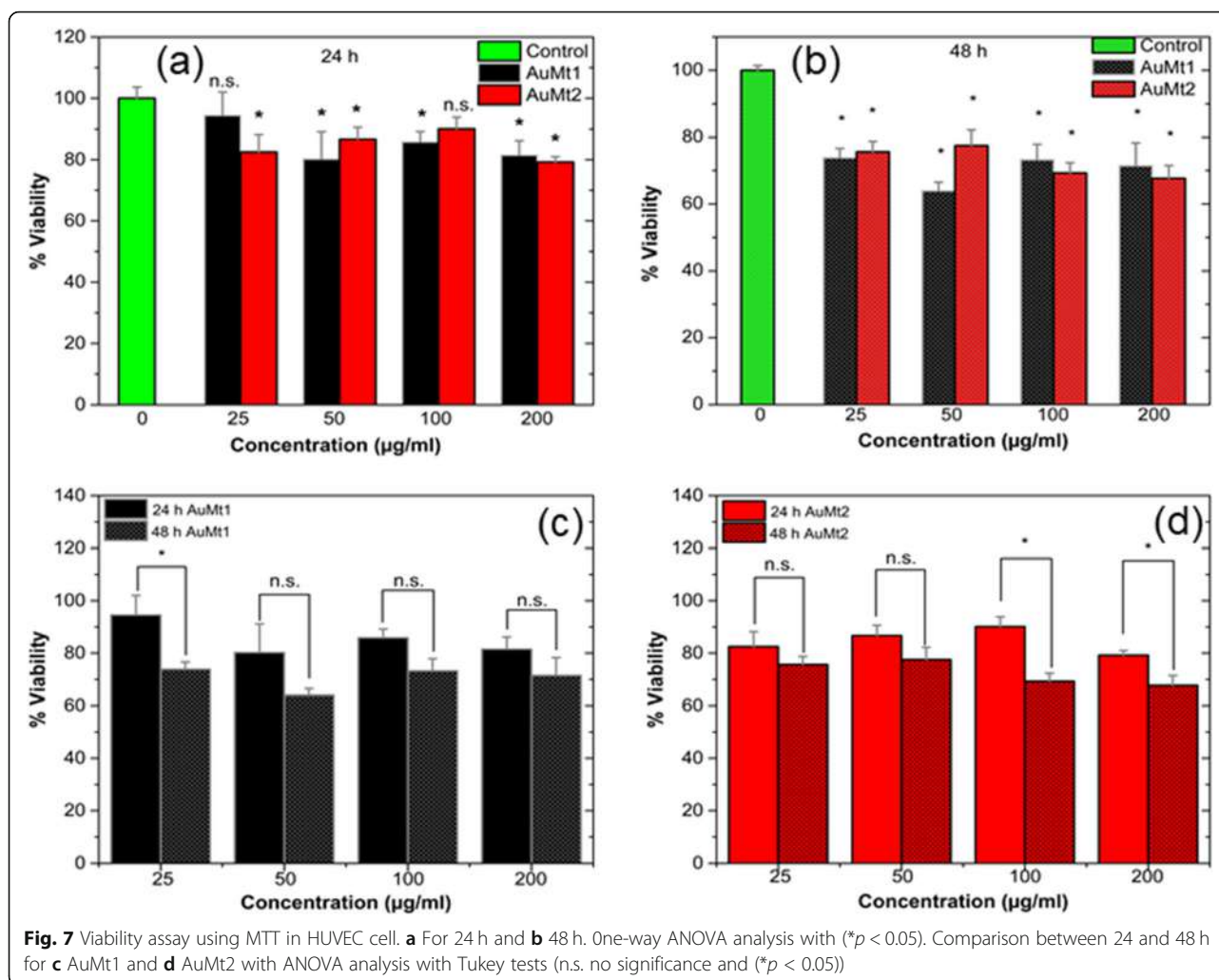
Figure 6d shows the characteristic AuMt XRD diffraction peak at 2θ , which are in 38.17, 44.37, 64.81, and 77.66° corresponding with the planes (111), (200), (220), and (311), respectively; these planes correspond with the face-centered cubic Au (space group $Fm\bar{3}m$, JCPDS File No. 89-3722). High Score Plus and Origin software were used for the analysis [69].

Biological Tests

Cytotoxicity by MTT and Live/Dead Assay

To evaluate AuMt1 and AuMt2 toxicity, tests were performed on HUVEC cells using MTT. Four concentrations and two times for both materials were evaluated. In Fig. 7a, it is observed that at 24 h for AuMt1, cell viability decreases between 10 and 20%, only in concentrations higher than 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For AuMt2, a similar effect is obtained in cell viability; however, the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seems to have no effect on these tests. In Fig. 7b, MTT tests at 48 h for AuMt1 and AuMt2 are shown. For AuMt1, it is easy to notice that concentration with the greatest effect is 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, where the viability drops almost 30% compared to the control. The concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seems to be the concentration with

the highest toxic effect; however, when the obtained data were analyzed, it is found that there is no significant difference between the obtained data on 24 and 48 h, a similar result obtained for 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 7c. For AuMt2, a toxic effect between 20 and 30% is observed only on 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ show no significant difference, compared to the observed effect at 24 h, Fig. 7d. This seems to correlate with AuMt2 size growth in s-DMEM (Additional file 1: Figure S2) where at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, they begin to aggregate. In the work published by Chandran et al. [70], they used gold nanoparticles coated with branched polyethyleneimine (BPEI), lipolic acid (LA), and polyethylene glycol (PEG), where they see an important toxicity in HUVEC cells by nanoparticles coated with BPEI, which have sizes of 40 and 80 nm, where viability is between 20 and 30%. When these particles are covered with human serum proteins, it is found that toxicity decreases; this is due to the corona effect. Recently, Zhaleh et al. [71] have reported the biogenic synthesis of 40-nm gold nanoparticles using leaf extracts from *Gundelia tournefortii* L. plant. Interestingly and in contrast to our results, the authors indicate that MTT cell viability tests for these particles in HUVEC, the cell viability was 95% at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; however, they do not establish if the low cytotoxicity is due to the fact that there is no material internalization or if the particles are harmless due to protein corona. In this sense, bioreductive compounds present in *Gundelia tournefortii* L extract are different from those reported for *Mimosa tenuiflora* extract (Additional file 1: Figure S3). Thus, the interactions



of these two nanoparticle systems with proteins present in FBS are very different, which may explain the differences in cytotoxic responses.

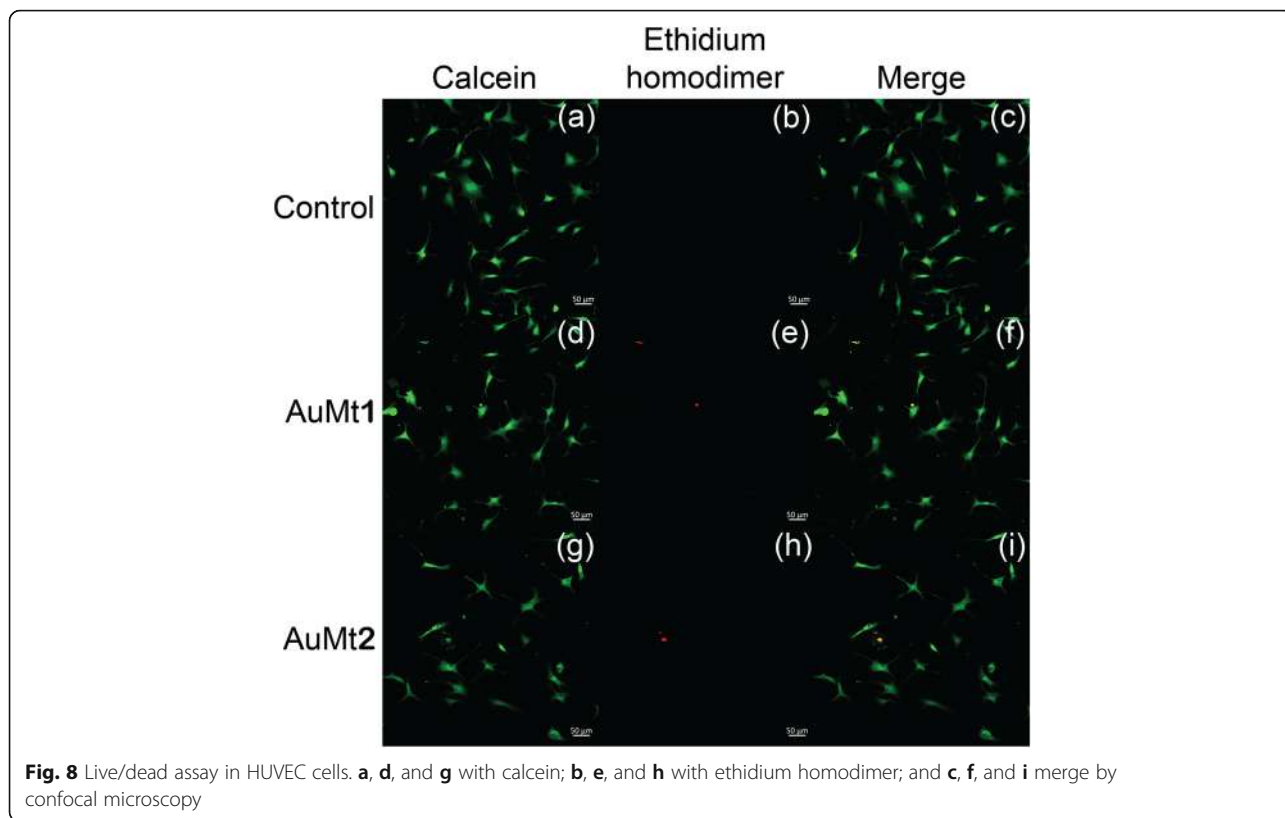
As mentioned above, AuMt1 at a 50- $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration shows the highest toxicity and cellular uptake. We believe that toxicity may be due to the fact that the nanomaterial has a low affinity to s-DMEM proteins, since it has only 16.6% of hydroxyl groups on the surface to promote hydrogen bonding with S-DMEM proteins. The fact that the material toxicity decreases as AuMt1 concentration increases may be due to a cellular detoxification response, like an exocytosis caused by high intracellular content of gold [70]. For AuMt2, the toxicity effect at 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ may be due to nanomaterial agglomeration, which could be attaching to the membrane causing adverse effects for the cells; however, more experiments are required to confirm this hypothesis.

Only one concentration (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was chosen to be evaluated by live/dead fluorescent dye; this is due to the purpose of confirming the MTT results and later analyzing

the metallic NP internalization in HUVEC cells, avoiding a field saturation by NPs. When cells were stained with live/dead fluorescent dye kit, it was found that a large part of the cell population favorably marked for calcein and just a few for ethidium homodimer, indicating that cell culture is viable, as shown in Fig. 8.

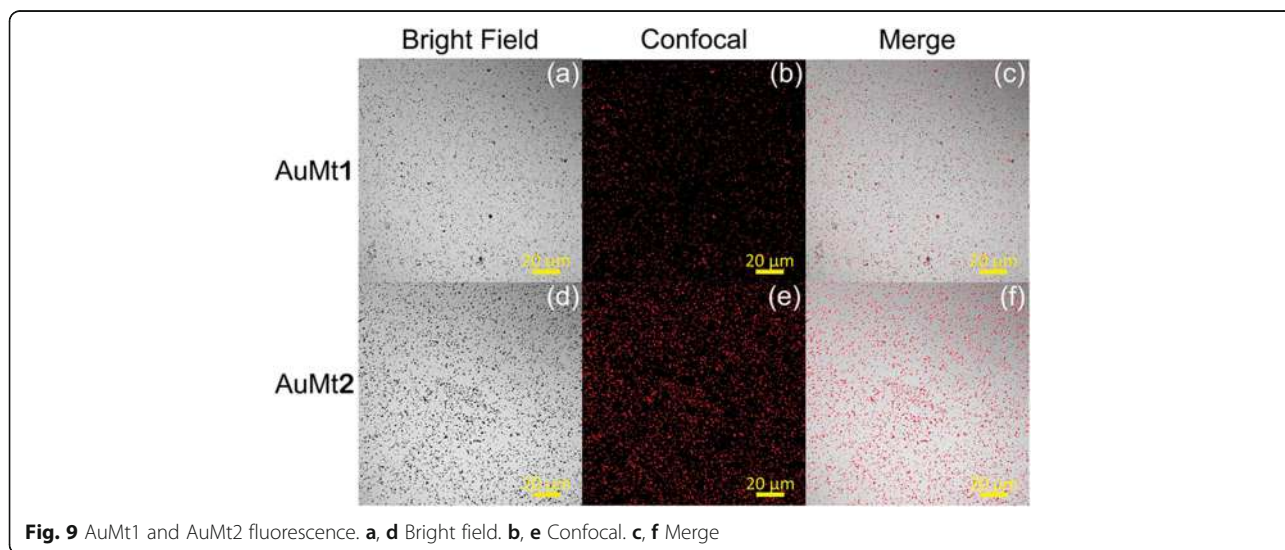
Confocal Laser Scanning Microscopy: Fluorescence of AuMt

In Fig. 9a, d are shown micrographs of AuMt1 and AuMt2 in bright field and in Fig. 9b, e, their corresponding fluorescence, captured by confocal microscopy. Red fluorescence of AuMt (collected emission 650–700 nm) was excited employing 640 nm diode laser, and a mayor size of NPs can be appreciated in AuMt2 sample than AuMt1. In the merge images in Fig. 9c, f, it can be observed how the luminescence comes exclusively from the dark points associated with the NPs. This indicates that the cleaning process effectively removed the extract that is not complexed to the nanomaterial, so there is no background emission. It is interesting to observe that an



intense fluorescence of the NPs captured by the confocal system is achieved at a very low excitation power of the laser (below 0.5 mW). So, this NPs system can be fluorescently traced efficiently in cellular systems with little risk of phototoxicity. Some authors have reported fluorescent emission about 610 nm, suggesting intrinsic Au fluorescence [72, 73]. AuNPs emission is related to the core size confinement effect that generates discreet

electronic states [74]. However, in our case, the metal surface is covered with flavonoids, which show fluorescence, and when complexing with AuNPs, the fluorescence of both is enhanced. Different authors have reported that fluorescence is largely enhanced by charge transfer from the surface ligands to the metal core via S–Au bonds [75]. It has also been reported that ligands (thiol molecules, DNA oligonucleotides, dendrimers, polymers,



peptides, and proteins) affect AuNPs optical and electronic properties since its fluorescent properties can be significantly affected by their surface chemistry [76].

Cellular Internalization

Cells were also analyzed, by confocal microscopy, after 24 h incubation, with AuMt1 and AuMt2 at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The nucleus is shown in blue color using DAPI Fig. 10a, and the cytoskeleton structure was stained with anti-beta actin in green color Fig. 10b and merge Fig. 10c. The observed micrographs were obtained through 3 different channels on separate tracks, where the excitation wavelengths were 405, 488, and 640 nm for DAPI, anti-beta actin, and AuMt, respectively.

As previously described, cells were also analyzed by confocal microscopy, for AuMt1 and AuMt2 internalization, at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Confocal micrographs show that AuMt are internalized in HUVEC cells cytosolic space, and many of these particles are surrounding the nucleus, without being internalized in it. When not observing particles in the nucleus, a more meticulous analysis was carried out, by cell orthogonal projection and a 3-D reconstruction. Observing the micrographs of both reconstructions, it is possible to notice that AuMt is distributed differentially. In Fig. 11a, b for AuMt1, it can be observed that a material is dispersed in the cytoplasm, while in AuMt2, the material is concentrated in the nuclear periphery, as shown in Fig. 11c, d. We were not able to find NPs in the nucleus, and this

suggests that the nanomaterial has little or no genotoxic potential, since it has no way of interacting with nuclear DNA, which is a quality for a nanocarrier. Efficient cellular uptake depends on NP size, shape, charge, and coating, the parameters that can affect their interactions with cell proteins. The fact that polyphenolic compounds are found on AuMt surface could facilitate the nanomaterial internalization, which would make it a candidate as a possible pharmacological nanocarrier [77–79].

The obtained results for an AuMtNP cellular uptake in HUVEC by a confocal microscopy at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suggests that AuMt1 interacts with the cells in a greater quantity than AuMt2 in a 3:1 ratio, as seen in Additional file 1: Figures S5–S7. If we consider that protein corona in AuMt1 is 9.1 nm smaller than in AuMt2, we can suggest that AuMt1-efficient internalization by HUVEC cells is given by a combination of factors such as AuMt1 smaller size, the highest absolute value of z potential and the lower thickness of protein corona. This indicates a poor protein coverage that allows partial exposure of the nanoparticle surface, which is rich in extract molecules. Therefore, nanoparticles can interact by means of extract molecules with surface-specific membrane receptors that facilitate the internalization of AuMt1.

Catalytic Tests

Catalysis

Analysis of catalytic reaction was realized to calculate the degradation percentage (%D) using the Eq. (5):

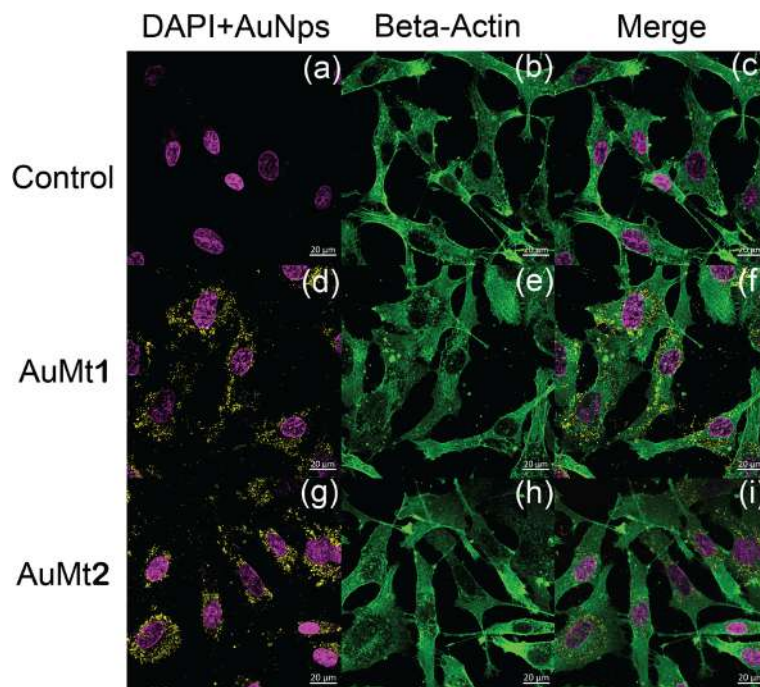
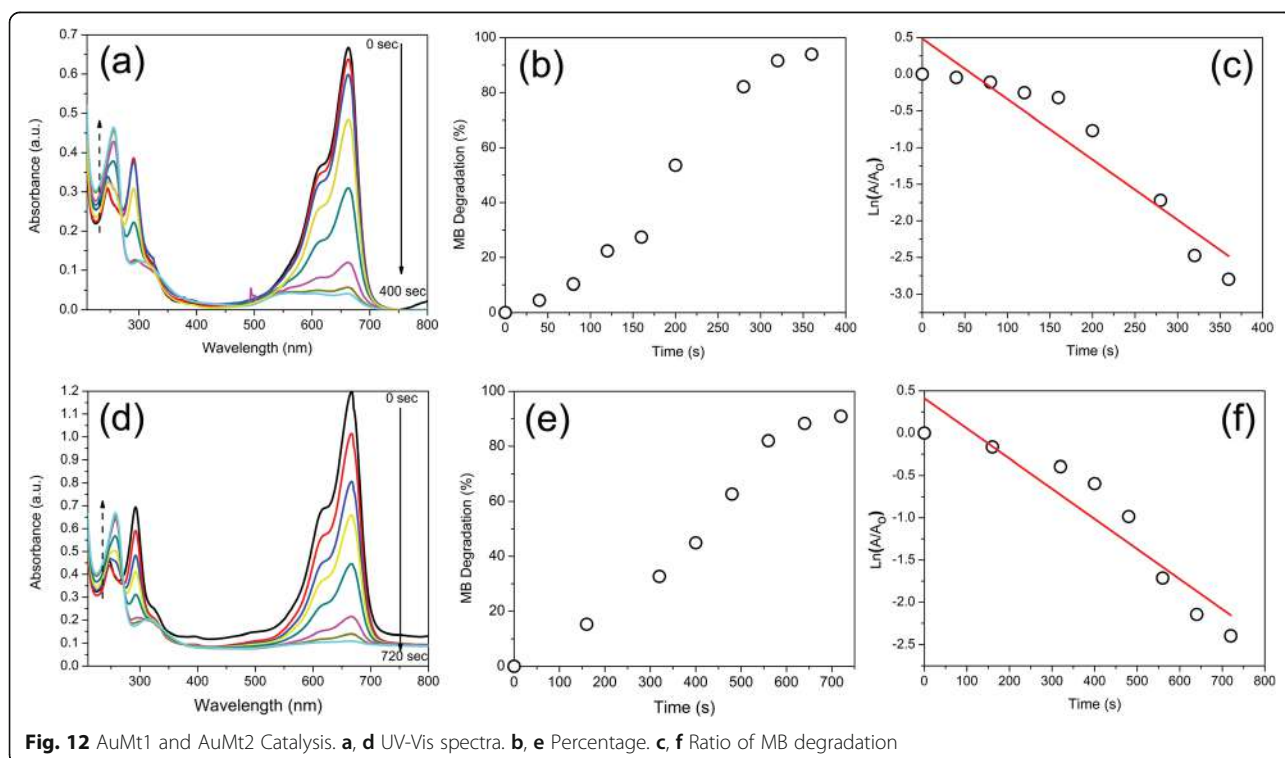
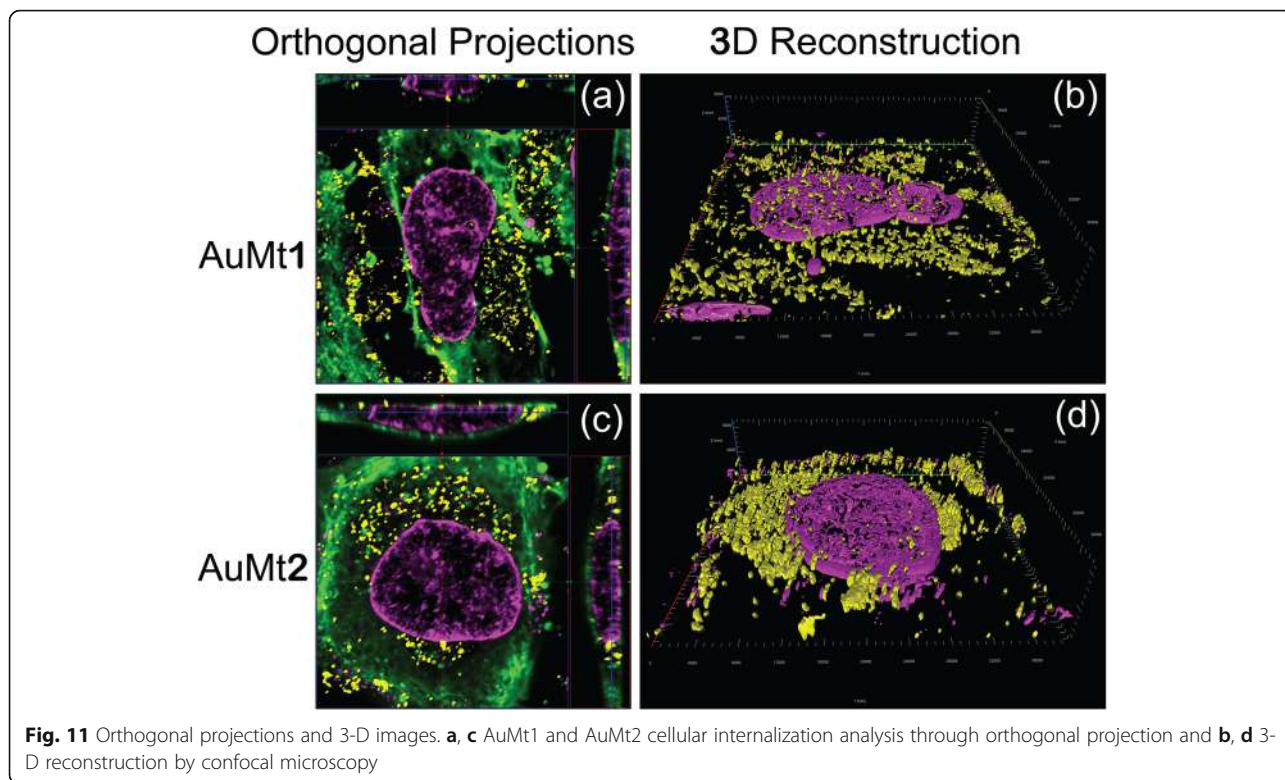


Fig. 10 AuMt1 and AuMt2 cellular internalization. **a, d,** and **g** with DAPI; **b, e,** and **h** with beta-actin; and **c, f,** and **i** merge by confocal microscopy



$$\%D = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

using the A_0 absorbance at $t = 0$ and A is the absorbance at time t . Langmuir-Hinshelwood equation was used to calculate the slope of the regression plot $\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)$ versus irradiation time [80], which is expressed in Eq. (6) and K is the first-order rate constant of the degradation ratio:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = Kt \quad (6)$$

For the analysis of catalytic activity on MB degradation, the absorbance at 660 nm was monitored. Figure 12 shows the AuMt1 and AuMt2 catalytic activity, where a decrease on maximum absorption of MB is observed as time progresses Fig. 12a, d. MB degradation and its conversion to leucomethylene is confirmed by progressive decreases of the absorbance at 292, 614, and 660 nm correspond to MB and by the increase in time of the absorbance at 256 nm associated with leucomethylene. Homogeneous catalysis reaches a 50% MB degradation at 190 s Fig. 12b, while the degradation ratio K for the total process is 8.24×10^{-3} s to AuMt1 Fig. 11c. AuMt2 reaches a 50% of MB degradation in 400 s, Fig. 12e, and K takes the value of 3.54×10^{-3} /s, Fig. 12f.

On this way, AuMt1 have a more efficient response than AuMt2. We observed a size-dependent effect (AuMt) in degradation ratio [81], and a total surface area of NPs is inversely proportional to the NP size [37]. Table 2 shows a comparison between different green syntheses of AuNPs and their K obtained in size function.

Conclusions

In this work, we show for the first time that the extracts of bark of *Mimosa tenuiflora* allow the production at room temperature of gold nanoparticles by means of one-pot synthesis. AuNP sizes are easily controlled by regulating a metal precursor/reducing an extract ratio. It was observed that AuMt1 and AuMt2 cellular uptakes generate a moderate cytotoxic effect at 24 and 48 h post

Table 2 Comparison of K for degradation of MB using AuNPs as a size function

Reducing and stabilizing agent	Sizes (nm)	Rate constant K (1/min)	Reference
Kashayan	15 to 50	0.66801	[82]
		0.33055	
		0.1318	
Pogestemon benghalensis	10 to 50	0.1758	[29]
Salmalia malabárica gum	12	0.241	[83]
<i>Mimosa tenuiflora</i>	40 and 150	0.4944	
		0.2124	

exposition. However, toxicity does not behave in a dose-dependent manner, which suggests different action mechanisms for AuMt1 and AuMt2. XPS and FTIR indicate that AuMtNPs interact mainly with carbonyl groups (ketones) in addition to hydroxyl groups of Mimosa tannins, saponins, and other molecules that participate in the reduction of Au^{3+} to Au^0 and stabilization of nanomaterials. Polyphenols adsorbed on AuMtNPs facilitate nanoparticle internalization. AuMt2 were located near the nuclear periphery, but for AuMt1, it was observed that nanoparticles distribute on the whole cell and present a 3 fold uptake in comparison to AuMt2. Due to the fluorescence property at low excitation power and a high cellular uptake, AuMtNPs synthesized with Mt bark extracts are candidates for its implementation as drug nanocarriers and fluorescent probes in cells. However, other strategies must be addressed, in order to reduce the nanomaterial toxicity. Finally, it was observed that AuMtNPs showed a relevant catalytic activity on MB degradation using NaBH_4 as a reducing agent.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3158-9>.

Additional file 1: Table S1. Formulations used in AuMt1 and AuMt2 synthesis. **Figure S1.** Time-dependent pH change of AuMtNPs synthesis. The inset shows mechanism for the reduction of gold ions into Au^0 in presence of polyphenolics groups. **Figure S2.** DLS of AuMt1 and AuMt2 in water and sDMEM at 37 °C. **Figure S3.** Main reported compounds of *Mimosa tenuiflora*. **Figure S4.** Deconvolution signal of XPS O 1s of AuMt1 and AuMt2. **Table S2.** XPS Peak fitting gaussian parameters. **Figure S5.** Region of Interest (ROI) of AuMt1 in HUVEC for Uptake NPs in cells. **Figure S6.** ROI of AuMt2 in HUVEC for Uptake NPs in cells. **Figure S7.** Fluorescence Intensity for AuMt1 and AuMt2 in HUVEC cells obtained for confocal microscopy.

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; AuMt: Colloids formed by AuNPs and molecules of Mt; AuNPs: Gold nanoparticles; CLSM: Confocal laser scanning microscopy; DLS: Dynamic light scattering; DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO: Dimethyl sulfoxide; DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; EDS: Energy dispersive X-rays spectroscopy; FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; HAuCl_4 : Tetracloroauric acid; HRTEM: High-resolution TEM; HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells; MB: Methylene blue; Mt: *Mimosa tenuiflora*; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NaBH_4 : Sodium borohydride; PBS: Phosphate-buffered saline; Pdl: Polydispersity index; PMT: Photomultiplier tube; ROI: Region of interest; SD: Standard deviations; SPR: Surface plasmon resonance; TEM: Transmission electron microscopy; UV-Vis: Ultraviolet-visible; XPS: X-ray photoelectron spectroscopy; XRD: X-ray diffraction

Acknowledgements

Authors would like to thank Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión and Laboratorio de Biomateriales of the University of Sonora.

Authors' Contributions

RIP contributed to the formal analysis. ERL, BER, AMH, REN, CRB, ELR, RLE, and RIP contributed to the investigation. REN contributed to the methodology section of the study. ERL, CRB, and RIP contributed to the writing—original manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Authors would like to thank CONACYT Mexico for grant INFR-2014-01-225455 to acquire the X-ray single crystal diffractometer Bruker D8 QUEST used in this work. AMH would like to thank Conacyt for Post-Doctoral Fellowship (2018-000005-01NACV-01367).

Availability of Data and Materials

All datasets are presented in the main paper.

Ethics Approval and Consent to Participate

This work complies with the ethical standard.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Physics Department, University of Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico. ²Polymer and Material Department, University of Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico. ³Chemical Engineering and Metallurgy Department, University of Sonora, Rosales and Transversal, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico.

Received: 11 March 2019 Accepted: 23 September 2019

Published online: 26 October 2019

References

- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S (2016) A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J Adv Res* 7(1):17–28
- Prasad R (2014) Synthesis of silver nanoparticles in photosynthetic plants. *J Nanopart* 2014:1–8
- Govindarajan M, AlQahtani FS, AlShebly MM, Benelli G (2017) One-pot and eco-friendly synthesis of silver nanocrystals using *Adiantum raddianum*: toxicity against mosquito vectors of medical and veterinary importance. *J Appl Biomed* 15(2):87–95
- La Torre A, Caradonia F, Gianferro M, Molinu MG, Battaglia V (2014) Activity of natural products against some phytopathogenic fungi. *Commun Agric Appl Biol Sci* 79(3):439–449
- Martel-Estrada SA, Olivas-Armendáriz I, Santos-Rodríguez E, Martínez-Pérez CA, García-Casillas PE, Hernández-Paz J, Rodríguez-González CA, Chapa-González C (2014) Evaluation of in vitro bioactivity of Chitosan/*Mimosa tenuiflora* composites. *Mat Lett* 119:146–149
- Valencia-Gómez LE, Martel-Estrada SA, Vargas-Requena C, Rivera-Armenta JL, Alba-Baena N, Rodríguez-González C, Olivas-Armendáriz I (2016) Chitosan/*Mimosa tenuiflora* films as potential cellular patch for skin regeneration. *Int J Biol Macromol* 93:1217–1225
- Priyadarshini E, Pradhan N (2017) Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: a review. *Sens Actuator B Chem* 238:888–902
- Souza RSOD, Albuquerque UPD, Monteiro JM, Amorim ELCD (2008) *Jurema-Preta* (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Braz Arch Biol Technol* 51(5):937–947
- de Morais Leite SC, Medeiros CASI, Maia PCCGS, Magalhães MIS, Freitas FOR, Pessôa HDLF, Nogueira TBSS, de Morais AMB, Mazzaro VDM, Brustein VP, de Almeida Filho GG (2015) Antibacterial and hemolytic activities of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir.(Mimosoidea). *Afr J Microbiol Res* 9(42):2166–2171
- Bautista E, Calzada F, Ortega A, Yépez-Mulia L (2011) Antiprotozoal activity of flavonoids isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). *J Mex Chem Soc* 55(4):251–253
- Jiang Y, Massiot G, Lavaud C, Teulon JM, Guéchet C, Haag-Berrurier M, Anton R (1991) Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*. *Phytochem* 30(7):2357–2360
- Kharisova OV, Dias HR, Kharisov BI, Pérez BO, Pérez VMJ (2013) The greener synthesis of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 31(4):240–248
- Hanan N, Chiu H, Ramachandran M, Tung W, Mohamad Zain N, Yahaya N, Lim V (2018) Cytotoxicity of plant-mediated synthesis of metallic nanoparticles: a systematic review. *Int J Mol Sci* 19(6):1725
- Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Marago OM, Iati MA (2017) Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J Phys: Condens Matter* 29(20):203002
- Ogarev VA, Rudoi VM, Dement'eva OV (2018) Gold nanoparticles: synthesis, optical properties, and application. *Inorganic Materials: Appl Res* 9(1):134–140
- Ghosh SK, Pal T (2007) Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. *Chem Rev* 107(11):4797–4862
- Pattanayak S, Chakraborty S, Biswas S, Chattopadhyay D, Chakraborty M (2018) Degradation of methyl parathion, a common pesticide and fluorescence quenching of Rhodamine B, a carcinogen using β -D-glucan stabilized gold nanoparticles. *J Saudi Chem Soc* 22(8):937–948
- Anand K, Gengan RM, Phulukdaree A, Chuturgoon A (2015) Agroforestry waste *Moringa oleifera* petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anti-cancer and catalytic activity. *J Ind Eng Chem* 21:1105–1111
- Bogireddy NKR, Anand KKH, Mandal BK (2015) Gold nanoparticles—synthesis by *Sterculia acuminata* extract and its catalytic efficiency in alleviating different organic dyes. *J Mol Liq* 211:868–875
- Liu L, Corma A (2018) Metal catalysts for heterogeneous catalysis: from single atoms to nanoclusters and nanoparticles. *Chem Rev* 118(10):4981–5079
- Singh AK (2015) Srivastava ON (2015) one-step green synthesis of gold nanoparticles using black Cardamom and effect of pH on its synthesis. *Nanoscale Res Lett* 10:353
- Paul B, Bhuyana B, Purkayastha DD, Dey M, Dhar SS (2015) Green synthesis of gold nanoparticles using *Pogostemon benghalensis* (B) O. Kt. leaf extract and studies of their photocatalytic activity in degradation of methylene blue. *Mat Lett* 148:37–40
- Baruah D, Goswami M, Yadav RNS, Yadav A, Das AM (2018) Biogenic synthesis of gold nanoparticles and their application in photocatalytic degradation of toxic dyes. *J Photochem Photobiol B Biol* 186:51–58
- Ansar SM, Kitchens CL (2016) Impact of gold nanoparticle stabilizing ligands on the colloidal catalytic reduction of 4-nitrophenol. *ACS Catal* 6(8):5553–5560
- Metz KM, Sanders SE, Pender JP, Dix MR, Hinds DT, Quinn SJ, Ward AD, Duffy P, Cullen RJ, Colavita PE (2015) Green synthesis of metal nanoparticles via natural extracts: the biogenic nanoparticle corona and its effects on reactivity. *ACS Sustain Chem Eng* 3(7):1610–1617
- Gharatape A, Salehi R (2017) Recent progress in theranostic applications of hybrid gold nanoparticles. *Eur J Med Chem* 138:221–233
- Colangelo E, Comenge J, Paramelle D, Volk M, Chen Q, Levy R (2016) Characterizing self-assembled monolayers on gold nanoparticles. *Bioconjug Chem* 28(1):11–22
- Jia YP, Ma BY, Wei XW, Qian ZY (2017) The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chin Chem Lett* 28(4):691–702
- Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Russo MV (2015) The puzzle of toxicity of gold nanoparticles. The case-study of HeLa cells. *Toxicol Res* 4:796–800
- Bodelon G, Costas C, Perez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzan LM (2017) Gold nanoparticles for regulation of cell function and behavior. *Nano Today* 13:40–60
- Eman HI, Aliyah MA, Eman A, Arshi N, Rawda MO (2018) Successful green synthesis of gold nanoparticles using a *Corchorus olitorius* extract and their antiproliferative effect in cancer cells. *Int J Mol Sci* 19:2612
- Rossi A, Donati S, Fontana L, Porcaro F, Battocchio C, Proietti E, Venditti I, Bracci L, Fratoddi I (2016) Negatively charged gold nanoparticles as a dexamethasone carrier: stability in biological media and bioactivity assessment in vitro. *RSC Adv* 6:99016–99022
- Aljabali AA, Akkam Y, Al Zoubi MS, Al-Batayneh KM, Al-Trad B, Abo-Alrob O, Alkilany AM, Benaroma M, Evans DJ (2018) Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphys zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomater* 8:174
- Hossen MN, Murphy B, Garcia-Hevia L, Bhattacharya R, Mukherjee P (2018) Probing cellular processes using engineered nanoparticles. *Bioconjug Chem* 29(6):1793–1808
- Her S, Jaffray DA, Allen C (2017) Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Del Rev* 109:84–101
- Cabuzu D, Cirja A, Puiu R, Grumezescu AM (2015) Biomedical applications of gold nanoparticles. *Curr Top Med Chem* 15(16):1605–1613
- Venditti I, Hassanein TF, Fratoddi I, Fontana L, Battocchio C, Rinaldi F, Carafa M, Marianecchi C, Diociaiuti M, Agostinelli E, Cametti C, Russo MV (2015) Bioconjugation of gold-polymer core-shell nanoparticles with bovine serum amine oxidase for biomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 134:314–321
- Dykman LA, Khlebtsov NG (2017) Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem Sci* 8(3):1719–1735

39. Ajnai G, Chiu A, Kan T, Cheng CC, Tsai TH, Chang J (2014) Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy. *J Exp Clin Med* 6(6):172–178
40. Kumar B, Smita K, Cumbal L, Camacho J, Hernández-Gallegos E, de Guadalupe C-LM, Grijalva M, Andrade K (2016) One pot phytosynthesis of gold nanoparticles using *Genipa americana* fruit extract and its biological applications. *Mater Sci Eng C* 62:725–731
41. Markus J, Wang D, Kim YJ, Ahn S, Mathiyalagan R, Wang C, Yang DC (2017) Biosynthesis, characterization, and bioactivities evaluation of silver and gold nanoparticles mediated by the roots of Chinese herbal *Angelica pubescens* Maxim. *Nanoscale Res Lett* 12(1):46
42. Conde-Hernández LA, Guerrero-Beltrán JÁ (2014) Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. *Food Chem* 142:455–460
43. de Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Biasoto ACT, Shahidi F (2014) Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *J Agric Food Chem* 62(50):12159–12171
44. Hunter RJ (2001) *Foundations of colloid science*, 2nd edn. Oxford university press, New York
45. Hunter RJ (2013) *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, vol 2, 3rd edn. Academic press, San Diego
46. Gunduz N, Ceylan H, Guler MO, Tekinay AB (2017) Intracellular accumulation of gold nanoparticles leads to inhibition of macropinocytosis to reduce the endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep* 7:40493
47. Lee YJ, Ahn EY, Park Y (2019) Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. *Nanoscale Res Lett* 14(1):129
48. Wang K, Zhang Y, Wang J, Yuan A, Sun M, Wu J, Hu Y (2016) Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. *Sci Rep* 6:27421
49. Rodríguez-León E, Iñiguez-Palomares R, Navarro RE, 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 Res Lett* 8(1):1–9
50. Sathishkumar G, Jha PK, Vignesh V, Rajkuberan C, Jeyaraj M, Selvakumar M et al (2016) Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. *J Mol Liq* 215:229–236
51. Muthuvel A, Adavallan K, Balamurugan K, Krishnakumar N (2014) Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. *Biomed Prev Nutr* 4(2):325–332
52. Watzky MA, Finke RG (2018) Gold nanoparticle formation kinetics and mechanism: a critical analysis of the “redox crystallization” mechanism. *ACS Omega* 3(2):1555–1563
53. Suchomel P, Kvitěk 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. *Sci Rep* 8(1):4589
54. Sivaraman SK, Elango I, Kumar S, Santhanam V (2009) A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *Curr Sci* 97(7):1055–1059
55. Rahme K, Holmes JD. Gold nanoparticles: synthesis, characterization, and bioconjugation. In: Lyshevski SE editors. *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. London: CRC Press; Taylor & Francis; 2015. p.1–11.
56. Qu H, Linder SW, Mudalige TK (2017) Surface coating and matrix effect on the electrophoretic mobility of gold nanoparticles: a capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Anal Bioanal Chem* 409(4):979–988
57. Aljabali A, Akkam Y, Al Zoubi M, Al-Batayneh K, Al-Trad B, Abo Alob O, Alkhalany AM, Benamara M, Evans DJ (2018) Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomaterials* 8(3):174
58. Van Hong N, Lee B-J (2017) Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine* 12:3137
59. García-Álvarez R, Hadjidemetriou M, Sánchez-Iglesias A, Liz-Marzán LM, Kostarelos K (2018) In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. *Nanoscale* 10(3):1256–1264
60. Erkan G, Şengül K, Kaya S (2014) Dyeing of white and indigo dyed cotton fabrics with *Mimosa tenuiflora* extract. *J Saudi Chem Soc* 18(2):139–148
61. Ahmad T, Bustam MA, Irfan M, Moniruzzaman M, Asghar HMA, Bhattacharjee S (2019) Mechanistic investigation of phytochemicals involved in green synthesis of gold nanoparticles using aqueous *Elaeis guineensis* leaves extract: role of phenolic compounds and flavonoids. *Biotechnol Appl Biochem*. <https://doi.org/10.1002/bab.1787>
62. Gajendiran M, Jo H, Kim K, Balasubramanian S (2019) Green synthesis of multifunctional Peg-carboxylate π back-bonded gold nanoconjugates for breast cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 14:819
63. Ganaie SU, Abbasi T, Abbasi SA (2016) Rapid and green synthesis of bimetallic Au–Ag nanoparticles using an otherwise worthless weed *Antigonon leptopus*. *J Exp Nanosci* 11(6):395–417
64. Wang Q, Zhao X, Lee YL, Liu HG (2015) A new and facile way to fabricate catalytically active block copolymer/Au nanoparticle multilayer thin films at the air/liquid interface. *RSC Adv* 5(105):86564–86571
65. Alegria E, Ribeiro A, Mendes M, Ferraria A, do Rego A, Pombeiro A (2018) Effect of phenolic compounds on the synthesis of gold nanoparticles and its catalytic activity in the reduction of nitro compounds. *Nanomaterials* 8(5):320
66. Ahmad T, Bustam MA, Irfan M, Moniruzzaman M, Asghar HMA, Bhattacharjee S (2018) Green synthesis of stabilized spherical shaped gold nanoparticles using novel aqueous *Elaeis guineensis* (oil palm) leaves extract. *J Mol Struct* 1159:167–173
67. Li J, Tian B, Li T, Dai S, Weng Y, Lu J, Xu X, Jin Y, Pang R, Hua Y (2018) Biosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using protein extracts of *Deinococcus radiodurans* and evaluation of their cytotoxicity. *Int J Nanomedicine* 13:1411
68. Shabestarian H, Homayouni-Tabrizi M, Soltani M, Namvar F, Azizi S, Mohamad R, Shabestarian H (2017) Green synthesis of gold nanoparticles using *Sumac* aqueous extract and their antioxidant activity. *Mat Res* 20(1):264–270
69. Paul B, Bhuyan B, Purkayastha DD, Dhar SS (2016) Photocatalytic and antibacterial activities of gold and silver nanoparticles synthesized using biomass of *Parkia roxburghii* leaf. *J Photochem Photobiol B Biol* 154:1–7
70. Chandran P, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA (2017) Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells. *Nanotoxicology* 11(4):507–519
71. Zhaleh M, Zangeneh A, Goorani S, Seydi N, Zangeneh MM, Tahvilian R, Pirabbasi E (2019) In vitro and in vivo evaluation of cytotoxicity, antioxidant, antibacterial, antifungal, and cutaneous wound healing properties of gold nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Gundelia tournefortii* L. as a capping and reducing agent. *Appl Organometallic Chem* 33e5015
72. He H, Xie C, Ren J (2008) Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal Chem* 80(15):5951–5957
73. Geddes CD, Parfenov A, Gryczynski I, Lakowicz JR (2003) Luminescent blinking of gold nanoparticles. *Chem Phys Lett* 380(3–4):269–272
74. Cantelli A, Battistelli G, Guidetti G, Manzi J, Di Giosia M, Montalti M (2016) Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics. *Dyes and Pigm* 135:64–79
75. Wu Z, Jin R (2010) On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters. *Nano Lett* 10(7):2568–2573
76. Zheng Y, Lai L, Liu W, Jiang H, Wang X (2017) Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Adv Coll Interf Sci* 242:1–16
77. Liu X, Wu F, Tian Y, Wu M, Zhou Q, Jiang S, Niu Z (2016) Size dependent cellular uptake of rod-like bionanoparticles with different aspect ratios. *Sci Rep* 6:24567
78. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y (2011) Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small* 7(10):1322–1337
79. Xie X, Liao J, Shao X, Li Q, Lin Y (2017) The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles. *Sci Rep* 7(1):1–9
80. Rodríguez-León E, Larios-Rodríguez E, Rodríguez-Beas C, Plascencia-Villa G, Iñiguez-Palomares RA (2016) Study of methylene blue degradation by gold nanoparticles synthesized within natural zeolites. *J Nanomater* 2016:1–10
81. Zhou X, Xu W, Liu G, Panda D, Chen P (2009) Size-dependent catalytic activity and dynamics of gold nanoparticles at the single-molecule level. *JACS* 132(1):138–146
82. Suwith VS, Philip D (2014) Catalytic degradation of methylene blue using biosynthesized gold and silver nanoparticles. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 118:526–532
83. Ganapuram BR, Alle M, Dadigala R, Dasari A, Maragoni V, Guttena V (2015) Catalytic reduction of methylene blue and Congo red dyes using green synthesized gold nanoparticles capped by *salmalia malabarica* gum. *Int Nano Lett* 5(4):215–222

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Additional file 1

Synthesis of Gold Nanoparticles Using Mimosa tenuiflora Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake and Catalysis

Ericka Rodríguez-León¹, Blanca E. Rodríguez-Vázquez², Aarón Martínez-Higuera¹, César Rodríguez-Beas¹, Eduardo Larios-Rodríguez³, Rosa E. Navarro², Ricardo López-Esparza¹ and Ramón A. Iñiguez-Palomares^{1*}

¹Physics Department, University of Sonora, Rosales and Transversal 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico.

²Polymer and Material Department, University of Sonora, Rosales and Transversal 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico.

³Chemical Engineering and Metallurgy Department, University of Sonora, Rosales and Transversal 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico.

* Corresponding author: E-mail: ramonalfonso.iniguez@gmail.com

Table S1 Formulations used in AuMt1 and AuMt2 synthesis

Sample	HAuCl ₄ 0.01M V (mL) pH=2.02	Mt Extract 121.8 mg/mL Vol (mL) pH=5.10	Ultrapure Water Vol (mL) pH=6.47
AuMt1	3,2	1,6	1,20
AuMt2	1,6	1,6	2,8

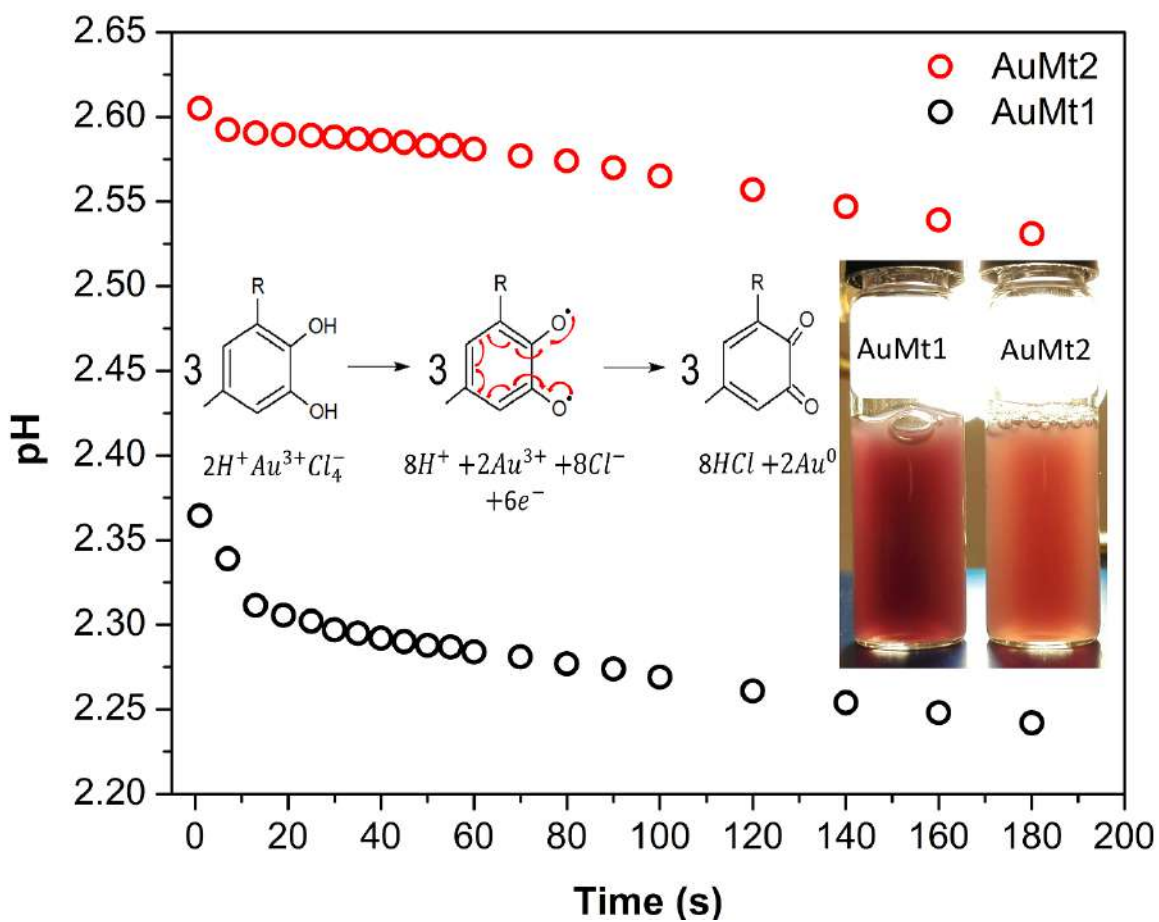


Figure S1. Time-dependent pH change of AuMtNPs synthesis. The inset shows mechanism for the reduction of gold ions into Au⁰ in presence of polyphenolics groups

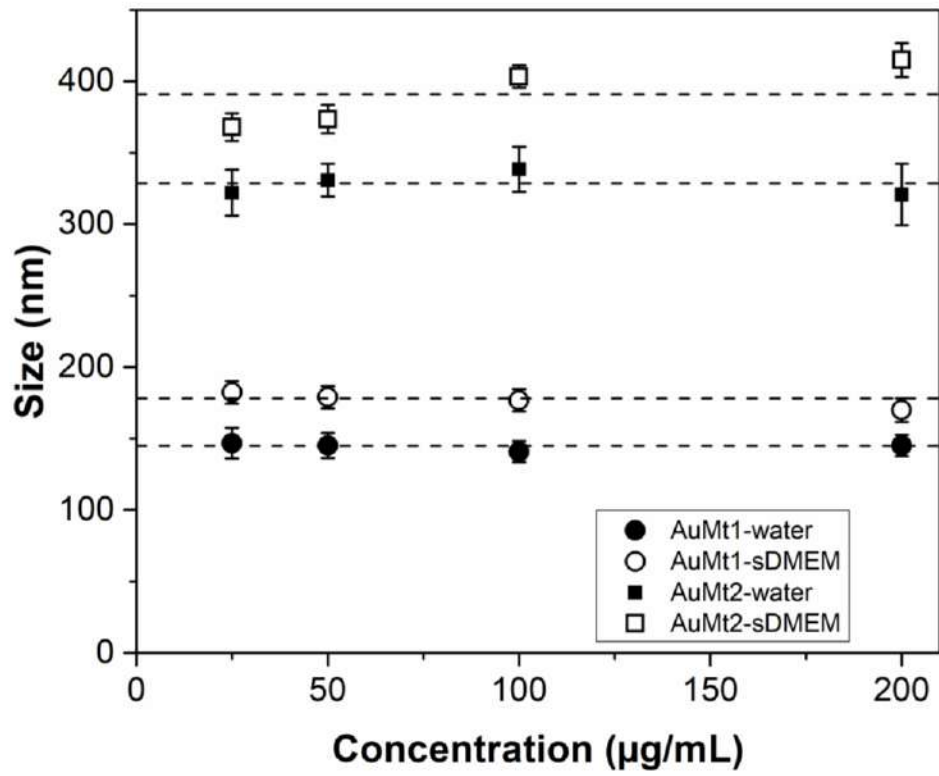
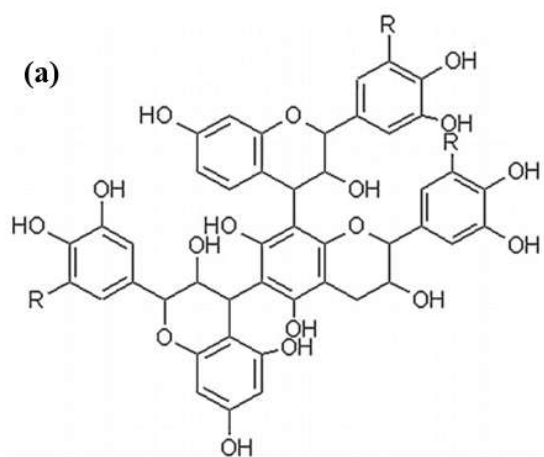
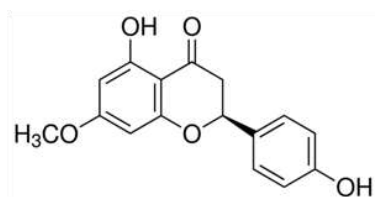


Figure S2. DLS of AuMt1 and AuMt2 in water and sDMEM at 37 °C



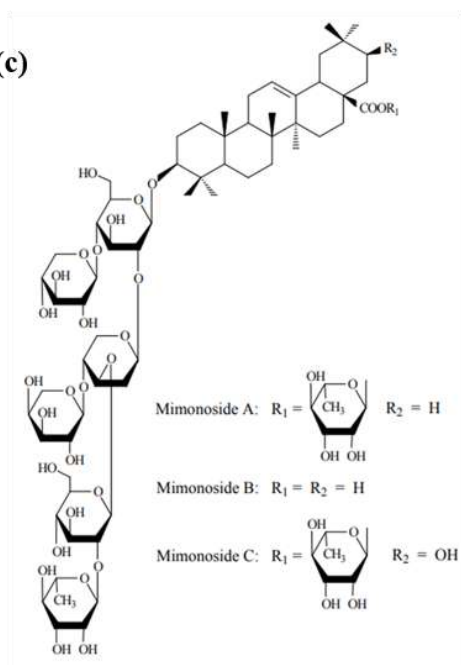
Mimosa Tannin. R = H or CH₃ (1)

(b)



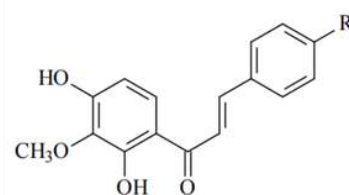
Sakuranetin (2)

(c)



Triterpenoids saponins (3)

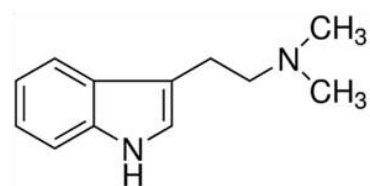
(d)



Kukulkan A: R = OCH₃
Kukulkan B: R = OH

Chalcones (3)

(e)



N, N-dimethyltryptamine (4)

Figure S3. Main reported compounds of *Mimosa tenuiflora*.

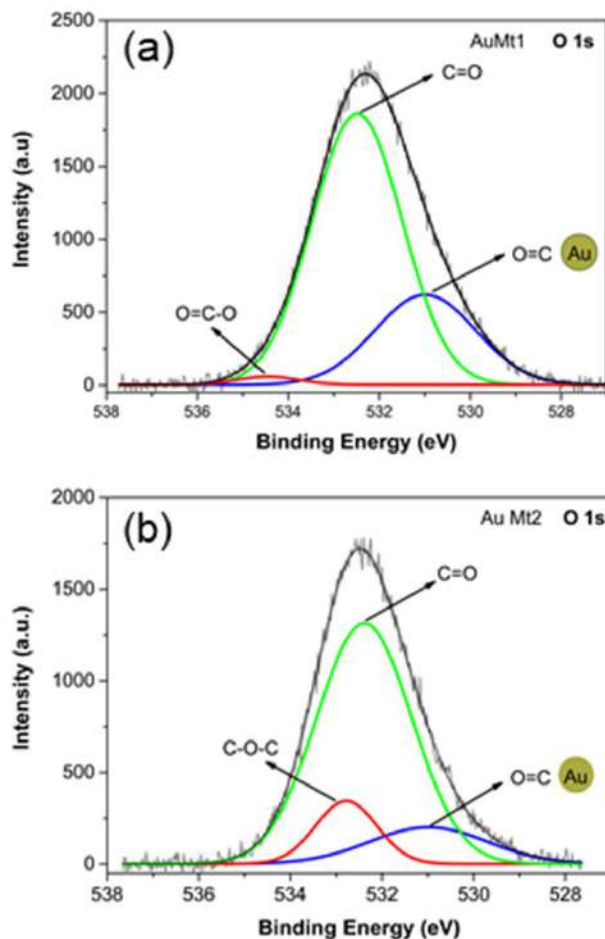


Figure S4. Deconvolution signal of XPS O 1s of AuMt1 and AuMt2.

Table S2. XPS Peak fitting gaussian parameters

		AuMt1			AuMt2		
		Xc (eV)	FMWH	A (%)	Xc (eV)	FMWH	A (%)
Au 4f	4f _{5/2}	88.63	1.46	46.26	87.79	1.48	45.81
	4f _{7/2}	84.95	1.51	53.74	84.05	1.38	54.19
C 1s	C=O	286.97	4.51	28.61	287.09	1.95	25.45
	C-O	286.17	1.65	16.63	286.33	1.65	27.84
	C-C/C=C	284.53	1.95	54.74	284.78	4.51	46.68
O 1s	O=C-O	534.44	1.61	1.47	-----	-----	-----
	C-O-C	-----	-----	-----	532.78	1.57	13.86
	C=O	532.48	2.32	71.85	532.38	2.45	12.4
	O=C	530.98	2.6	26.67	530.98	3.02	73.74

where Xc is the Gaussian center, A is the area under curve and FMWH is Full Width at Half Maximum.

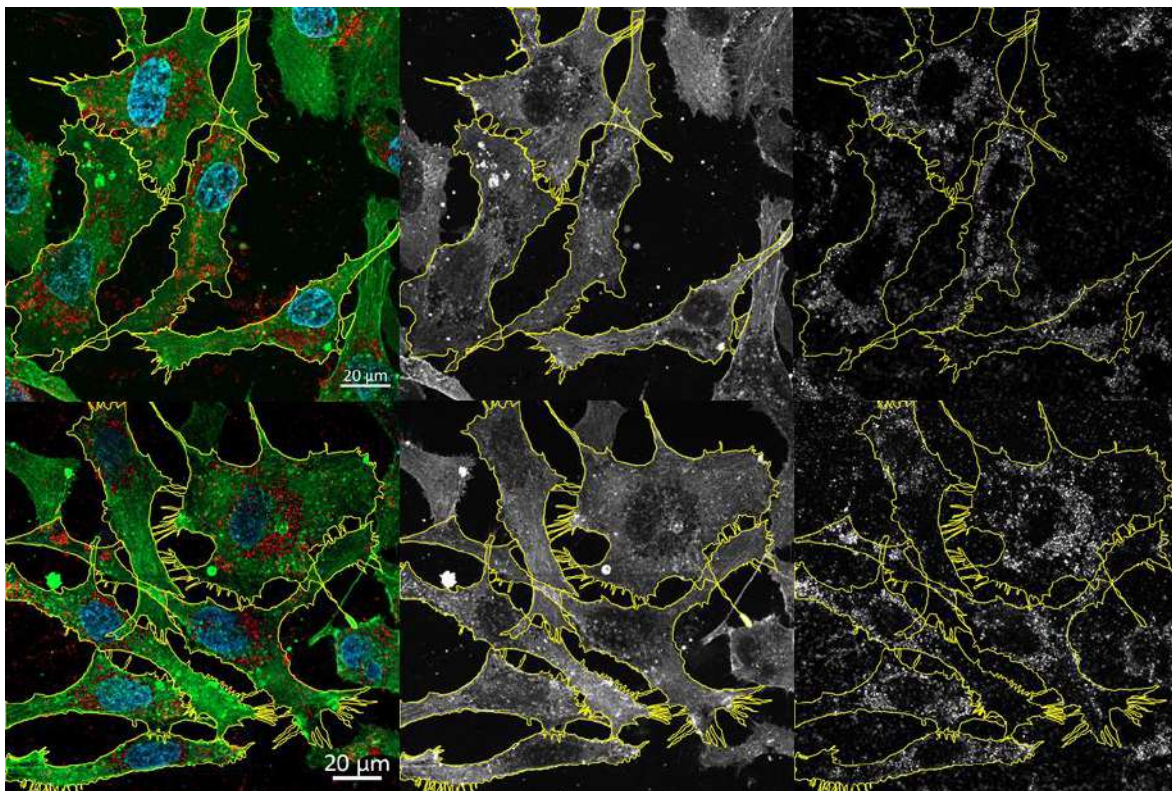


Figure S5. Region of Interest (ROI) of AuMt1 in HUVEC for Uptake NPs in cells:
a) Merge of Nucleus (DAPI-blue), Actin fibers (Phalloidin-green) and AuMt1NPs (red);
b) Cells actin fluorescence in gray scale. ROI delimited frontiers of each cells; c)
AuMt1NPs fluorescence in gray scale. Fluorescence intensity is measured for each ROI.

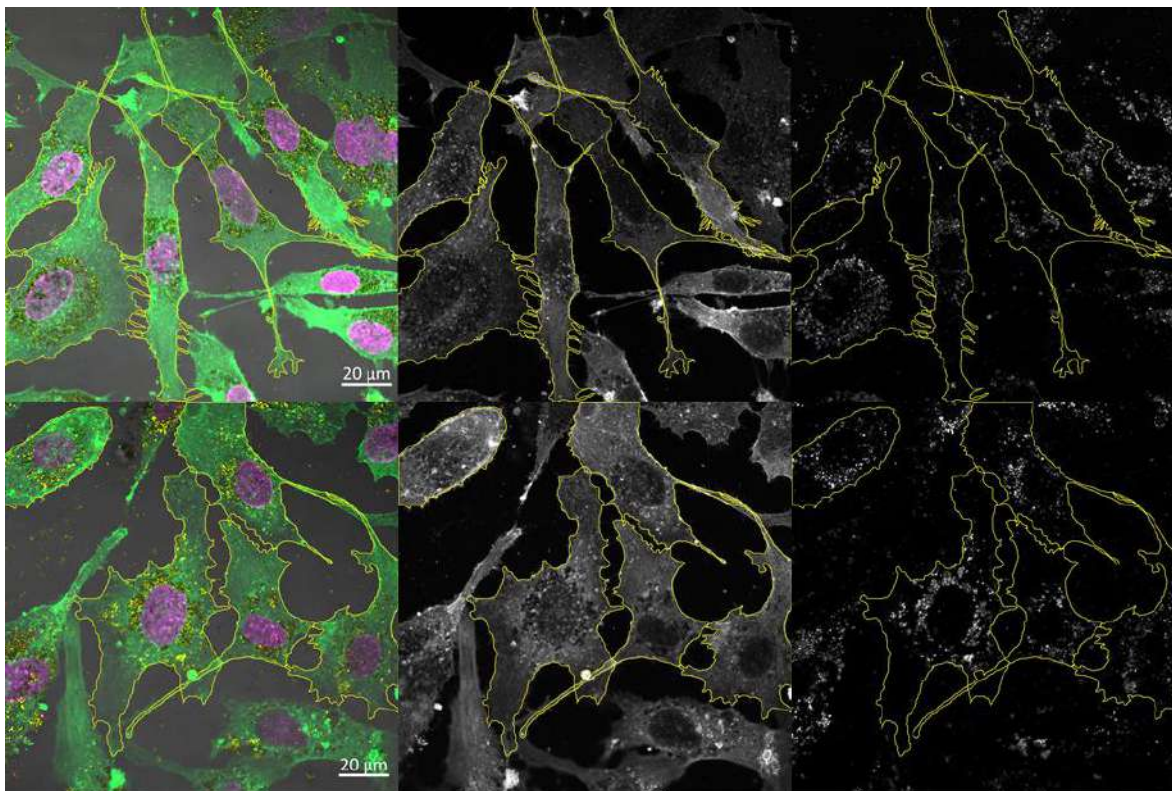


Figure S6. ROI of AuMt2 in HUVEC for Uptake NPs in cells: a) Merge of Nucleus (DAPI-blue), Actin fibers (Phalloidin-green) and AuMt1NPs (red); b) Cells actin fluorescence in gray scale. ROI delimited frontiers of each cells; c) AuMt1NPs fluorescence in gray scale. Fluorescence intensity is measured for each ROI.

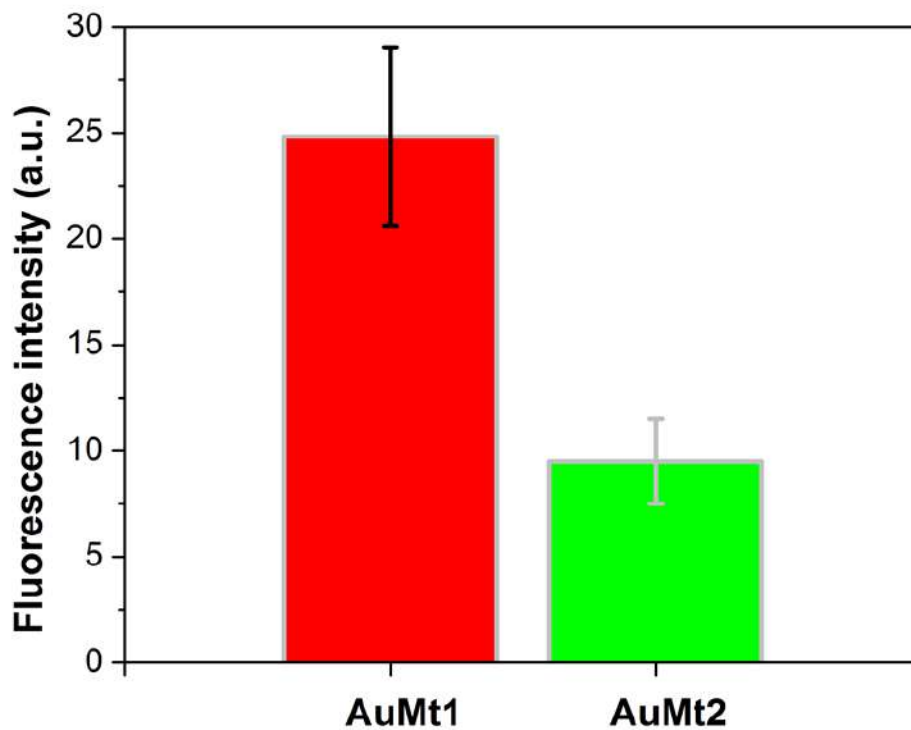


Figure S7. Fluorescence Intensity for AuMt1 and AuMt2 in HUVEC cells obtained for confocal microscopy.

References

1. Cruz MP, Andrade CM, Silva KO, de Souza EP, Yatsuda R, Marques LM, Clemente-Napimoga JT (2016) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and flavones isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *PloS one* 11(3):e0150839
2. Gerengi H, Schaefer K, Sahin HI (2012) Corrosion-inhibiting effect of *Mimosa*

extract on brass-MM55 corrosion in 0.5 M H₂SO₄ acidic media. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18(6): 2204-2210

3. Souza RSOD, Albuquerque UPD, Monteiro JM, Amorim ELCD (2008) Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51(5): 937-947
4. Gaujac A, Aquino A, Navickiene S, De Andrade JB (2012) Determination of N, N-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC-MS. *Journal of Chromatography B* 881: 107-110

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó síntesis de NPs de plata utilizando resveratrol, como agente reductor e irradiación con luz ultravioleta. Las NPs de plata obtenidas mediante esta síntesis están funcionalizadas con moléculas polifenólicas. El mecanismo de síntesis implica que el reductor, en este caso el resveratrol, dona electrones para que los iones de plata alcancen su estado de oxidación de valencia cero, lo que favorece la nucleación.

Uno de los aspectos a destacar es el uso de NPs de plata, con tamaño promedio alrededor de 3 nm, que permiten la intensificación de las señales de espectroscopia Raman por el mecanismo SERS que permite determinar las señales características de una molécula a muy bajas concentraciones del orden de mM. El estudio de RMN determinó que los electrones que estarían interviniendo en la reducción de la sal corresponden funcionalmente al doble enlace de la molécula.

También se sintetizaron NPs de oro utilizando el extracto etanólico de la corteza de *Mimosa tenuiflora*, la síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, en un solo paso. Los tamaños de las NPs de oro se controlan fácilmente regulando la proporción de precursor metálico/reductor.

Se observó que las captaciones celulares de AuMt1 y AuMt2 generan un efecto citotóxico moderado a las 24 y 48 h post exposición. Sin embargo, la toxicidad no se comporta de forma dosis-dependiente, lo que sugiere diferentes mecanismos de acción para AuMt1 y AuMt2. Los polifenoles adsorbidos en las NPs de oro facilitan la internalización de NPs. Las NPs AuMt2 se ubicaron cerca de la periferia nuclear, pero para AuMt1, se observó que las NPs se distribuyen en toda la célula

y presentan una absorción de tres veces en comparación con AuMt2. Debido a la propiedad de fluorescencia a baja potencia de excitación y una alta captación celular, las NPs de oro sintetizadas con extractos de corteza de *Mimosa tenuiflora* son candidatas para su implementación como nanoportadores de fármacos y sondas fluorescentes en células. Sin embargo, se deben abordar otras estrategias para reducir la toxicidad de los nanomateriales.

Finalmente, se observó que las NPs de oro muestran una actividad catalítica relevante en la degradación de azul de metileno usando NaBH_4 como agente reductor.

Se realizó una síntesis química de bajo impacto, utilizando el resveratrol y volúmenes pequeños de solventes, al mismo tiempo se obtuvieron NPs de oro mediante una síntesis verde, controlando el tamaño de las mismas, con baja citotoxicidad lo que abre la puerta a posibles aplicaciones biomédicas de las mismas.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Para el caso de la síntesis realizada con el extracto de *Mimosa tenuiflora*, que tiene un buen comportamiento para ser utilizado como una sonda fluorescente, es importante realizar procesos de limpieza o variaciones en la síntesis que permitan reducir la toxicidad que presentan en células HUVEC.

Mientras que las NPs sintetizadas con resveratrol pueden ser utilizadas como amplificadores de señales debido al efecto SEARS que muestran, por lo que es importante continuar con esa línea, hasta darle una aplicación.

REFERENCIAS

- [1] J. J. (. Ramsden, «What is nanotechnology?.,» *Nature*, vol. 344, pp. 524-526, 1990.
- [2] Z. J. Jiang, C. Y. Liu y L. W. Sun, «Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres.,» *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, nº 5, pp. 1730-1735, 2005.
- [3] J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao y R. P. Van Duyne, «Biosensing with plasmonic nanosensors.,» *Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals,,* pp. 308-319, 2010.
- [4] A. Desireddy, B. E. Conn, J. Guo, B. Yoon, R. N. Barnett, B. M. Monahan y T. P. Bigioni, «Ultrastable silver nanoparticles.,» *Nature*, vol. 501, nº 7467, pp. 399-402, 2013.
- [5] O. V. Salata, «Applications of nanoparticles in biology and medicine.,» *Journal of nanobiotechnology,,* vol. 2, nº 1, pp. 1-6, 2004.
- [6] S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami y S. Ikram, «A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise.,» *Journal of advanced research*, vol. 7, nº 1, pp. 17-28, 2016.
- [7] J. E. Hulla, S. C. Sahu y A. W. Hayes, «Nanotechnology: History and future.,» *Human & experimental toxicology,,* vol. 34, nº 12, pp. 1318-1321, 2015.
- [8] S. Paidari y S. A. brahim, «Potential application of gold nanoparticles in food packaging: a mini review.,» *Gold Bulletin*, vol. 54, nº 1, pp. 31-36, 2021.
- [9] Z. Hua, T. Yu, D. Liu y Y. Xianyu, «Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection.,» *Biosensors and Bioelectronics,,* vol. 179, p. 113076, 2021.
- [10] X.-F. Zhang, Z. G. Liu, S. W. y S. Gurunathan, «Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches.,» *International journal of molecular sciences*, vol. 17, nº 9, p. 1534, 2016.
- [11] S. W. Kim, J. Park, Y. Jang, Y. Chung, S. Hwang, T. Hyeon y Y. W. Kim, «Synthesis of monodisperse palladium nanoparticles.,» *Nano Letters*, , vol. 3, nº 9, pp. 1289-1291, 2003.
- [12] J. Ramyadevi, K. Jeyasubramanian, A. Marikani, G. Rajakumar y A. A. Rahuman, «Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles.,» *Materials letters,,* vol. 71, pp. 114-116, 2012.
- [13] T. Pasinszki y M. Krebsz, «Synthesis and application of zero-valent iron nanoparticles in water treatment, environmental remediation, catalysis, and their biological effects.,» *Nanomaterials*, vol. 10, nº 5, p. 917, 2020.
- [14] M. Abd Elkodous, G. S. El-Sayyad, I. Y. Abdelrahman, H. S. El-Bastawisy, M. F. M. H. A. Nasser y A. El-Batal, «Therapeutic and diagnostic potential of nanomaterials for enhanced biomedical applications.,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 180, pp. 411-428, 2019.
- [15] T. Utsev, T. M. Tiza, O. Mogbo, S. K. Singh, A. Chakravarti, N. Shaik y S. P. Singh, « Application of nanomaterials in civil engineering.,» *Materials Today: Proceedings.,* 2022.
- [16] Q. Yang, Y. Wang, X. Li, H. Li, Z. Wang, Z. Tang y C. Zhi, «Recent Progress of MX ene-Based Nanomaterials in Flexible Energy Storage and Electronic Devices.,» *Energy & Environmental Materials*, vol. 1, nº 4, pp. 183-195, 2018.
- [17] A. Jawed, V. Saxena y L. M. Pandey, «Engineered nanomaterials and their surface functionalization for the removal of heavy metals: A review.,» *Journal of Water Process*

Engineering, vol. 101009, p. 33, 2020.

- [18] Y. Wang y Y. Xia, «Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals.,» *Nano Letters*, pp. 2047-2050, 2004.
- [19] M. Ovais, A. Raza, S. Naz, N. U. Islam, A. T. Khalil, S. Ali y Z. K. Shinwari, «Current state and prospects of the phytosynthesized colloidal gold nanoparticles and their applications in cancer theranostics.,» *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 101, nº 9, pp. 3551 - 3565, 2017.
- [20] G. Schmid, *Nanoparticles*, Wiley VCH., 2005.
- [21] R. Zanella, «Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño,» *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, vol. 5, nº 1, pp. 69-81, 2012.
- [22] S. Ahmed, Saifullah, M. Ahmad, B. L. Swami y S. & Ikram, «Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract.,» *Journal of radiation research and applied sciences*, vol. 9, nº 1, pp. 1-7, 2016.
- [23] I. Hussain, N. B. Singh, A. Singh, H. Singh y S. C. Singh, «Green synthesis of nanoparticles and its potential application.,» *Biotechnology letters*, vol. 38, nº 4, pp. 545-560, 2016.
- [24] A. M. El Shafey, «Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review.,» *Green Processing and Synthesis*, vol. 9, nº 1, pp. 304-339, 2020.
- [25] I. A. Adelere y A. Lateef, «A novel approach to the green synthesis of metallic nanoparticles: the use of agro-wastes, enzymes, and pigments,» *Nanotechnology Reviews*, vol. 5, nº 6, pp. 567-587, 2016.
- [26] J. Yang, S. Han, H. Zheng, H. Dong y J. Liu, «Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides.,» *Carbohydrate polymers*, vol. 123, pp. 53-66, 2015.
- [27] I. Hussain, N. B. Singh, A. Singh, H. Singh y S. C. Singh, «Green synthesis of nanoparticles and its potential application,» *Biotechnology letters*, vol. 38, nº 4, pp. 545-560, 2016.
- [28] X. Li, H. Xu, Z. S. Chen y G. Chen, «Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications.,» *Journal of Nanomaterials*, vol. 2011, 2011.
- [29] K. S. V. Gottimukkala, R. P. Harika y D. Zamare, «Green synthesis of iron nanoparticles using green tea leaves extract.,» *J. Nanomed. Biother. Discov*, vol. 7, p. 151, 2017.
- [30] N. Jayarambabu, A. Akshaykranth, T. V. Rao, K. V. Rao y R. R. Kumar, «Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity,» *Materials Letters*, vol. 259, p. 126183, 2020.
- [31] K. G. Rao, C. H. Ashok, K. V. Rao, C. S. Chakra y P. Tambur, «Green synthesis of TiO₂ nanoparticles using *Aloe vera* extract,» *nt. J. Adv. Res. Phys. Sci*, vol. 2, nº 1A, pp. 28-34, 2015.
- [32] E. Rodríguez-León, R. Iñiguez-Palomares, N. R. E. H.-U. R. T. J. C. Iñiguez-Palomares y A. Maldonado, «Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts),» *Nanoscale research letters*, vol. 8, nº 1, pp. 1-9, 2013.
- [33] A. Singh, N. B. Singh, I. Hussain, H. Singh y S. C. Singh, «Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity.,» *Int J Pharm Sci Invent*, vol. 4, nº 8, pp. 25-40, 2015.

- [34] C. D. De Souza, B. R. Nogueira y M. E. C. Rostelato, «Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction,» *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 798, pp. 174-740, 2019.
- [35] P. Zhao, Na Li y D. Astruc., «"State of the art in gold nanoparticle synthesis."», *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 257, nº 3-4, pp. 638-665, 2013.
- [36] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot y A. Plech, «Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited,» *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, nº 32, pp. 15700-15707, 2006.
- [37] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang y X. Peng, «Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 29, nº 45, pp. 13939-13948, 2007.
- [38] UTEP, «Herbal Safety,» [En línea]. Available: <https://www.utep.edu/herbal-safety/hechos-herbarios/hojas-de-datos-a-base-de-hierbas/tepezcohuite.html>. [Último acceso: 09 06 2022].
- [39] C. & A. W. Santos, «E-BOOK,» 2021.
- [40] M.-C. G y L.-P. R., «Plantas Medicinales en los Mercados de México.,» *Universidad Autónoma de Chapingo*, pp. 84-85, 2011.
- [41] M. D., *Mabberley's Plant Book*, Londres: Cambridge University Press, 2008.
- [42] I. S. X. D. França, J. A. D. Souza, R. S. Baptista y V. R. D. S. Britto, «Medicina popular: beneficios y maleficios de las plantas medicinales.,» *Revista brasileira de enfermagem*, vol. 61, nº 2, pp. 201-208, 2008.
- [43] I. A. E. Amariz, E. C. V. Pereira, Alencar Filho, J. M. T. D., J. P. D. Silva, N. A. C. D. Souza, A. P. de Oliveira y R. N. Pereira, «Chemical study of Mimosa tenuiflora barks,» *Natural Product Research*, vol. 36, nº 7, 2022.
- [44] F. E. A. Magalhães, B. F. L. A. O. F. Serpa, L. F. W. G. Moura, L. L. Maria da Conceição, A. R. A. da Silva y A. Campos, «Orofacial antinociceptive effect of Mimosa tenuiflora (Willd.) Poire,» *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 97, pp. 1575-10585, 2018.
- [45] P. Langcake y R. Pryce, «The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury,» *Physiol, Plant Pathol*, p. 77-86, 1976.
- [46] S. Bradamante, L. Barenghi y A. Villa, «Cardiovascular protective effects of resveratrol,» *Cardiovascular drug reviews*, vol. 22, nº 3, pp. 169-188, 2004.
- [47] T. Meng, D. Xiao, A. Muhammed, J. Deng, L. Chen y J. He, «Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol,» *Molecules*, vol. 26, nº 1, p. 229, 2021.
- [48] B. Ren, M. X. Y. Kwah, C. Liu, Z. Ma, M. K. Shanmugam, L. Ding y B. C. Goh, «Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives,» *Cancer Letters*, vol. 515, pp. 63-72, 2021.
- [49] A. Di Santo, A. Mezzetti, E. Napoleone, R. Di Tommaso, M. B. Donati y G. & L. R. De Gaetano, «Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells,» *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, nº 5, pp. 1089-1095, 2003.
- [50] H. O. Cheong, S.-Y. Ryu y K.-M. Kim., «Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes.,» *Planta medica*, vol. 65, nº 3, pp. 266-268, 1999.
- [51] J. Gambini, R. López-Grueso, G. Olaso-González, M. Inglés, K. Abdelazid y M. & V. J. El Alami, «Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas.,» *Revista española de geriatría y gerontología*, vol. 48, nº 2, pp. 79-88, 2013.
- [52] A. P. Alivisatos, «Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots.,» *Science*, vol.

271, nº 5251, pp. 933-937, 1996.

- [53] K. Ulbrich, K. Hola, V. Subr, A. Bakandritsos y J. & Z. R. Tucek, «Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies.,» *Chemical reviews*, vol. 116, nº 9, pp. 5338-5431, 2016.
- [54] M. B. Gawande, A. Goswami, T. Asefa, H. Guo, A. V. Biradar, D. L. Peng y R. S. & Varma, «Core-shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis.,» *Chemical Society Reviews*, vol. 44, nº 21, pp. 7540-7590., 2015.
- [55] M. C. & A. D. Daniel, «Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology,» *Chemical reviews*, vol. 104, nº 1, pp. 293-346, 2004.
- [56] A. & A. D. Labande, «Colloids as redox sensors: Recognition of H₂PO₄⁻ and HSO₄⁻ by amidoferrocenylalkylthiol-gold nanoparticles,» *Chemical Communications*, vol. 12, pp. 1007-1008, 2000.
- [57] J. L. Poccohuanca Ramos y A. R. (. . Villarroel Quispe, «Evaluación de la capacidad captadora de radicales libres DPPH, de los extractos de hojas de Piper aduncum L.(matico), preparados en diferentes condiciones,» *Revista Académica Peru Salud*, 2021.
- [58] A. Blainski, G. C. Lopes y J. C. P. D. Mello., « "Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L.",» *Molecules*, vol. 18, nº 6, pp. 6852-6865, 2013.
- [59] E. M. García Martínez, I. Fernández Segovia y A. Fuentes López, « "Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.",» 2015.
- [60] P. S. e. a. Babu, «"Solubility enhancement of cox-II inhibitors by cosolvency approach.",» *Journal of Pharmaceutical Sciences* , vol. 7, nº 2, pp. 119-126, 2008.

TRABAJOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Se obtuvieron los siguientes productos durante la elaboración de este proyecto:

Publicación de artículos:

- “Synthesis of Gold Nanoparticles Using Mimosa tenuiflora Extract, Assessments of Cytotoxicity, Cellular Uptake, and Catalysis”, el cual cuenta con 60 citas, según información de Google Scholar.
- “Spectroscopic analysis and nuclear magnetic resonance for silver nanoparticles synthesized with trans-resveratrol and cis-resveratrol”.
- Au@Ag Core@Shell Nanoparticles Synthesized with Rumex hymenosepalus as Antimicrobial Agent.

Participación en Congresos:

- XIV Coloquio Bienal de Materiales: Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y plata con EGCG en sistemas liposomales.
- Reunión Universitaria de Investigación en Materiales 2018: Interacción molecular de EGCG y resveratrol con nanopartículas de oro y plata.
- XXX International Materials Research Congress: “Synthesis and characterization of gold nanoparticles using a liposome as a nano reactor”.
- XXX International Materials Research Congress: Synthesis of silver and gold nanoparticles with red Mangrove extract and toxicity evaluation in Artemia franciscana"

Patente otorgada:

- Método de síntesis verde de nanopartículas de oro y plata a partir de extractos de *Mimosa tenuiflora* con actividad catalítica. Se anexa constancia.

ANEXOS

PATENTE OTORGADA POR EL INSTITUTO MEXICANO DE PROPIEDAD INTELECTUAL

TÍTULO DE PATENTE No. 386047

Titular(es): KAISHA SERVICIOS DE CONSULTORÍA, S.A. DE C.V.

Domicilio: Calle José María Valencia 12, Colonia San José de las Minutas, 83285, Hermosillo, Sonora, MÉXICO

Denominación: MÉTODO DE SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA A PARTIR DE EXTRACTOS DE *Mimosa tenuiflora* CON ACTIVIDAD CATALÍTICA.

Clasificación: **CIP:** A61K36/48; B01J23/66; B82Y30/00; C02F1/68
CPC: A61K36/48; A61K9/1682; A61K9/1694; B01J23/66; B82Y30/00; C02F1/683

Inventor(es): EDUARDO ANTONIO LARIOS RODRÍGUEZ; CÉSAR RODRÍGUEZ BEAS; ERICKA RODRÍGUEZ LEON; RAMÓN ALFONSO IÑIGUEZ PALOMARES; BLANCA ESTHELA RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2016/003443	10 de Marzo de 2016	13:50

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 10 de marzo de 2036

Fecha de Expedición: 2 de septiembre de 2021

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impj.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56|MX/2021/88949|MX/a/2016/003443|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s)
1|Po6X8CFeliX6u6fyE4c3QMOS9R8=

Sello Digital:

ZOJS9JiJdkXHamIczeWVJxCwGRwqyqbEezzW7uK5TbolF8bviz4P3BNayAMj3BOVyBJGeX7Y+kl3TXU04EPQaPP2gr
k4KAdelEpsW0gkmhWb7sCDF1MmljFh41xleOp1eZhjj6DTt6qCD6jntfMqEN3fvo2htn+hfsbu00psBN8+yOdOQC5N
J4SWikO4kmPPTOQAZgsKcROToPE1Ghmrgl7SPFLcw2BRhry8qZv3n6kbjKlm5KplYL4Jy8JGS+1HLBg8d7RNyQf8Eg
2mJFC1ETJNUdVcJUH2zOS0YbBiiBg5nWWelERFDtFyXLi3CrgkQR626Q2EDAHUKkj236gbVg==



MX/2021/88949

MÉTODO DE SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA A PARTIR DE EXTRACTOS DE *Mimosa tenuiflora* CON ACTIVIDAD CATALÍTICA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5

La presente invención queda comprendida dentro del campo técnico de la Química, pues se trata de un método de síntesis de nanopartículas de oro y plata utilizando extractos de la planta *Mimosa tenuiflora*, las cuales además exhiben actividad catalítica y microbicida.

10

ANTECEDENTES

La nanotecnología se ha convertido en un campo de investigación de interés multidisciplinario, debido a ello se han explorado distintos métodos de síntesis que permitan obtener resultados óptimos. Es entonces cuando surge la síntesis verde o "green synthesis" como una alternativa viable a la síntesis típicamente mediada por reductores químicos, que pueden ser tóxicos y como una necesidad de la comunidad científica de realizar la producción de nanopartículas a través de procesos ecológicamente amigables, llevando al mínimo los índices de contaminación debido a las nanopartículas.

20

La posibilidad de explotar los recursos naturales para la creación de nanopartículas metálicas, se ha convertido en un enfoque bastante competente, debido a que permite una mayor variedad de investigaciones utilizando compuestos ecológicos como extractos de distintas plantas, además las propiedades de las nanopartículas resultantes dependen de la planta que se utilizó para obtenerlas.

25

La síntesis verde surge como una necesidad de la comunidad científica de realizar la producción de nanopartículas a través de procesos ecológicamente amigables, llevando al mínimo los índices de contaminación debido a las nanopartículas. Uno de los métodos más considerados en la síntesis verde es la producción de nanopartículas de metal que utilizan organismos, de los cuales, las plantas parecen ser las mejores candidatas. debido a que resultan adecuadas para la

30

biosíntesis a gran escala de las nanopartículas. Además las nanopartículas producidas por las plantas son más estables y la tasa de síntesis es más rápida que en el caso de los microorganismos. Por otra parte, las nanopartículas son más diversas en forma y tamaño en comparación con los producidos por otros organismos. Las ventajas del uso de las instalaciones y materiales derivados de plantas para la biosíntesis de las nanopartículas metálicas captan el interés para comprender los mecanismos de captación de iones metálicos y biorreducción por las plantas, y para entender el posible mecanismo de formación de nanopartículas de metales en las plantas.

10

OBJETO DE LA INVENCION

Un primer objeto de la invención consiste en un método de síntesis de nanopartículas de oro y plata utilizando extractos de la planta *Mimosa tenuiflora*, las cuales además exhiben actividad catalítica y microbicida.

15

Un segundo objeto de la invención consiste en un método para la degradación de colorantes.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

20

Los detalles característicos de este método se muestran claramente en la siguiente descripción y en las Figuras que se acompañan, siguiendo los signos de referencia para indicar las partes mostradas.

25 **Obtención y caracterización del extracto de Tepezcohuite**

Para la preparación del extracto de *Mimosa tenuiflora* (Tepezcohuite) se pesaron 15g de corteza de este árbol. La corteza se cortó en trozos no mayores a 3cm colocándose en un frasco de cultivo de vidrio de 100ml de capacidad. El solvente empleado para la extracción consistió en una mezcla de 70 ml de etanol (99% pureza, marca Fermont) y 30ml de agua ultrapura.

30

Dicho solvente se vertió en el frasco que fue cerrado con tapón de rosca de seguridad para evitar la evaporación y se forró con papel aluminio para evitar la foto-oxidación de las moléculas polifenólicas obtenidas en la extracción por maceración a temperatura ambiente (25 °C), la cual duró 15 días. Después se filtró la solución con papel filtro Whatman 40, que retiene partículas de 8µm y posteriormente con filtro acrodisc de 0.20µm y 5cm de diámetro. Para este último filtrado la solución se inyectó a través del filtro con jeringa de plástico de 20ml. La solución de extracto obtenida del proceso de filtración se usó como agente reductor en la producción de nanopartículas de oro y plata respectivamente.

10

Espectroscopía UV-Vis

Para la obtención del espectro UV-Visible del extracto se utilizó un espectrómetro Perkin-Elmer de doble haz, modelo Lambda 40. El espectro se obtuvo de 200nm-800nm con velocidad de barrido de 240nm/min. Se colocaron 15µL del extracto en 2985µL de agua dentro de la celda de cuarzo para la muestra y se emplearon 3ml de agua ultrapura como referencia en la otra celda de cuarzo. El espectro UV-Vis del extracto se muestra en la Figura 1. En el espectro del extracto se observa solo una banda bien definida en la región UV centrada en 280nm. Esta banda se ubica en la región asociada a los compuesto fenólicos (anillos aromáticos) por lo que se atribuye a la presencia de los compuestos polifenólicos reportados para la *Mimosa tenuiflora* y que son los responsables de la bio-reducción de los precursores metálicos.

20

Prueba de DPPH

La prueba DPPH, fue realizada a una muestra de extracto de la planta *Mimosa tenuiflora*, la Figura 2 muestra el porcentaje de inhibición de acuerdo a distintas concentraciones.

Se observa que a medida que la concentración crece también lo hace el porcentaje de inhibición. Con el propósito de establecer una comparación de la capacidad antioxidante del extracto se emplean en esta prueba como referencias la vitamina C, (Llamada posteriormente Vit C) y Catequina a una concentración de 70 µmol/L,

30

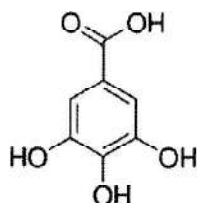
la cual equivale a 12.32 mg/L para la Vitamina C (peso molecular de 176.12 g/mol) y 20.31 mg/L para la Catequina (peso molecular de 290.26 g/mol). De la Figura 2 se observa que a una concentración de 12.5 mg/L de *Mimosa tenuiflora* se tiene una inhibición media (50%) el cual es muy parecido a los valores alcanzados para las referencias (46% para Vit C y 58% para la Catequina) lo cual indica que el extracto obtenido de *Mimosa tenuiflora* posee una capacidad antioxidante muy parecida a los compuestos puros empleados como referencias por su elevada capacidad antioxidante por lo que puede emplearse como un eficiente bioreductor en la síntesis de nanomateriales de metales nobles.

10

Polifenoles totales

Con el fin tener una estimación cuantitativa del contenido de moléculas polifenólicas, se realizó la prueba de los polifenoles totales presentes en el extracto de *Mimosa tenuiflora*, y cuyo resultado se muestra en la Tabla 1. Además aparece la cantidad de polifenoles presentes en otras plantas ricas en compuestos polifenólicos con el propósito de establecer un comparativo. De la Tabla 1 se desprende que el extracto de tepezcohuite que se utiliza para la síntesis de nanopartículas presenta un alto contenido fenólico, solo un poco inferior al de la planta *Rumex hymenosepalus*. El valor de 425mg/g referidos a mg de ácido gálico por gramo de extracto, nos indica en términos comparativos que casi la mitad de la masa del extracto corresponde al ácido gálico cuya molécula es:

20



25

Para tener una idea, cada molécula de ácido gálico es capaz de desprotonarse en dos sitios del anillo fenólico con la posterior transferencia de dos electrones que participarán en la reducción de los iones metálicos, de tal manera que a una mayor

cantidad de polifenoles en el extracto se reducen más iones metálicos y se generan más nanomateriales.

Extracto	Polifenoles totales (mg /g)*
<i>Mimosa tenuiflora</i>	425 ±15
<i>Rhizophora mangle</i>	365 ±12
<i>Rumex hymenosepalus</i>	496 ±23
<i>Bursera microphylla</i>	57 ±1
<i>Vitex mollis</i>	5 ±0,2
*mg de ácido gálico por gramo de extracto.	

5 **Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro**

Para la generación de las nanopartículas de oro se usó como precursor metálico una solución acuosa de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) a una concentración de 0.01 M. El reactivo HAuCl_4 fue de la marca Aldrich con pureza del 99.9%. Fueron producidas a través de la biosíntesis, utilizando como agente biológico y reductor el extracto de tepezcohuite obtenido. Las distintas formulaciones seguidas en la síntesis se muestran en la Tabla 2.

Muestra	Volumen de HAuCl_4	Volumen de Reductor	Volumen de Agua	Razón
B	0.320ml	1,6ml	4,08ml	0.2
C	0.480ml	1,6ml	3,92ml	0.3
D	0.800ml	1,6ml	3,60ml	0.5
E	1,6ml	1,6ml	2,80ml	1
F	3,2ml	1,6ml	1,20ml	2

La razón R se define como la relación entre el volumen del precursor metálico y el reductor, en este caso es el tepozcohuite, como se indica en la siguiente ecuación:

$$R = \frac{V_P}{V_R}$$

Para la síntesis de los nanomateriales de oro se mezclaron los reactivos en el siguiente orden: precursor-solvente-reductor. Al agregar el último componente en cada muestra se procedió a la homogenización en vortex por 5 minutos. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 24 horas para que la reacción de síntesis fuese completa. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en agua ultrapura y se sonicó en cuba ultrasónica por 10 minutos para la re-dispersión de los nanomateriales.

Espectroscopia UV-Vis

La metodología para la obtención de los espectros UV-Vis de las nanopartículas fue la misma que la seguida para el caso del extracto. La Figura 3 (a y b) muestra los espectros de absorción UV-Vis para los distintos nanomateriales de oro obtenidos. Como se observa en la Figura 3 a), los espectros se encuentran normalizados respecto a la absorción del tepozcohuite (280nm). Para las muestras B,C y F las absorciones de los plasmones de resonancia del oro tienen máximos entre 610nm y 550nm con bandas muy bien definidas, siendo más estrecha para el caso de la muestra F que abarca solo de 500nm-700nm mientras que para B y C las bandas van de 500nm-800nm. En el caso de los espectros de la Figura 3 b) se tienen bandas muy extendidas que van de 500nm a 900nm pero sin que se definan bien las mismas, presentando máximos en 560nm para muestra D y en 760nm para muestra E.

Lo estrecho de la banda de absorción de la muestra F así como la ubicación de su máximo hacia longitudes de onda menores son indicios de que las nanopartículas en esta muestra son más pequeñas que en el resto y que la dispersión de tamaños es pequeña.

TEM

Para el estudio por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se depositaron 10 μL de las muestras en rejillas para TEM, de cobre (300 mesh) y con película de formvar-carbono. Después de depositadas las muestras, las rejillas se dejan secar por 1 hora en el ambiente del laboratorio y después se colocan en una cámara de vacío por 12 horas antes de introducirla al TEM. El microscopio electrónico es un equipo de emisión de campo Jeol 2010 F operado a 200KV. El equipo EDS empleado es un detector Bruker Quantax 200 enfriado por sistema Peltier y acoplado al TEM. La Figura 4 corresponde a las nanopartículas de oro sintetizadas con extractos de tepezcohuite.

Es posible observar que la forma de las nanopartículas de oro está determinada por la relación que hay entre el precursor metálico y el solvente, es decir de la razón R . A valores pequeños de R se presenta mayor regularidad de la morfología de las nanopartículas y las partículas comienzan a tomar formas diversas cuando R incrementa. En la Figura 5 se presenta el comportamiento de los tamaños promedios de las nanopartículas de oro en relación al parámetro R .

De la gráfica se observa que a medida que el contenido del precursor metálico incrementa, las partículas también aumentan su tamaño hasta alcanzar un máximo (150nm) para el caso en que los volúmenes del precursor metálico y agente reductor son iguales. Cuando el volumen del precursor es el doble que el volumen reductor, los tamaños de las nanopartículas obtenidas disminuyen significativamente. Esto puede entenderse si se considera que el volumen del extracto reductor no varió en los experimentos de una muestra a otra por lo que debe existir un límite en la cantidad de iones metálicos que pueden reducir los 1600 μL del extracto de Tepezcohuite, de tal forma que los iones metálicos excedentes afectan el ambiente electroquímico en el cual se efectúa la síntesis de los nanomateriales originando morfologías y tamaños distintos.

El valor de la razón $R=1$ marca una frontera que delimita la saturación de la capacidad de reducción de los 1600 μL de extracto de Tepezcohuite ante una solución 0.001M del precursor HAuCl_4 . El caso más interesante de la síntesis de nanopartículas de oro corresponde a la muestra F donde se observa una

diversidad de formas debido al exceso de precursor metálico. En esta síntesis las morfologías de las nanopartículas ya no son únicamente esferas sino que ahora aparecen triángulos, varillas y poliedros, entre otros. La Tabla 3 muestra el porcentaje de las morfologías más representativas detectadas en la muestra F.

5

Forma	Porcentaje (%)
Triángulos	11.8
Cuasiesferas	72.3
Poliedros	13.3
Varillas	2.6

Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

Para la generación de las nanopartículas de plata se usó como precursor metálico una solución acuosa de nitrato de plata (AgNO_3) 0.1 M. El reactivo AgNO_3 fue de la marca Aldrich con pureza del 99.9%. Fueron producidas a través de la biosíntesis, utilizando como agente biológico y reductor el extracto de tepezcohuite obtenido. La formulación seguida en la síntesis se muestra en la Tabla 4, se probaron otras formulaciones pero no se obtuvieron resultados.

10

Muestra	Volumen de AgNO_3	Volumen de Reductor	Volumen de Agua	Razón
C	0.480ml	1,6ml	3,92ml	0.3

15

Para la síntesis de los nanomateriales de plata se mezclaron los reactivos en el siguiente orden: precursor-solvente-reductor. Al agregar el último componente en cada muestra se procedió a la homogenización en vortex por 5 minutos. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente durante 24 horas para que la reacción de síntesis fuese completa. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 minutos, se retiró el sobrenadante y el precipitado se re-suspendió en

20

agua ultrapura y se sonicó en cuba ultrasónica por 10 minutos para la re-dispersión de los nanomateriales.

Espectroscopia UV-Vis

5 La metodología para la obtención de los espectros UV-Vis de las nanopartículas de plata fue la misma que la seguida para el caso del extracto. La Figura 6 muestra los espectros de absorción UV-Vis para el nanomaterial de plata obtenido.

En la gráfica anterior se observa una banda alrededor entre los 400nm-500nm con un máximo de absorción en aproximadamente 450 nm, lo que indica la presencia
10 de la plata. Lo estrecho de la banda de absorción de la muestra C así como la ubicación de su máximo hacia longitudes de onda menores son indicios de que las nanopartículas en esta muestra son más pequeñas y que la dispersión de tamaños es pequeña.

Para el estudio por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se sigue el
15 procedimiento descrito para las nanopartículas de oro. En la síntesis de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de tepezcohuite se observan dos poblaciones de nanopartículas, la Figura 7 corresponde a la población de nanopartículas de plata que no se aglomeran y con tamaños promedios de 5 nm. Mientras que la Figura 8 da la dispersión de tamaño para la población de
20 nanopartículas de plata sin aglomerar, podemos ver que más del 20% de la población se localizan alrededor de los 5 nm.

Catálisis de azul de metileno usando nanopartículas metálicas en solución

Se realizaron pruebas de actividad catalítica con azul de metileno, a una
25 concentración $3.33 \times 10^{-5} \text{M}$, colocando 3ml de azul de metileno, 6ml de agua ultra pura y variando el volumen de nanopartículas en solución. El sistema fue colocado bajo luz UV con potencia de 20W.

En la Figura 9 se observa el azul de metileno antes de colocar las nanopartículas de oro, señaladas como MB, (del inglés, *Methylene Blue*) y contrastadas con la
30 solución de azul de metileno una vez que las nanopartículas de oro fueron agregadas. En la Figura 10 se observa el azul de metileno antes de colocar las

nanopartículas de plata, señaladas como MB y contrastadas con la solución de azul de metileno una vez que fueron agregadas las nanopartículas de plata.

Muestra	Azul de Metileno	Nanopartículas
Au y Ag	$3.33 \times 10^{-5} M$	50 μl
Au y Ag	$3.33 \times 10^{-5} M$	90 μl

5

La Figura 11 muestra la evolución temporal de la actividad catalítica en nanopartículas en solución para las muestras de plata (Ag50) y de oro (Au50), para una concentración de 50 μL , se observa como al paso de tiempo el máximo de absorción característico del Azul de metileno va disminuyendo.

10 La Figura 12 muestra la evolución temporal de la actividad catalítica en nanopartículas en solución para las muestras de plata (Ag90) y de oro (Au90), para una concentración de 90 μL , se observa como al paso de tiempo el máximo de absorción característico del azul de metileno va disminuyendo.

Es determinante, la exposición a la luz a la que está sometida la muestra, debido a que el proceso es acelerado por la presencia de luz, es decir, es un proceso fotocatalítico. Todas las muestras fueron colocadas a 10 cm de la fuente de luz UV. El conjunto de Figuras permite observar los cambios perceptibles a simple vista de cómo el azul de metileno, va siendo degradado a su versión de leucometileno, provocado por la catálisis están produciendo las nanopartículas.

20

Muestra	Tiempo en alcanzar 50 %	% máximo de degradación
Ag50	Sin datos	Sin datos
Au50	20min	100
Ag90	13min	92
Au90	16min	100

En la Tabla 6 se ve que el oro, sin importar en qué proporción se encuentre, logra degradar un mayor porcentaje de azul de metileno, mientras que la plata, en la muestra que tiene mayor cantidad de nanopartículas se acerca más al oro, pero con mayor cantidad de material.

5

Catálisis heterogénea de azul de metileno usando nanopartículas soportadas en vidrio

Las nanopartículas fueron colocadas en una base de vidrio rectangular, con espesor de 1mm y dimensiones aproximadas de 76 mm de largo por 26 mm de ancho. Sobre ellas se colocó 1 ml de nanopartículas en solución, una vez colocadas fueron ingresadas a secar al horno por un período de 24 hrs a una temperatura de 55 °C. Cada placa fue dividida en tres y estos pequeños rectángulos fueron colocados en soluciones de azul de metileno. Fueron colocados 3 ml de azul de metileno y 6 ml de agua por cada placa. En la Figura 13 en la parte superior se ve una placa después de que fue utilizada para catálisis y en la zona inferior una placa ya goteada con la solución de nanopartículas y lista para usarse en catálisis.

En la Figura 14 se observa el comportamiento del UV-Vis para la placa goteada con nanopartículas de oro, es bastante claro que el máximo de absorbancia del azul de metileno se va reduciendo, mientras que el máximo de absorción característico del leucometileno va aumentando.

La Figura 15 muestra el UV-Vis a través del tiempo para la placa goteada con nanopartículas de plata.

La Figura 16 muestra la razón de decoloración para las placas, ambos ajustes bastante parecidos, lo que indica que el proceso de catálisis fomentado por nanopartículas soportadas es más lento pero también presenta mayores porcentajes de degradación. En la zona superior de la figura se realiza el ajuste exponencial y en la zona inferior, se ajusta linealmente para obtener la razón de degradación.

La Figura 17 muestra la etapa final del proceso de degradación del azul de metileno en las placas, el azul de metileno se adhiere a la placa de vidrio, dejando el medio en el que se encuentra inmerso degradado en leucometileno.

La Tabla 7, muestra que aunque ambos procesos alcanzan niveles muy altos de degradación, el oro lo consigue en menor tiempo, comenzando muy acelerado y posteriormente disminuyendo la rapidez de degradación. La catálisis heterogénea ofrece las ventajas de separar fácilmente el azul de metileno del agua, con un tiempo de reacción más lento pero también más eficiente.

Muestra	Tiempo en alcanzar 50%	% máximo de degradación	K (Razón de degradación)
AgPlaca	10h	100	0.06/h
AuPlaca	2.4h	85	0.07/h

10

La Tabla 7, nos muestra que aunque ambos procesos alcanzan niveles muy altos de degradación, el oro lo consigue en menor tiempo, comenzando muy acelerado y posteriormente disminuyendo la rapidez de degradación. La catálisis heterogénea ofrece las ventajas de separar fácilmente el azul de metileno del agua, con un tiempo de reacción más lento pero también más eficiente.

15

Para las nanopartículas de oro, entre mayor sea la cantidad de precursor metálico las nanopartículas presentan mayor diversidad en tamaño y forma, con una proporción mayor en la forma cuasi-esférica. Si se duplica el volumen de precursor respecto al reductor surgen diversidad de formas en la muestra F, siempre manteniéndose mayoría cuasiesféricas, pero ya apareciendo cilindros y pirámides.

20

Mientras que para las nanopartículas de plata, entre mayor sea la cantidad de precursor metálico utilizada, se presenta el fenómeno de aglomeración. Con cantidades menores dan origen a nanopartículas con tamaños cercanos a los 10 nm.

25

En cuanto al uso de las nanopartículas en solución como aceleradores catalíticos, se observó que el oro es más rápido y estable en ambas proporciones en las que

fue utilizado, mientras que la plata entre menor sea la cantidad de partículas agregadas al azul de metileno, necesita de mayor tiempo para estabilizarse y comenzar con el proceso de degradación. El tiempo en el que se realiza la degradación es de 65 minutos, pero presenta un inconveniente ya que resulta complicado retirar los contaminantes de la muestra, sobre todo si se refiere a cantidades industriales.

Si las nanopartículas son soportadas en vidrio, el tiempo de reacción pasa de horas a días, pero ofrece mayor eficiencia en cuanto a la decoloración e industrialmente representa mayores facilidades para operarse, debido a que una vez que se retira el soporte de vidrio del agua, se lleva consigo los componentes del azul de metileno, dejando a la muestra limpia.

Las nanopartículas tanto de oro como de plata, tienen un fuerte potencial como biomateriales, ya sea que sean utilizadas en pacientes con quemaduras, para el caso de las nanopartículas de plata o como sensores biomédicos en el caso de las nanopartículas de oro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La Figura 1 es el espectro UV-Vis del extracto de tepezcohuite.
- La Figura 2 es una gráfica que muestra el porcentaje de inhibición DPPH.
- La Figura 3 muestra en a) los espectros de absorción UV-Vis para las muestras B, C y F; en b) se muestran los espectros para las muestras D y E junto al extracto.
- La Figura 4 corresponde a TEM de nanopartículas de oro (izquierda) muestras B,C,E y F, con sus distribuciones de tamaños (derecha).
- La Figura 5 es una gráfica que muestra los tamaños promedios de nanopartículas de oro en función a R .
- La Figura 6 es el espectro UV-Vis para nanopartículas de plata.
- La Figura 7 corresponde a TEM de población de nanopartículas de plata sin aglomeración.

- La Figura 8 es una gráfica que muestra la dispersión de tamaños para nanopartículas de plata.
- La Figura 9 muestra el azul de metileno y azul de metileno con nanopartículas de oro en solución.
- 5 • La Figura 10 muestra el azul de metileno y azul de metileno con nanopartículas de plata en solución.
- La Figura 11 corresponde a la gráfica de cinética de degradación de azul de metileno catálisis homogénea, muestras de oro y plata con 50 μ l de concentración.
- 10 • La Figura 12 corresponde a la gráfica de cinética de degradación de azul de metileno catálisis homogénea, muestras de oro y plata con 90 μ l de concentración.
- La Figura 13 muestra placas bañadas en nanopartículas de oro.
- La Figura 14 es el espectro UV-Vis para placa goteada con nanopartículas de oro.
- 15 • La Figura 15 es el espectro UV-Vis para placa goteada con nanopartículas de plata.
- La Figura 16 es una gráfica de la razón de decoloración para placa goteada con nanopartículas de oro y plata.
- 20 • La Figura 17 muestra la etapa final de catálisis heterogénea.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficientemente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad el contenido de las siguientes reivindicaciones:

1. Un método de síntesis verde de nanopartículas de oro, caracterizado porque comprende:

a) Proporcionar corteza del árbol *Mimosa tenuiflora*, cortar en trozos y pesar 15 g por cada 100 ml de mezcla de solventes;

b) Preparar una solución con los trozos de corteza y un solvente que comprende etanol y agua ultrapura en una relación de 70/30, respectivamente;

c) Verter el solvente en un contenedor cerrado y cubierto para evitar la evaporación y la foto-oxidación de las moléculas polifenólicas obtenidas en la extracción por maceración a temperatura ambiente (25°C), la cual dura 15 días;

d) Filtrar la solución para usarla como agente reductor en la producción de nanopartículas;

e) Proporcionar una solución acuosa de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4), con pureza del 99.9%, a una concentración de 0.01 M, como precursor metálico;

f) Proporcionar como reactivos el extracto obtenido de *Mimosa tenuiflora* como reductor, el ácido tetracloroaurico como precursor y agua como solvente;

g) Mezclar los reactivos en el orden precursor-solvente-reductor, y al agregar el último componente se procede a homogenizar en vortex;

h) Mantener la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas para completar la reacción de síntesis; y

i) Centrifugar la mezcla, retirar el sobrenadante, re-suspender el precipitado en agua ultrapura y sonicar para la re-dispersión de los nanomateriales.

2. Las nanopartículas de oro de conformidad con la reivindicación 1, caracterizadas porque tienen forma de triángulos, cuasiesferas, poliedros o varillas y están

recubiertas por moléculas de extracto de corteza del árbol *Mimosa tenuiflora*, pudiendo ser éstas taninos de *Mimosa*, saponinas triterpenoides o chalconas, y tienen un tamaño de 40 a 140 nm.

- 5 3. Las nanopartículas de oro de la reivindicación 2, caracterizadas porque exhiben actividad catalítica.

- 10 4. Uso de las nanopartículas metálicas con actividad catalítica de conformidad con las reivindicaciones 2 y 3 en forma de solución para la degradación catalítica de azul de metileno en agua, en donde las nanopartículas en solución son agregadas en un volumen necesario para formar un sistema que es expuesto a la luz ultravioleta o visible.

- 15 5. Uso de las nanopartículas metálicas con actividad catalítica de conformidad con las reivindicaciones 2 y 3 soportadas en vidrio para la degradación catalítica heterogénea de azul de metileno en agua, en donde las nanopartículas soportadas en vidrio se obtienen mediante el secado en horno por un periodo de 24 horas a una temperatura de 55°C y posteriormente divididas en rectángulos para colocarse en soluciones de agua con azul de metileno y exponerse a la luz
20 ultravioleta o visible.

RESUMEN

La invención consiste en un método de síntesis verde de nanopartículas de oro y plata utilizando extractos de la planta *Mimosa tenuiflora* como medio biológico y reductor, las cuales además exhiben actividad catalítica y microbicida. El método comprende obtener un extracto etanólico de la corteza del árbol para utilizarse como agente reductor en la producción de nanopartículas. En el caso de nanopartículas de oro se utiliza ácido tetracloroaúrico como precursor metálico; para las nanopartículas de plata se utiliza nitrato de plata. En ambos casos, utilizando agua como solvente, se mezclan los reactivos en el orden precursor-solvente-reductor, y al agregar el último componente se procede a homogenizar. La mezcla obtenida se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas para completar la reacción de síntesis. Las nanopartículas obtenidas, tanto de oro como de plata, se pueden utilizar en un método de degradación fotocatalítica de tintes contaminantes, como el azul de metileno, ya sea en solución o depositadas en un sustrato.

1/10

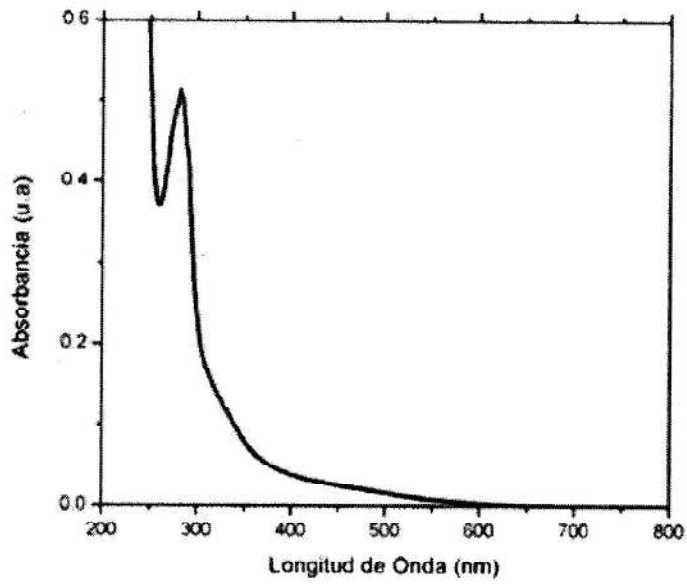


Figura 1

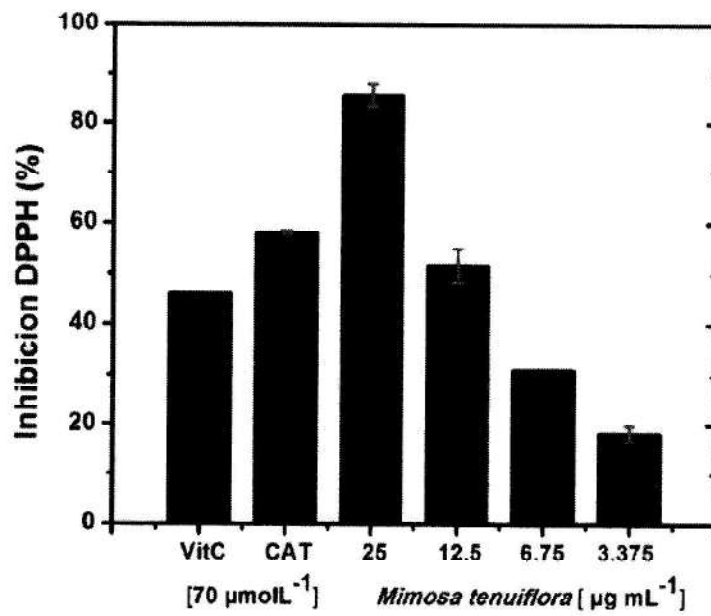


Figura 2

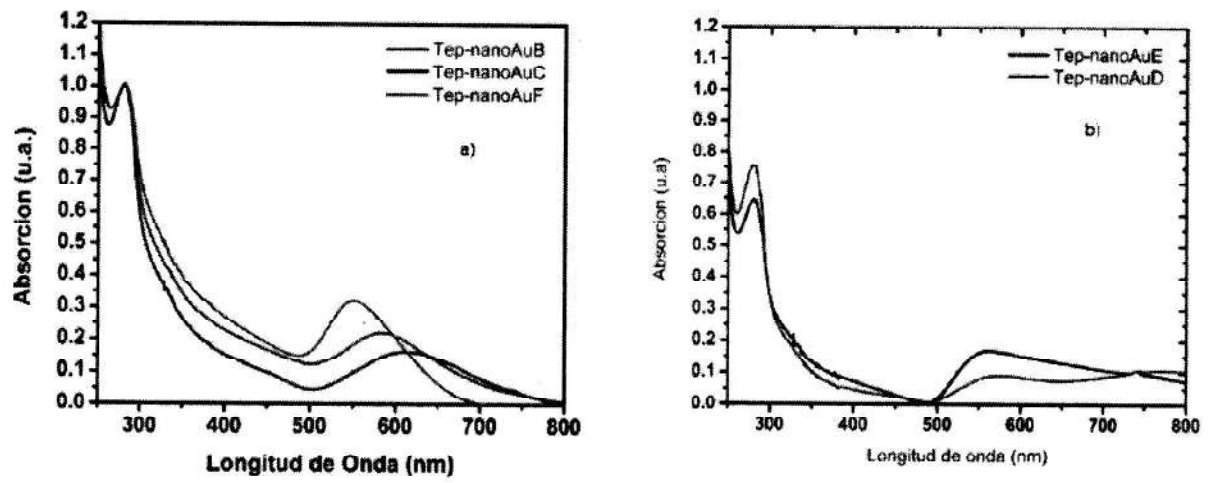


Figura 3

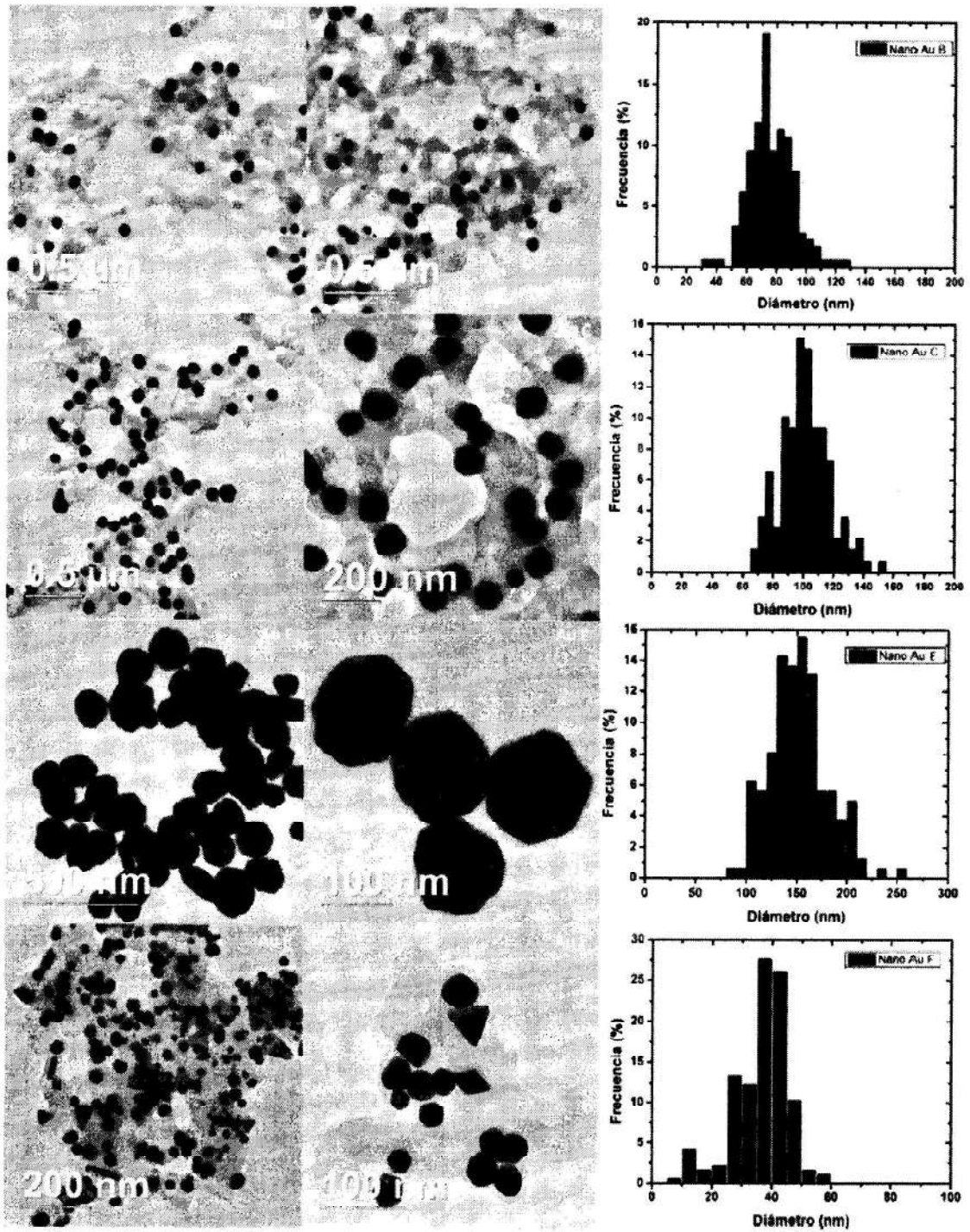


Figura 4

4/10

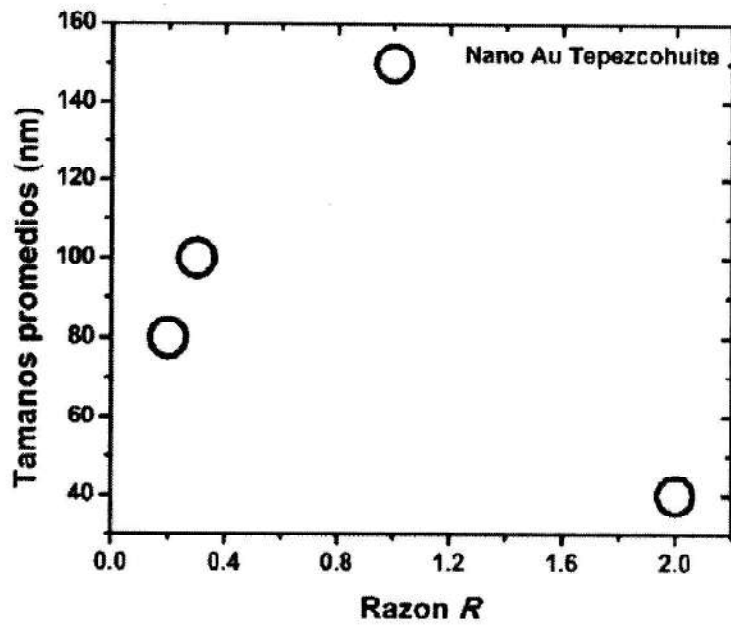


Figura 5

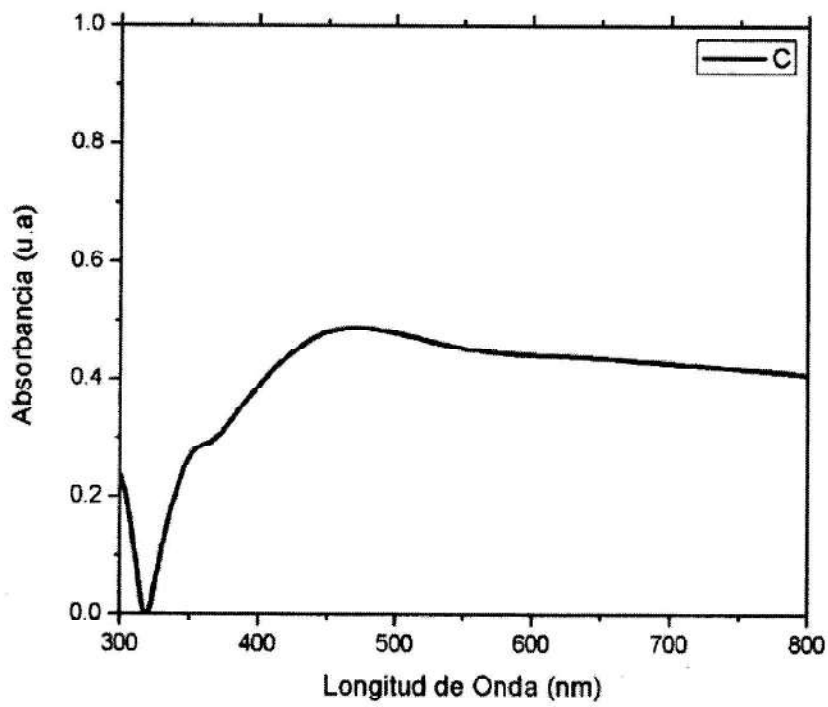


Figura 6

5/10

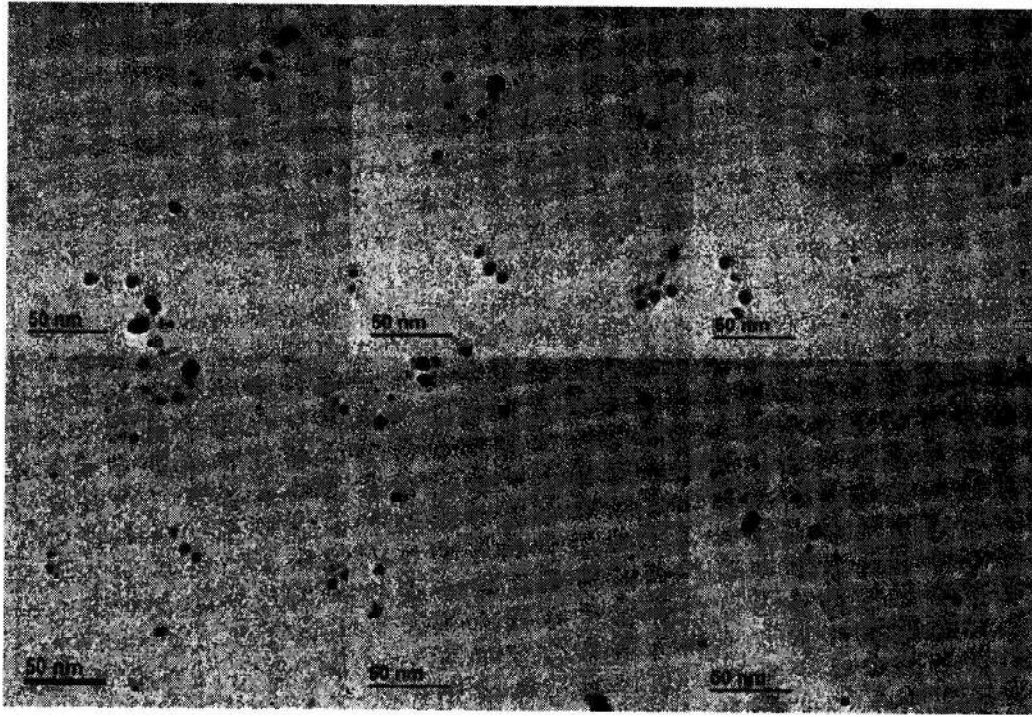


Figura 7

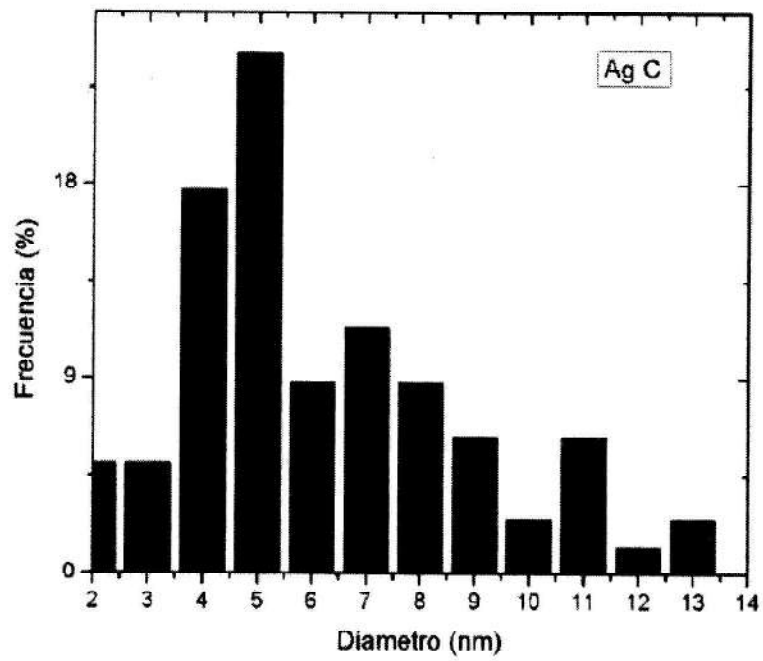


Figura 8

6/10



Figura 9

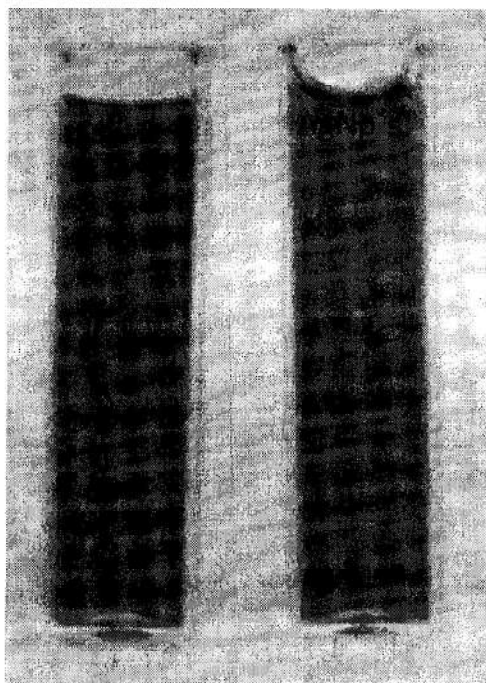


Figura 10

7/10

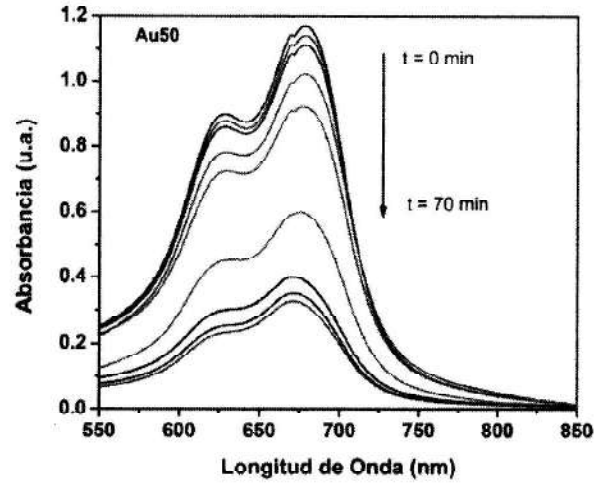
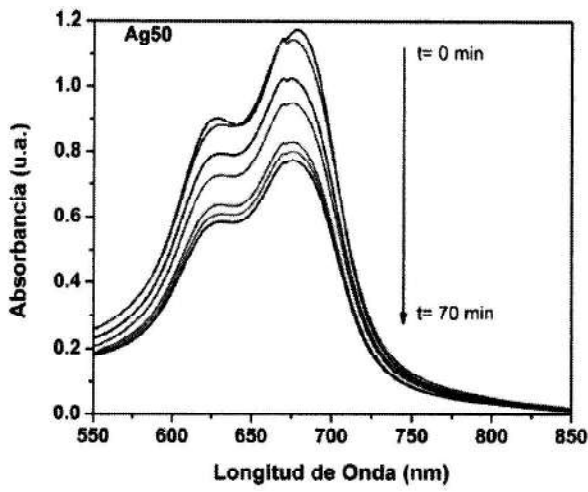


Figura 11

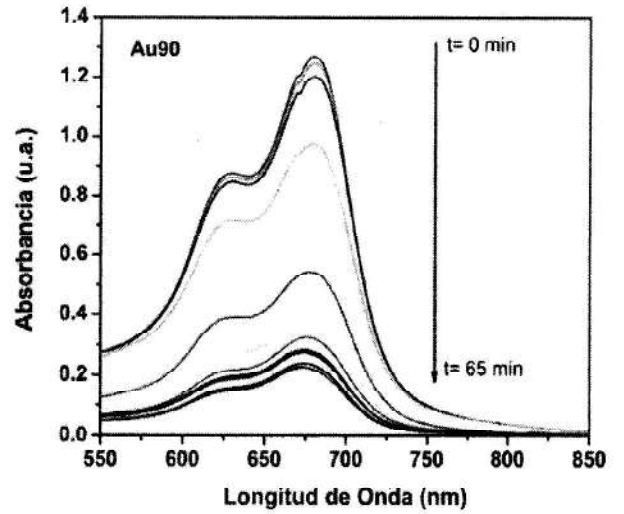
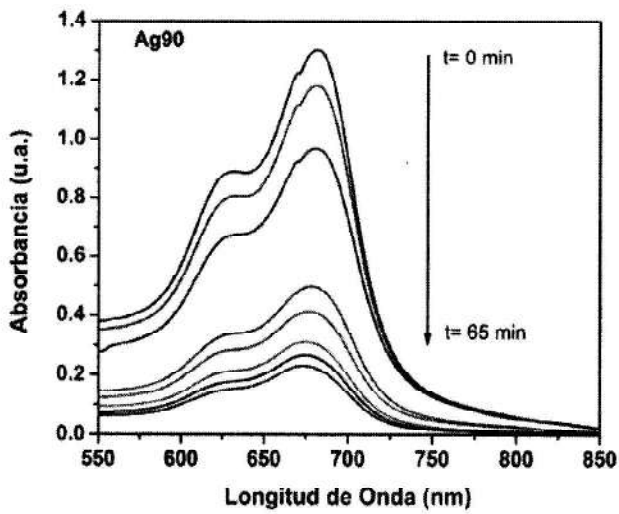


Figura 12

8/10

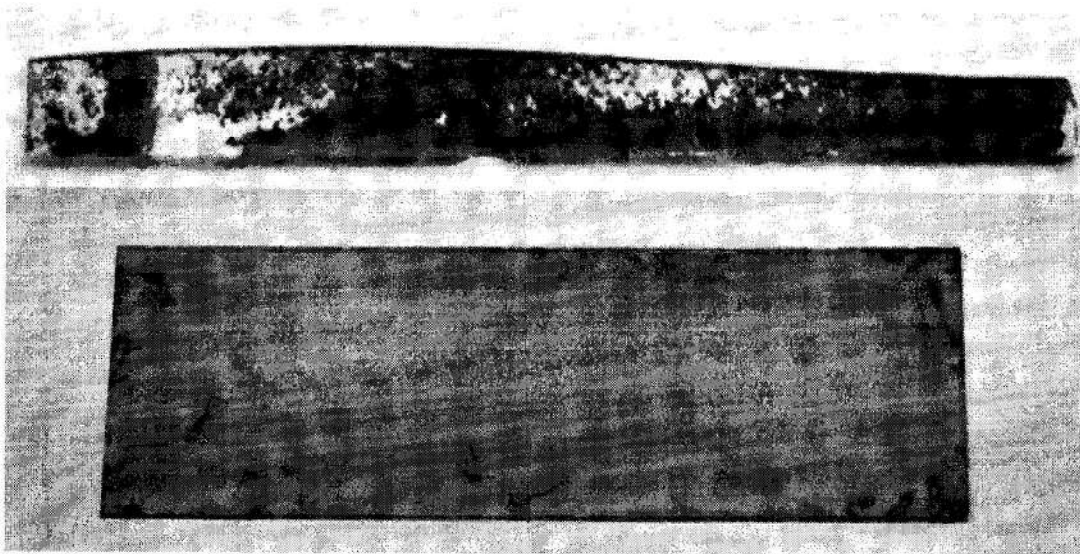


Figura 13

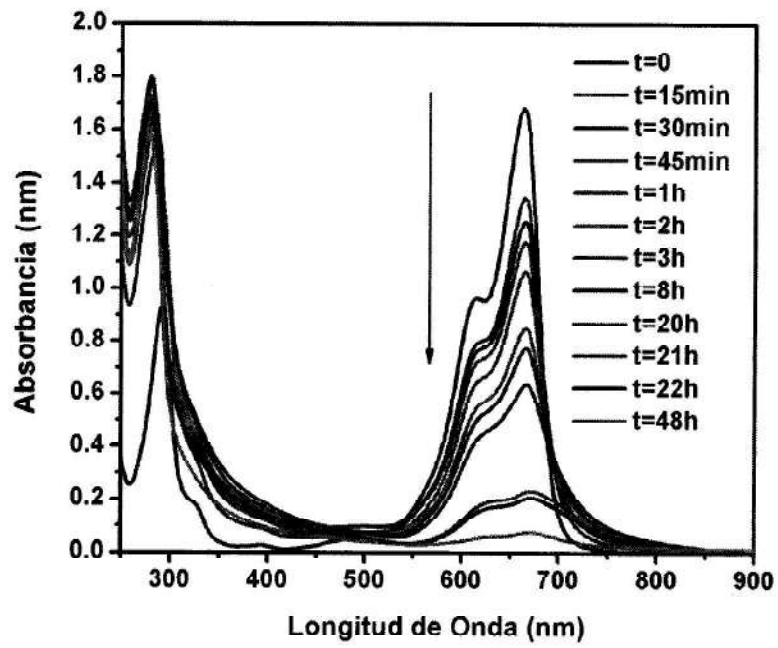


Figura 14

9/10

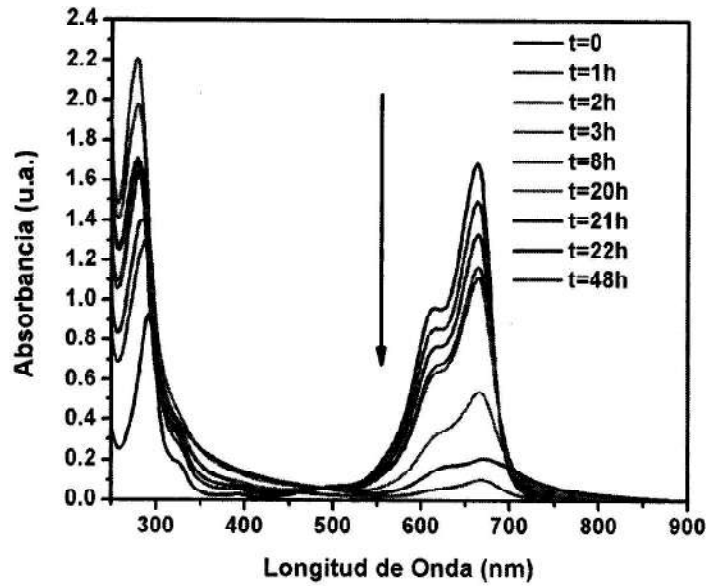


Figura 15

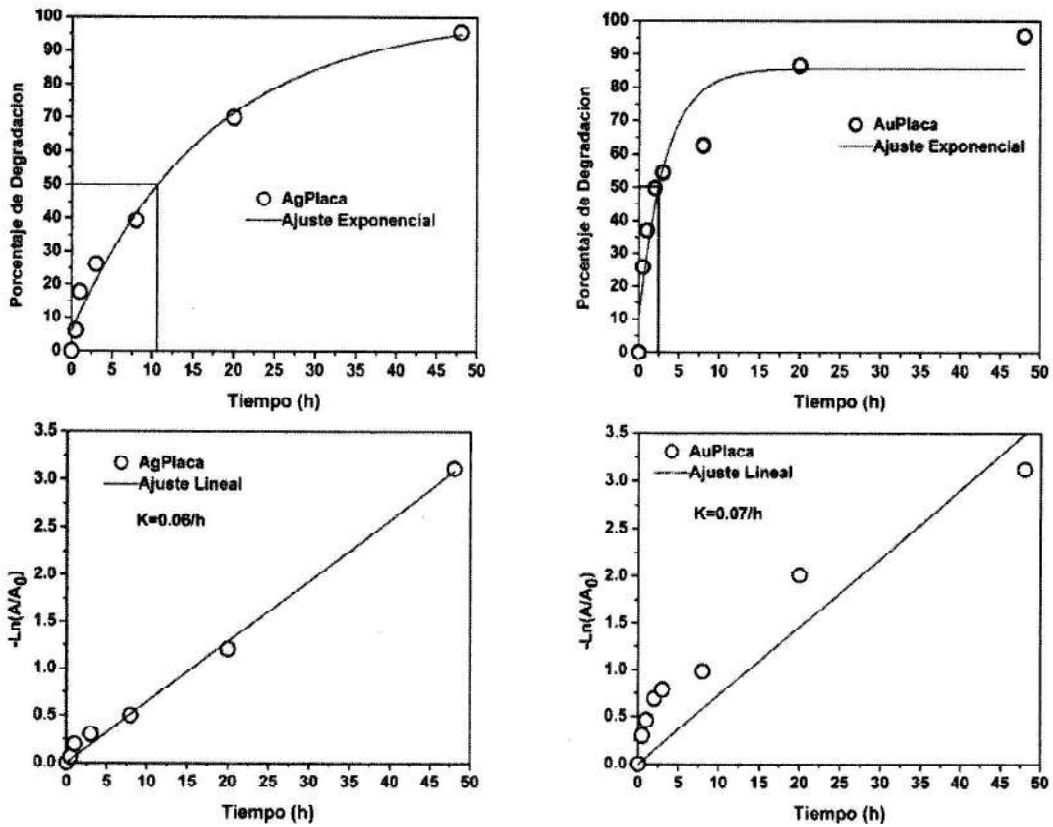


Figura 16

10/10

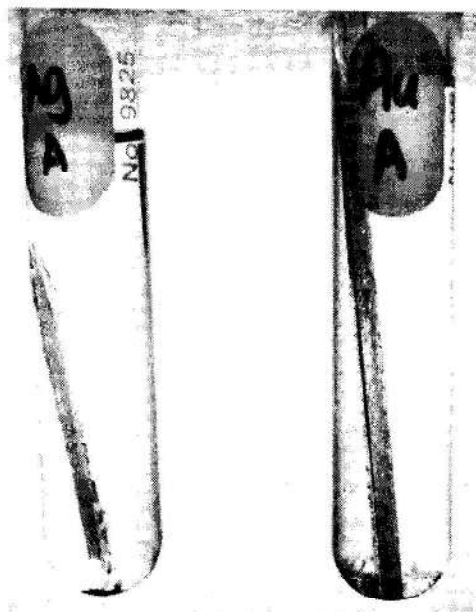


Figura 17