

Uso de micelas como nanoreactores para la preparación de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico y estudio *in vitro* de la actividad fototérmica en células HeLa

Ana María Pinilla Torres

Trabajo de Grado para Optar el Título de Magister en Química

Director

Fernando Martínez Ortega

Doctor en Química

Co-directoras:

Diana Blach Vargas

Doctora en Química

Stelia Carolina Méndez

Doctora en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

2018

“En medio del invierno, descubrí que había dentro de mí, un verano invencible.”

Albert Camus

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mis pasos y por haberme permitido realizar este proceso de formación

A mi familia por su apoyo y cariño durante la realización del proyecto.

Al profesor Fernando Martínez por guiarme en este proceso de formación como investigadora, y por brindarme su apoyo y amistad.

A la profesora Carolina Méndez, por orientarme en todos los aspectos relacionados con los ensayos biológicos.

A Diana Blach por sus enseñanzas, paciencia, y amistad.

A mis compañeros del laboratorio 402, por compartir conmigo los momentos buenos y difíciles del proyecto.

A Sare, Eliza y Andres, por su apoyo y cariño durante el desarrollo del proyecto.

A Viviana Ramírez por orientarme en lo relacionado con el mantenimiento del cultivo celular y la realización de los ensayos biológicos. También, por su amistad y paciencia.

A Angélica Neira, por brindarme su amistad y apoyo durante la última etapa del proyecto.

A todas las personas que conocí durante el desarrollo del proyecto, y que de una u otra forma brindaron su apoyo y aportes.

A Lucia por su colaboración y paciencia al realizar las mediciones en el fluorímetro y en el Zeta Sizer.

A la Universidad Industrial de Santander (proyecto Dief 1819) y a Colciencias (proyecto FP44842-507-2014, "*Es tiempo de Volver*") por el financiamiento recibido para realizar este trabajo de Investigación de la Maestría en Química.

Tabla de contenido

Introducción	18
Objetivos.....	21
Objetivo general	21
Hipótesis	21
Resumen del trabajo de investigación	21
1. Marco teórico.....	23
1.1. Terapia fototérmica	23
1.2. Conversión de luz a calor en las nanopartículas metálicas	24
1.3. Metodologías de síntesis para preparar NPs metálicas de tipo anisotrópico	25
1.4. Sistemas organizados como medios de reacción.....	26
1.4.1. Clasificación de los surfactantes de acuerdo a la carga de grupo de cabeza polar.....	27
1.4.2. Micelas directas	28
1.4.3. Micelas inversas	29
1.5. Síntesis basada en el uso de micelas como medio de reacción	30
1.5.1. Síntesis basada en micelas directas.....	31
1.5.2. Síntesis basada en micelas inversas.....	33
1.6. Funcionalización de nanopartículas metálicas: modificación química de la superficie.....	34
2. Estado de arte.....	35
2.1. Síntesis de NPs usando sistemas micelares como medios de reacción	35
2.2. Uso de NPs en terapia fototérmica.....	40
3. Sección experimental.....	44
3.1. Síntesis de nanopartículas de plata.....	44

MICELAS COMO NANOREACTORES

3.1.1. Síntesis de AgNPs empleando micelas directas de AOT/Agua	45
3.1.2. Síntesis de AgNPs empleando micelas directas compuestas de CTAB/Agua	45
3.1.3. Síntesis de AgNPs empleando micelas inversas compuestas de AOT/ Isooctano	46
3.2. Proceso de transferencia de fase/precipitación	46
3.2.1. Proceso de precipitación de las AgNPs obtenidas mediante micelas directas	46
3.2.2. Proceso de transferencia de fase de las AgNPs obtenidas mediante micelas inversas	47
3.3. Funcionalización de las nanopartículas de plata con ácido fólico (AgNPs@AF)	47
3.4. Caracterización de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico.....	47
3.4.1. Caracterización espectroscópica	47
3.4.2. Determinación del potencial Zeta	48
3.4.3. Caracterización microscópica.....	48
4. Resultados y discusión	49
4.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).....	49
4.2. Cinéticas de formación de las AgNPs.....	51
4.2.1. Cinética de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema AOT/agua.....	51
4.2.2. Cinética de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema AOT/isooctano	52
4.2.3. Cinética de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema CTAB/agua	53
4.3. Caracterización de las AgNPs sin funcionalizar	54
4.3.1. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema AOT/ agua.....	54
4.3.2. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema AOT/ Isooctano	58
4.3.3. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema CTAB/ agua	59
4.3.4. Determinación del potencial Zeta	62
4.4. Caracterización de las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico	63

4.4.1. Caracterización de la funcionalización de las AgNPs por UV-vis, fluorescencia y potencial Zeta--	64
4.4.2. Caracterización de la funcionalización de las AgNPs por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y raman.....	70
5. Fotoactivación de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico y su efecto en células HeLa.....	79
5.1. Sección experimental	79
5.1.1. Evaluación de la respuesta térmica de las soluciones de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico	79
5.1.2. Ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico en células HeLa con y sin irradiación con IRC.	81
5.2. Resultados y discusión	83
5.2.1. Respuesta térmica generada por la interacción de las nanopartículas de plata	83
5.2.2. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación (808 nm, potencia 800 mW)	87
5.2.3. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación (638 nm, potencia 650mW)	97
5.2.4. Comparación de los resultados obtenidos para las AgNPs y AgNPs@AF obtenidas mediante los tres sistemas micelares	104
6. Conclusiones	106
Bibliografía	108
Apéndices	119

Lista de figuras

<i>Figura 1.</i> Coeficientes de extinción de un tejido representativo y ventanas biológicas óptimas para realizar terapia fototérmica.	24
<i>Figura 2.</i> Proceso de conversión de luz a calor en nanopartículas metálicas.....	25
<i>Figura 3.</i> Representación de diferentes tipos de sistemas organizados (a) Micelas directas (b) micelas inversas (c) micelas cilíndricas (d) Fases lamelares planas (e) Fases lamelares en forma de anillo (f) Cilindros interconectados.	27
<i>Figura 4.</i> Representación de la estructura de una micela directa.	29
<i>Figura 5.</i> Representación de la estructura de una micela inversa.....	30
<i>Figura 6.</i> Determinación de la concentración micelar critica (CMC) por medio de mediciones de la conductividad eléctrica al variar la concentración de surfactante.....	31
<i>Figura 7.</i> Esquema del mecanismo para la formación de nanobarras usando micelas directas generadas con el surfactante CTAB.....	32
<i>Figura 8.</i> Proceso de síntesis de nanopartículas de tipo inorgánico de micelas inversas.	33
<i>Figura 9.</i> Estructura del ácido fólico	35
<i>Figura 10.</i> Gráfica λ_{max} del colorante azul de metileno de concentración $1,6 \times 10^{-4}$ M versus Log [Surfactante] indicando el punto correspondiente a la CMC del sistema.	50
<i>Figura 11.</i> Seguimiento de la reacción de formación de las de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/agua.....	52
<i>Figura 12.</i> Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/isooctano.....	53
<i>Figura 13.</i> a) Espectros UV-vis de la solución de semillas b) Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs obtenidas mediante el sistema CTAB/agua.	54

Figura 14. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/ agua
(b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d) Determinación de
planos cristalográficos. 55

Figura 15. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/
isooctano b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d)
Determinación de planos cristalográficos. 58

Figura 16. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/
isooctano b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d)
Determinación de planos cristalográficos. 60

*Figura 17.*a) Espectro UV-vis de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar
AOT/agua b) Espectro de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas mediante el
sistema micelar AOT/agua c) Espectro UV-vis de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema
AOT/ isooctano d) Espectros de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas mediante
el sistema micelar AOT/ agua. 65

*Figura 18.*a) Espectro UV-vis de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar
CTAB/agua b) Espectro de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas mediante el
sistema micelar CTAB/agua. 67

Figura 19. Representación de los dos posibles mecanismos de estabilización del surfactante CTAB
a) Formación de una bicapa en las AgNPs b) Presencia de clúster micelares que rodean la superficie
de las AgNPs. 68

Figura 20. Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y AOT. (Sistema AOT/agua)
..... 71

<i>Figura 21.</i> Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y CTAB. (Sistema CTAB/agua).....	73
<i>Figura 22.</i> Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y AOT (Sistema AOT/isooctano).....	76
<i>Figura 23.</i> Espectros de Raman a) AF libre b) AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y CTAB.....	79
<i>Figura 24.</i> Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AgNPs con y sin funcionalización.....	80
<i>Figura 25.</i> Montaje experimental dentro de una cabina de flujo laminar para la irradiación con IRC de las células tratadas con AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar obtenidas mediante los tres sistemas micelares propuestos.	83
<i>Figura 26.</i> Curvas de calentamiento de las soluciones de AgNPs solubilizadas en medio EMEM irradiadas con el láser de 638 nm y una potencia de 650 mW. La temperatura inicial fue 21.4 °C.	84
<i>Figura 27.</i> Micrografía de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/ isooctano en la cual se evidencia la formación de algunos agregados.	86
<i>Figura 28.</i> Curvas de calentamiento de las soluciones de AgNPs solubilizadas en medio EMEM irradiadas con el láser de 808nm y una potencia de 800 mW. La temperatura inicial fue 21.4 °C.	86
<i>Figura 29.</i> Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs funcionalizadas (Ag@AF) y no funcionalizadas (Ag) sintetizadas por medio del sistema micelar AOT/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y	

4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo 5 min. 88

Figura 30. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs no funcionalizadas y funcionalizadas (Ag@AF), sintetizadas por medio del sistema micelar CTAB/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μM , Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μM , Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μM , control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas. *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo 5 min.91

Figura 31. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/isooctano. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μM , Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μM , Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μM , control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación 5 min. 94

Figura 32. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μM , Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μM , Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μM , control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min..... 98

Figura 33. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar CTAB/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μM , Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μM , , Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μM , control:

Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min..... 100

Figura 34. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/isooctano. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μM , Ag 1/2 y Ag@AF 1/2: 100 μM , Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μM , control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min..... 102

Lista de tablas

Tabla 1.Comparación de las concentraciones usadas en los procesos de síntesis con el valor de la CMC.....	51
Tabla 2.Valores de potencial Zeta de las AgNPs obtenidos en cada uno de los sistemas micelares.	62
Tabla 3.Valores de potencial Zeta de las AgNPs@AF obtenidos en cada uno de los sistemas micelares.	69
Tabla 4.Algunas asignaciones de las bandas de FTIR del AF libre y de AgNPs@AF (Sistema AOT/agua).	71
Tabla 5. Asignaciones de las bandas de FTIR del AF libre y de AgNPs@AF (Sistema AOT/isooctano).....	76
Tabla 6.Concentraciones iniciales de Ag usadas en los proceso de síntesis usando micelas como medios de reacción.....	80
Tabla 7.Concentraciones de las AgNPs usadas para los ensayos biológicos con células HeLa...	82

Lista de apéndices

Apéndice A.Fotografías de los cambios de coloración a través del tiempo de las AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar AOT/ agua.....	119
Apéndice B.Fotografía de la coloración final de AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar AOT/ isooctano.	119
Apéndice C.A) Solución de “Semillas” B) Coloración final de las AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar CTAB/ agua.	120
Apéndice D.Espectros Raman de las AgNPs, AgNPs@AF, sintetizadas a través de los sistemas micelares AOT/agua y AOT/isooctano.....	120
Apéndice E.Asignaciones de las bandas Raman del ácido fólico libre	120

RESUMEN

TÍTULO: Uso de micelas como nanoreactores para la preparación de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico y estudio *in vitro* de la actividad fototérmica en células HeLa *

AUTORA: Ana Maria Pinilla Torres**

PALABRAS CLAVES: micelas, nanopartículas de plata, ácido fólico, efecto fototérmico

DESCRIPCIÓN:

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se han utilizado en aplicaciones biomédicas como agentes antimicrobianos. Sin embargo, sus propiedades ópticas han abierto nuevos campos de aplicación, como la terapia fototérmica. La selectividad de estos materiales se puede modificar a través de su funcionalización con diferentes moléculas, como el ácido fólico (AF), que es reconocido por los receptores de folato sobreexpresados en algunos tipos de células cancerosas.

En este trabajo, se sintetizaron AgNPs anisotrópicas funcionalizadas con AF a través de tres metodologías diferentes basadas en el uso de micelas directas (MD) y micelas inversas (MI) de bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y se evaluó su efecto fototérmico en las células HeLa. La citotoxicidad de los AgNP con y sin irradiación se evaluó mediante el método MTT. Las AgNPs se funcionalizaron con AF y se incubaron durante 2 y 4 horas en células HeLa y después de eso se irradiaron con diodos láser de 808 nm y 638 nm.

Los resultados mostraron que las AgNPs anisotrópicas se obtuvieron de forma efectiva en los sistemas de MD. En el caso del sistema compuesto por MI, se obtuvieron esferas con un tamaño de partícula de 5-25 nm, mientras que en los sistemas compuestos por MD, se obtuvieron barras y triángulos con un tamaño de partícula de 20-80 nm. Los ensayos de viabilidad celular demostraron que la funcionalización con AF disminuye la citotoxicidad de las AgNPs. Las AgNPs funcionalizadas sintetizadas a través de los tres sistemas mostraron ser potenciales agentes fototérmicos, llegando a reducir hasta 65.2% de la viabilidad de las células HeLa, utilizando un láser de 808 nm, y hasta el 50% de la viabilidad celular usando el láser a 638 nm en un tiempo de tratamiento de 4 horas.

*Trabajo de grado

**Facultad de ciencias básicas. Escuela de Química. Director: Fernando Martínez Ortega, doctor en química. Co-directoras: Diana Blach y Stelia Carolina Méndez, doctoras en química.

ABSTRACT

TITLE: Use of micelles as nanoreactors for the preparation of functionalized silver nanoparticles with folic acid and in vitro study of photothermal activity in HeLa cells*

AUTHOR: Ana Maria Pinilla Torres**

KEYWORDS: Micelles, silver nanoparticles, folic acid, photothermal effect.

DESCRIPTION:

Silver nanoparticles (AgNPs) have been used in biomedical applications as antimicrobial agents. However, their nanoscale optical properties have opened new fields of application such as photothermal therapy. The selectivity of these materials can be modified through their functionalization with different molecules, such as folic acid (FA), which is recognized by folate receptors overexpressed in some types of cancer cells.

In this work, we synthesized anisotropic AgNPs functionalized with FA through three different methodologies based on the use of direct micelles(DM) and reverse micelles(RM) of bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium (AOT) and cetyl trimethylammonium bromide(CTAB) and evaluated their photothermal effect in HeLa cells. The cytotoxicity of AgNPs with and without irradiation were evaluated using the MTT method. AgNPs were functionalized with FA and they were incubated for 2 and 4 hours in HeLa cells and after that they were irradiated with diodes laser of 808 nm and 638 nm.

The results showed that anisotropic AgNPs was effectively obtained DM systems. In the case of the system composed of RM, spheres with particle size of 5-25 nm were obtained, whereas in the systems composed of DM, rods and triangles with particle size of 20-80 nm were obtained. Cell viability assays showed that functionalization with FA decrease the cytotoxicity of the AgNPs. The functionalized AgNPs synthesized by the three systems showed to be effective potential photothermal agents, reaching to reduce up to 65.2% of the viability of the HeLa cells, using an 808nm laser, and up to 50% of the cell viability using the laser a 638nm under a treatment time of 4 hours.

*Master Thesis

**Facultad de ciencias básicas. Escuela de Química. Director: Fernando Martínez Ortega, doctor en química. Co-directoras: Diana Blach y Stelia Carolina Méndez, doctoras en química

Introducción

La nanotecnología se puede definir como el proceso de creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales mediante el control de la materia a escala atómica y molecular. Las propiedades de los materiales como la temperatura de fusión, la conductividad térmica, la conducción electrónica, e incluso el color de un material presentan variaciones a escala nanométrica (Dahman, 2017). Estas variaciones en las propiedades, han permitido su uso en el diagnóstico y tratamiento de los diferentes tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de cuello uterino, el cual representa una importante causa de mortalidad en las mujeres a nivel mundial (Siegel, Miller, & Jemal, 2017). El interés de usar materiales a escala nanométrica en terapias contra el cáncer se deriva del hecho de que estos presentan propiedades electromagnéticas y ópticas, que difieren de forma significativa con respecto a cuándo estos materiales se encuentran a escala macro (Lim & Gao, 2016). Un tipo de nanomaterial que ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas, son las nanopartículas (NPs) metálicas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs), las cuales presentan el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial localizado (RPSL), que consiste en una oscilación colectiva y coherente de los electrones de la banda de conducción de las NPs. Este fenómeno ocurre cuando la radiación electromagnética incidente presenta una frecuencia de resonancia similar a la de oscilación de los electrones de la banda de conducción de la NP (Willels & Van Duyne, 2007). Esta propiedad permite que la NP sea un convertidor de energía radiante en energía calórica, lo cual ha sido aprovechado para implementar terapias selectivas contra el cáncer, entre las cuales se encuentra la terapia fototérmica; en la cual se busca la muerte selectiva de las células cancerosas a través del aumento de temperatura localizado, que se genera ante la interacción de las NPs con radiación (Lim & Gao, 2016).

Para poder garantizar la selectividad de este tipo de terapias, se requiere que las NPs estén funcionalizadas con alguna molécula que les confiera la capacidad de ingresar selectivamente a las células cancerosas. Un ejemplo de molécula que ha sido comúnmente utilizada para este fin, es el ácido fólico (Boca-Farcau et al., 2014; H. Li, Cheng, Liu, & Chen, 2016; Xu et al., 2017), debido a que se ha observado que algunas líneas celulares de cáncer entre ellas las de cáncer de cuello uterino, presentan una sobreexpresión de los receptores folato en comparación con las células normales, permitiendo así que las NPs se internalicen de forma selectiva en las células cancerosas a través un proceso de endocitosis mediada por receptores (Mehra, Mishra, & Jain, 2013). Según estudios realizados previamente, el tamaño óptimo de las nanopartículas para que ingresen por medio de este mecanismo es 40–50 nm (Cho et al., 2013).

Con relación al tipo de nanopartículas más apropiadas para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas, como la terapia fototérmica, diversos autores han propuesto el uso de nanopartículas anisotrópicas de metales nobles debido a sus propiedades físicas y químicas, como por ejemplo su significativa absorción óptica en el rango IRC, conductividad térmica, estabilidad química, y biocompatibilidad. Este tipo de nanopartículas presentan formas diferentes a las esferas simétricas, entre ellas nanobarras, nanoprismas, nanocubos, nanoestrellas, y nanoestructuras dendríticas (Paramasivam, Kayambu, Rabel, Sundramoorthy, & Sundaramurthy, 2017). La forma final de las NPs está determinada por el control cinético o termodinámico durante el proceso de crecimiento de los núcleos en la síntesis. Cuando el proceso de crecimiento es direccionado bajo control termodinámico, el resultado es la formación de nanoesferas, mientras que bajo un control cinético el crecimiento de los nanocristales resulta en la formación de nanopartículas anisotrópicas (Berhault et al., 2007). Este tipo de nanopartículas han sido sintetizadas por gran variedad de metodologías entre las que están las metodologías basadas en el uso de micelas como medios de

reacción. Estas metodologías presentan ciertas ventajas, como por ejemplo, la facilidad para controlar el tamaño y la forma de las partículas obtenidas, a partir de variaciones en el sistema de reacción. Entre las condiciones que generalmente se varían están las concentraciones de los precursores, el tipo de agentes reductores utilizados, y el tipo de surfactante usado para generar las micelas (Paramasivam et al., 2017). El papel que juega el surfactante en este tipo de síntesis es importante, ya que este tipo de moléculas presentan generalmente iones que llegan a adsorberse sobre ciertas facetas cristalinas de la partícula, permitiendo así que el crecimiento se de en diferentes direcciones (Sajanlal, Sreeprasad, Samal, & Pradeep, 2011).

En el presente proyecto se sintetizaron AgNPs anisotrópicas funcionalizadas con ácido fólico mediante dos metodologías basadas en el uso de nanoreactores micelares (micelas directas y micelas inversas). Los surfactantes usados para la formación de las micelas fueron 1,4-bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) y Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Las AgNPs obtenidas se evaluaron en células cancerosas tipo Hela, como agentes capaces de causar la muerte selectiva por hipertermia tras irradiación con dos láseres cuyas longitudes de onda fueron 808nm y 638nm.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto fototérmico en células tipo HeLa de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico, preparadas mediante nanoreactores micelares.

Objetivos específicos:

- Evaluar diferentes condiciones de síntesis de nanopartículas de plata con y sin funcionalización por medio de nanoreactores micelares, con el fin de tener un mayor control sobre la forma, el tamaño, y la estabilidad.
- Evidenciar la formación y funcionalización de las nanopartículas plata, mediante técnicas espectroscópicas, microscópicas y DLS.
- Estudiar las condiciones apropiadas para lograr la activación térmica de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico.
- Evaluar el efecto térmico de las nanopartículas funcionalizadas en células HeLa al irradiar con IRC.

Hipótesis

Es posible que las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico al ser irradiadas con luz infrarroja cercana generen un aumento localizado de temperatura, capaz de causar hipertermia en las células cancerosas tipo HeLa.

Resumen del trabajo de investigación

Capítulo 1.

Este capítulo se enfoca en dar una descripción de las propiedades y las diferentes metodologías de síntesis que han sido utilizadas para preparar AgNPs, haciendo énfasis en las metodologías basadas

en sistemas micelares. Adicionalmente, se describen algunos aspectos claves de este trabajo como lo son la funcionalización de las AgNPs, la terapia fototérmica, y los receptores folato.

Capítulo 2.

En este capítulo se da una descripción de los trabajos más relevantes relacionados con las dos áreas principales de este trabajo: Síntesis de AgNPs por medio de sistemas micelares y terapia fototérmica.

Capítulo 3.

En este capítulo se realiza una descripción detallada de las metodologías utilizadas para realizar la síntesis de las NPs, y de las técnicas que se utilizaron para realizar la caracterización de las AgNPs y las AgNPs@AF.

Capítulo 4.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la síntesis realizada mediante cada uno de los sistemas micelares, y la respectiva caracterización de las AgNPs y las AgNPs@AF.

Capítulo 5.

En este capítulo se indican los procedimientos de irradiación (808nm y 638nm) tanto de las soluciones de AgNPs y AgNPs@AF solubilizadas en medio EMEM, como de las células HeLa que fueron incubadas con las AgNPs. Adicionalmente, se describen las condiciones del cultivo celular y del ensayo realizado para determinar la viabilidad celular (MTT).

Los ensayos biológicos fueron realizados en el grupo de investigación en Bioquímica y Microbiología bajo la dirección de la Dra. Stelia Carolina Méndez.

1. Marco teórico

1.1. Terapia fototérmica

La terapia fototérmica en la actualidad ha ganado importancia como una alternativa de tratamiento contra el cáncer debido a su carácter mínimamente invasivo. Este enfoque terapéutico es basado en el uso de nanopartículas que permiten un aumento local de la temperatura (hipertermia) tras la irradiación con láser del tumor, donde la luz interactúa con nanopartículas que absorben la radiación y la convierten en calor, dando lugar a un proceso de muerte celular. Este aumento de temperatura es particularmente eficaz para causar la muerte celular debido a que las estructuras vasculares del tumor presentan un incremento de la susceptibilidad ante un aumento de la temperatura en un rango de 40 y 44 °C, debido a ciertas condiciones de las células cancerosas como el bajo pH del medio celular y condiciones de poco oxígeno (Lim & Gao, 2016).

Por lo tanto, el gran reto para lograr que este tipo de terapias logren su propósito, es generar nanopartículas cuyo rango de absorción se encuentre en la región del infrarrojo cercano. La razón es que los coeficientes de absorción de la hemoglobina y oxihemoglobina en la sangre obstaculizan fuertemente la penetración de la luz visible, mientras el agua es un absorbente eficaz en longitudes de onda más altas. Sin embargo, se encontró que existen dos "ventanas de transparencia biológica" en la región del IR: a 650-950 nm y 1000 a 1350 nm (Figura 1.), en la que la transmisión óptima a través del tejido se consigue por una combinación de baja dispersión y baja absorción de energía, proporcionando la máxima penetración de la radiación y la minimización de la auto fluorescencia (Jaque et al., 2014). Este hallazgo ha motivado la investigación hacia la generación de nanopartículas metálicas cuya banda de plasmón se encuentre en la región del IRC, y además

lograr su conjugación con diferentes moléculas, que garanticen la selectividad necesaria en este tipo de tratamientos.

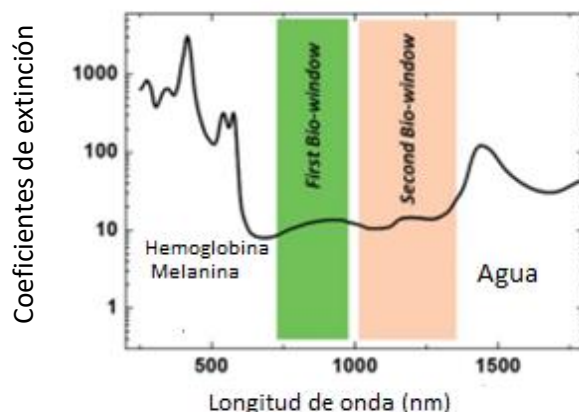


Figura 1. Coeficientes de extinción de un tejido representativo y ventanas biológicas óptimas para realizar terapia fototérmica. Adaptado de Jaque, D., Martínez Maestro, L., del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., García Solé, J. (2014). Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*, 6(16), 9494–9530. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C4NR00708E>.

1.2. Conversión de luz a calor en las nanopartículas metálicas

Las nanopartículas de metálicas presentan una interacción eficiente con la luz, lo que resulta en la liberación de energía a través de dos mecanismos principales: la dispersión, es decir, la liberación de fotones con la misma frecuencia; o absorción, es decir, la conversión de los fotones en fonones o calor (Aberasturi, Serrano-Montes, & Liz-Marzán, 2015). La eficiencia relativa de la absorción y la dispersión por una nanopartícula específica puede ser cuantificada a través de la denominada eficiencia fototérmica, que depende fuertemente de la morfología y el tamaño de las nanopartículas (de Aberasturi et al., 2015). La respuesta de calentamiento de nanopartículas ha sido ampliamente estudiada. De hecho, la generación de calor puede ser visto como una cascada de procesos, como se ilustra en la Figura 2.

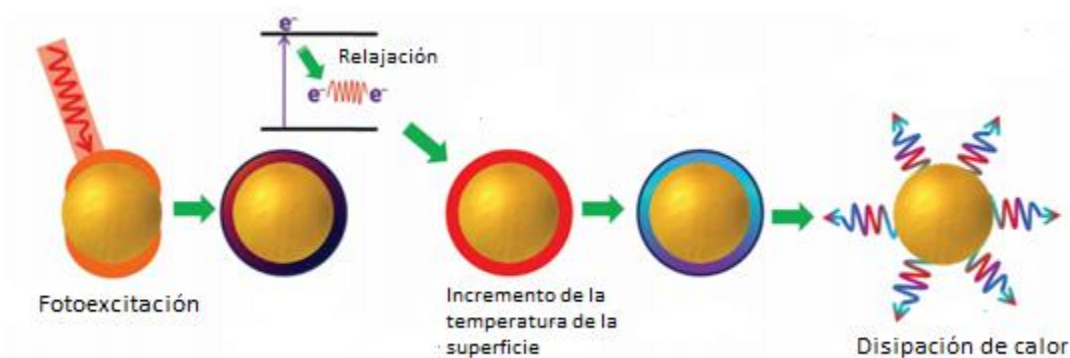


Figura 2. Proceso de conversión de luz a calor en nanopartículas metálicas. Adaptado de Aberasturi, D. J., Serrano-Montes, A. B., & Liz-Marzán, L. M. (2015). Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Advanced Optical Materials*, 3(5), 602–617. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/adom.201500053>.

1.3. Metodologías de síntesis para preparar NPs metálicas de tipo anisotrópico

Uno de los métodos más sencillos para sintetizar NPs metálicas es través del uso de un exceso de un agente reductor fuerte, como el borohidruro de sodio, el cual ha sido ampliamente usado para reducir precursores metálicos como el nitrato de plata (AgNO_3) y el ácido tetracloroáurico ($[\text{AuCl}_4]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en medio acuoso (Mulfinger et al., 2007). Mediante este tipo de metodología se obtienen nanopartículas de plata esféricas, las cuales han sido comúnmente utilizadas en aplicaciones como agentes antimicrobianos (Prema, 2011). Sin embargo, para otros tipos de aplicaciones se requiere que las NPs tengan otras formas (anisotrópicas), como nanobarras, nanotriángulos o nanocubos, cuyas bandas de plasmón se encuentren en la región del infrarrojo cercano, que es la región más adecuada para lograr efectividad en aplicaciones biológicas como la terapia fototérmica del cáncer. Para lograr generar este tipo de NPs existen gran variedad de metodologías (Sau & Rogach, 2010), entre las que cabe resaltar:

- a) Método de reducción a alta temperatura
- b) Métodos electroquímicos
- c) Métodos fotoquímicos
- d) Biosíntesis
- e) Síntesis basada en el uso de micelas como medio de reacción

Esta última metodología ha sido de gran interés en los últimos años, debido a que presenta numerosas ventajas, las cuales están asociadas con el control de la forma y el tamaño de partícula, y la estabilidad de estas a través del tiempo (Niederberger & Pinna, 2009).

1.4. Sistemas organizados como medios de reacción

Los sistemas organizados hacen referencia a como las moléculas de surfactante se asocian en un medio fluido para formar diferentes tipos de estructuras como por ejemplo micelas directas, inversas, estructuras lamelares, entre otras (Figura 3.). Entre los parámetros asociados con el proceso de formación de estas estructuras está el parámetro de empaquetamiento (N_s). Este parámetro controla las variaciones de las fuerzas que juegan un papel clave en la formación de los agregados de surfactante. El efecto colectivo de las fuerzas que actúan simultáneamente en las diferentes moléculas (agua, surfactante y aceite), y también en diferentes partes de la misma molécula de surfactante determinan la estructura que se generara.

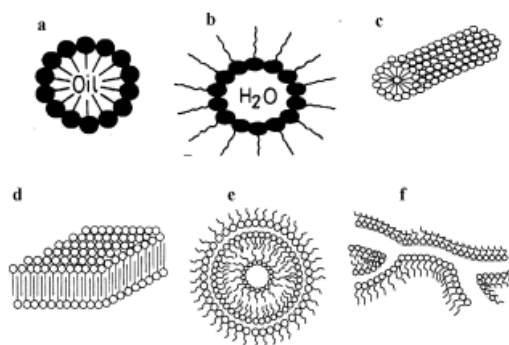


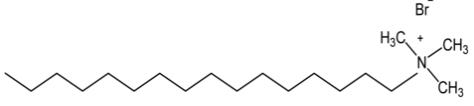
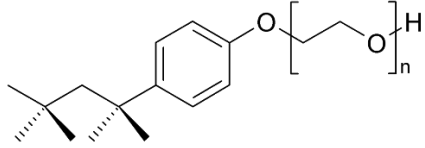
Figura 3. Representación de diferentes tipos de sistemas organizados (a) Micelas directas (b) micelas inversas (c) micelas cilíndricas (d) Fases lamelares planas (e) Fases lamelares en forma de anillo (f) Cilindros interconectados. Adaptado de Ganguli, A. K., Ganguly, A., & Vaidya, S. (2010). Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chem. Soc. Rev.*, 39(2), 474–485. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/B814613F>.

En el presente trabajo se usaron micelas inversas y directas como medios de reacción para generar nanopartículas de plata anisotrópicas.

1.4.1. Clasificación de los surfactantes de acuerdo a la carga de grupo de cabeza polar

Tipo Surfactante	Propiedades	Ejemplo
Aniónico	-Cargados negativamente. -Grupos funcionales: Sales de ácidos sulfónicos Sulfatos de alcoholes Sulfonatos bencenalquílicos Sales de ácido carboxílicos -Baja toxicidad.	1,4 – bis- (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT).
Catiónico	-Cargados positivamente -Acción antibacteriana	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

MICELAS COMO NANOREACTORES

	-Grupos funcionales Aminas de cadena larga solubles a $\text{pH} < 7$ e insolubles a $\text{pH} > 7.2$; Sales de amonio cuaternario.	
No iónico	-Grupos de cabeza hidrofílicos -Grupos funcionales: Alcohol etoxilado Alquilfenol etoxilado Alcanolamidas - Baja toxicidad	Triton X-100 

1.4.2. Micelas directas

Este tipo de agregados se generan cuando las moléculas de surfactante son solubilizadas en medio acuoso, dando lugar a que el surfactante se oriente de forma tal que sus cabezas hidrofílicas apunten hacia la fase acuosa externa, y sus colas lipofílicas apunten hacia la fase orgánica, como se observa la figura 4. Este tipo de estructuras pueden adoptar diferentes geometrías dependiendo del contenido de agua en la fase externa y del tipo de surfactante. (Ganguli et al., 2010).

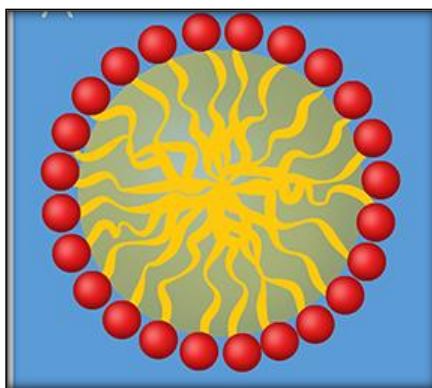


Figura 4. Representación de la estructura de una micela directa. Adaptado de Garza G. (2015) Proteínas atrapadas en micelas. Revista Digital Universitaria, 16(1). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art04/index.html>.

1.4.3. Micelas inversas

Este tipo de agregados se generan cuando las moléculas de surfactante son solubilizadas en un solvente orgánico, dando lugar a que el surfactante se oriente de forma tal, que sus colas lipofílicas apunten hacia el solvente orgánico, y sus cabezas hidrofílicas apunten hacia la fase acuosa (Figura 5.). El tamaño de gota de las micelas inversas puede ser modulado, a través un parámetro denominado W_o ($W_o = [\text{agua}] / [\text{surfactante}]$). (Pileni, 1989) La capacidad que tienen este tipo de agregados para encapsular moléculas polares como el agua, ha permitido que estos puedan ser usados como sistemas de nanoreactores para sintetizar diferentes tipos de nanoestructuras de tipo inorgánico, como por ejemplo AgNPs y de AuNPs (Ganguli et al., 2010). Una de las ventajas de este método de síntesis es la posibilidad de tener el control del diámetro de las NPs que se forman durante el proceso de síntesis, a partir de la variación de ciertos parámetros como tipo y concentración de surfactante, precursores, W_o , entre otros (Ganguli et al., 2010):

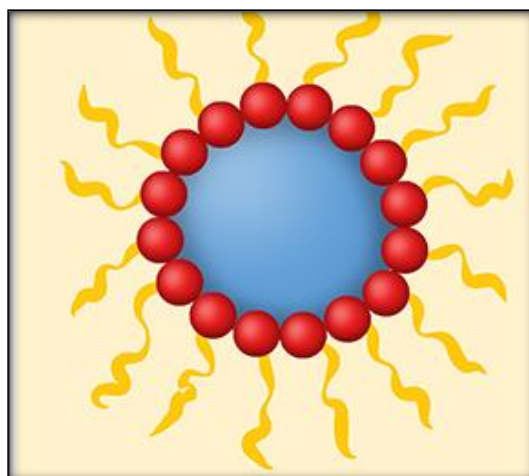


Figura 5. Representación de la estructura de una micela inversa. Adaptado de Garza G. (2015) Proteínas atrapadas en micelas. Revista Digital Universitaria, 16(1). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art04/index.html>.

1.5. Síntesis basada en el uso de micelas como medio de reacción

Este tipo de metodologías de síntesis están basadas en el uso de moléculas con un carácter anfifílico, denominadas surfactantes, las cuales pueden ser solubilizadas en medio acuoso o en medio orgánico. El uso de estas moléculas en el proceso de síntesis tiene ciertas ventajas como por ejemplo el hecho de ser un método “suave”, debido a que no se requieren condiciones extremas de temperatura y presión. Adicionalmente, la presencia de estas moléculas en el proceso de reacción permite lograr la estabilidad de las AgNPs a través del tiempo (Mehta et al., 2008).

Una de las razones por las que este tipo de metodologías han sido ampliamente estudiadas en la actualidad, es por la capacidad que tienen estos sistemas para controlar la distribución de tamaño y la forma de las partículas. Esto es posible lograrlo, realizando variaciones en los parámetros del sistema de reacción, y de las concentraciones usadas de los precursores de síntesis; lo cual permite afirmar que este tipo de sistemas tienen un carácter dinámico, permitiendo así que puedan ser usados como medios confinados de reacción (Mehta et al., 2008). Para generar estos medios de reacción se hace necesario tener en cuenta varios parámetros entre los cuales se encuentran la concentración micelar crítica (CMC) y el medio en que es solubilizado el surfactante (medio acuoso o medio orgánico). La CMC se define como la concentración mínima a la cual las moléculas de surfactante tienden a agregarse, formando un conjunto de agregados moleculares denominados micelas (Figura 6.). Cada tipo surfactante tiene un valor de CMC característico a una temperatura, tipo de solvente y concentración de electrolitos dadas (Tadros, 2013). En este punto

crítico algunas propiedades de las soluciones de surfactante, como lo son la conductividad, la tensión superficial, la presión osmótica, y la fluorescencia; sufren cambios abruptos en la medida en que se incrementa la concentración de surfactante (Tran & Yu, 2005). Teniendo en cuenta estos cambios en las diferentes propiedades fisicoquímicas, se han reportado diferentes metodologías para determinar la CMC. Una de las metodologías más comunes es realizando mediciones de los valores de tensión superficial (γ) en un determinado rango de concentraciones de surfactante (Tadros, 2013).

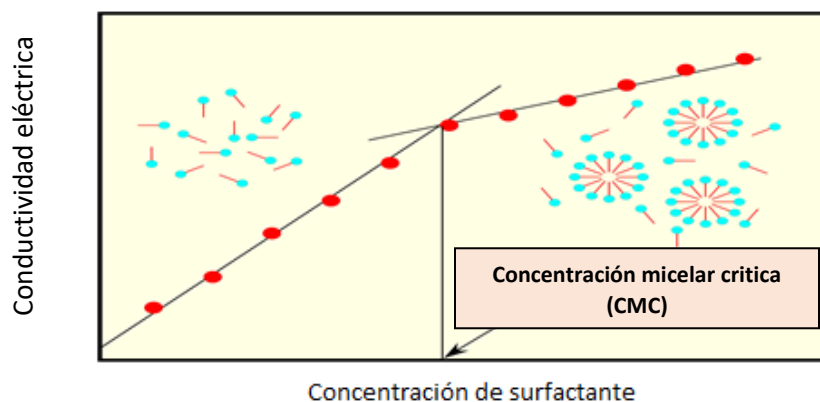


Figura 6. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por medio de mediciones de la conductividad eléctrica al variar la concentración de surfactante. Adaptado de Francois Bouton.(2010). Influence of terpenes and terpenoids on the phase behavior of micro- and macro-emulsions. Disponible en <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11844.12168>

1.5.1. Síntesis basada en micelas directas

Una de las metodologías más utilizadas para la síntesis de nanopartículas y que requiere el uso de micelas directas, es la metodología de crecimiento a partir de semillas. En este método se parte de la formación de unas nanopartículas esféricas que se generan a partir de la reducción del metal con

MICELAS COMO NANOREACTORES

un agente reductor adecuado. Estas nanopartículas “semilla” serán posteriormente adicionadas a una solución de crecimiento que contiene los mismos o diferentes iones, junto con otros aditivos, como dopantes, ligandos, etc. Estos iones metálicos de la solución de crecimiento son reducidos en la superficie de las semillas vía nucleación heterogénea durante la reacción de crecimiento de la partícula (Figura 7). Por variación de la concentración y la naturaleza de las semillas en la solución de crecimiento, es posible generar gran variedad de formas como nanobarras, nanoalambres, nanoplatos, nanodiscos o nanocubos. Una variante que existe de esta metodología “método de sembrado in situ”, en la cual una pequeña cantidad de un agente reductor fuerte es adicionada en el medio de reacción, en el cual ya hay presencia de un agente reductor débil. El propósito del agente reductor fuerte es iniciar el proceso de nucleación homogénea en el medio de reacción. El crecimiento de las semillas creado in situ a partir de las reducciones de los iones metálicos por parte del agente reductor fuerte, es luego dirigido por el agente reductor débil presente en el medio de reacción.

Otra forma que se ha reportado para realizar el proceso de síntesis de nanopartículas usando micelas directas, es mediante la adición sucesiva de cada uno de los precursores de síntesis (Precursor metálico, surfactante y agentes reductores).

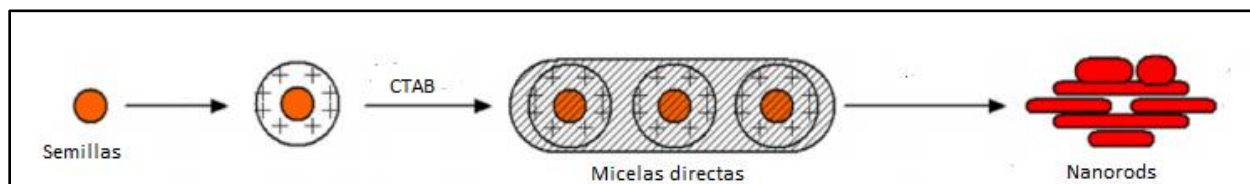


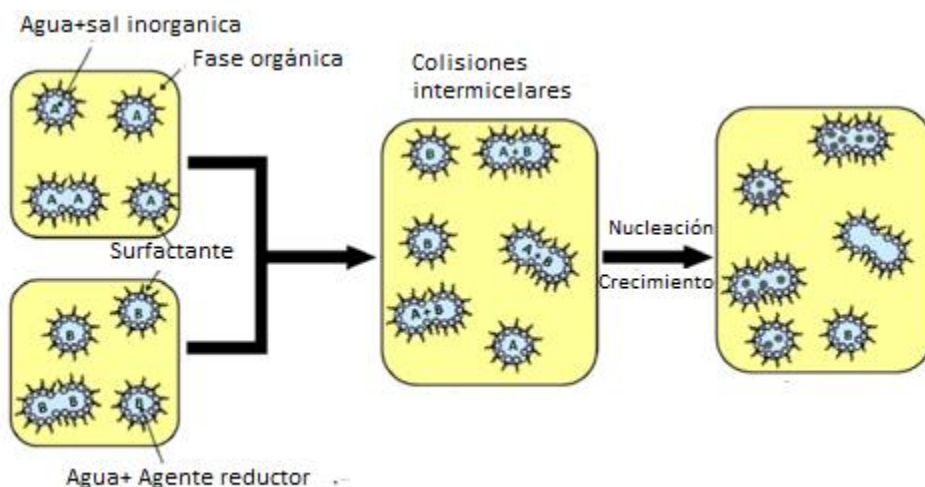
Figura 7. Esquema del mecanismo para la formación de nanobarras usando micelas directas generadas con el surfactante CTAB. Adaptado de Zhang, W., Qiao, X., Chen, Q., Cai, Y., & Chen,

H. (2012). The influence of synthesis condition and aging process of silver nanocrystals on the formation of silver nanorods. *Applied Surface Science*, 258(15), 5909-5913.

1.5.2. Síntesis basada en micelas inversas.

La síntesis de NPs por medio de esta metodología se realiza mezclando dos soluciones micelares cada una de las cuales contiene los precursores de síntesis. En el caso de las nanopartículas metálicas, en una de las micelas se adiciona la sal del metal solubilizada en agua y en la otra el agente reductor también solubilizado en agua (Figura 8.). El mecanismo propuesto para la formación de NPs en micelas inversas (Krutyakov, Kudrinskiy, Olenin, & Lisichkin, 2008), involucra cuatro etapas principalmente:

1. Coalescencia de los núcleos acuosos de las micelas colindantes.
2. Reacción química entre los componentes en fase acuosa.
3. Nucleación
4. Crecimiento intramicelar de las NPs



*Figura 8.*Proceso de síntesis de nanopartículas de tipo inorgánico de micelas inversas. Adaptado de Sanchez-Dominguez, M., Pemartin, K., & Boutonnet, M. (2012). Preparation of

inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: A soft and versatile approach. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 297–305. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.007>.

1.6. Funcionalización de nanopartículas metálicas: modificación química de la superficie

Por lo general las nanopartículas son funcionalizadas con diferentes tipos de moléculas, las cuales proporcionan estabilidad y selectividad de acuerdo a la aplicación para la cual han sido sintetizadas. Existen varios métodos que han sido ampliamente utilizados para realizar la funcionalización de las NPs, entre los cuales se encuentran la PEGilación, la funcionalización con tioles, el ensamblaje capa por capa (LbL), el revestimiento de sílice, y la funcionalización con biomoléculas, como el ácido fólico.

Entre las técnicas que comúnmente se han utilizado para caracterizar la superficie de las NPs funcionalizadas, se encuentran: la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, y la espectroscopia Raman.(Cho et al., 2013).

1.6.1. Funcionalización con biomoléculas: Ácido fólico y receptores folato

Considerando la aplicación de las nanopartículas en terapia fototérmica del cáncer, se hace necesaria la funcionalización de estas estructuras con moléculas que permitan una selectividad dentro de los sistemas biológicos, para ello se ha usado ampliamente el ácido fólico, el cual es una molécula necesaria para la síntesis de purinas y pirimidinas, las cuales son parte importante de funciones vitales para la célula, como la síntesis de ADN y ARN. El ácido fólico ha llegado a ser una de las moléculas objetivo más investigadas, en terapias contra el cáncer debido a su biocompatibilidad, bajo peso molecular, bajo costo, y fácil conjugación; esto último ha permitido

que sea ampliamente usado en el diseño de nanotransportadores de medicamentos (Mehra et al., 2013).

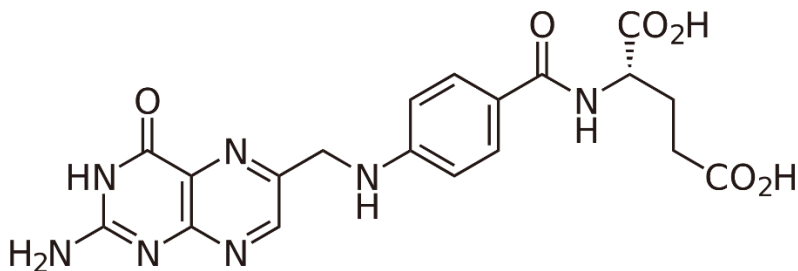


Figura 9. Estructura del ácido fólico

Los receptores folato son proteínas que en los últimos años han sido consideradas de gran importancia para implementar terapias selectivas contra el cáncer, debido a que en ciertos tipos de células cancerosas como las de útero, de estómago, de colon, de seno, y de ovario, hay una sobreexpresión de los receptores folato en comparación con las células sanas. Estos receptores se encuentran mayoritariamente de tres formas: RF- α , RF- β y RF- γ (Mehra et al., 2013)

2. Estado de arte

2.1. Síntesis de NPs usando sistemas micelares como medios de reacción

El uso de sistemas micelares en los procesos de síntesis de NPs presenta ciertas ventajas con respecto a otras metodologías; como por ejemplo la facilidad para modular la forma y el tamaño, además de la estabilidad que proporcionan las moléculas de surfactante a las NPs. Por estas

razones, en la actualidad se han reportado numerosos estudios en los cuales se utilizan micelas directas e inversas como medio de reacción para generar diferentes tipos de NPs, las cuales pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones, entre las cuales están las aplicaciones de tipo biomédico. (Wu et al., 2013) (Gutierrez, Cruz, Rondón, Jones, & Ortiz, 2016)

Con relación al uso de micelas inversas para la síntesis de nanopartículas de tipo inorgánico el primer reporte fue dado en 1982 por *Boutonnet y col.* Para el caso de las AgNPs la primera síntesis que se desarrolló mediante este tipo de metodologías, fue desarrollada por *Barnickel y col.* mediante reducción fotoquímica del nitrato de plata en presencia de CTAB y dodecil heptaetilenglicol. El tamaño de las AgNPs resultantes fue de 5 ± 6 nm, su banda de plasmón se obtuvo a una longitud de onda de 414nm, y fueron estables por varias semanas. La reducción fotoquímica se dio al iluminar la solución micelar con luz solar en presencia de oxígeno atmosférico y dodecil heptaetilenglicol, el cual juega un papel en la formación de la micela y actúa como estabilizante (Barnickel, Wokaun, Sager, & Eicke, 1992).

Shrestha y col. realizaron una síntesis *one-pot* de AgNPs esféricas cuyos diámetros estuvieron entre 15- 28nm, usando un surfactante no iónico ($C_{12}G_2$) el cual se usó para la formación de micelas inversas que servirían como nanoreactores sin usar ningún agente reductor. El tamaño de los nanoreactores (micelas inversas) fue controlado cambiando la estructura del solvente orgánico y el tamaño de la micela. Este control sobre el nanoreactor también permitió tener un control del tamaño de las AgNPs. Los dos sistemas que plantearon fueron $C_{12}G_2$ /ciclohexano and $C_{12}G_2$ /Octanol. La unidad de diglicerol del surfactante reduce los iones plata en plata metálica, y además le confiere estabilidad a las AgNPs evitando así su aglomeración. La forma y el tamaño de las AgNPs fueron similares al del nanoreactor (Shrestha, Shrestha, Vilanova, Rodriguez-Abreu, & Ariga, 2014).

Wang y col. sintetizaron nanobarras y nanofibras a través de un sistema de micelas inversas compuesto de (AOT)/isooctano el cual se sometió a ultrasonificación de baja intensidad. Los resultados que obtuvieron mediante microscopia de transmisión electrónica (TEM) mostraron que únicamente se obtenían AgNPs esféricas cuando se usaba el sistema nanoreactor sin someterlo a ultrasonificación, mientras que formas de barra y de alambre, se obtenían al someterlo a ultrasonificación. Los autores utilizaron dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) para obtener información de los cambios en la microestructura de las micelas inversas al ser sometida a ultrasonificación. Los resultados obtenidos por esta técnica revelaron que la forma de las micelas pasó de ser esférica a un elipsoide, el cual puede ser ajustado de acuerdo al tiempo de ultrasonificación al que sea sometido (J. Zhang et al., 2003)

Singha y col. y lograron generar AgNPs esféricas a partir de un sistema de nanoreactores, usando como agente reductor ácido ascórbico. El aporte que realizaron estos autores fue el poder llevar a cabo una reacción que, por medio de síntesis en fase homogénea, no se da a temperatura ambiente, mientras que al usar un nanoreactor, la reacción transcurre fácilmente, logrando así la generación de AgNPs. Adicionalmente, los autores lograron una alta calidad óptica, la cual es particularmente deseable, para estudios de interacción con otras moléculas que presenten absorción, por ejemplo, estudios de interacción plasmón fluoróforo (Singha, Barman, & Sahu, 2014).

Noritomi y col. usaron esteres de ácido grasos de la sacarosa para preparar micelas inversas y obtener AgNPs que presentaban diferentes formas. Ellos pudieron controlar el tamaño de las AgNPs usando estos ácidos grasos como surfactante, los cuales presentaban diferentes grados de esterificación. Los autores lograron AgNPs estables al menos por un mes (Noritomi et al., 2010).

Por otro lado, con respecto al uso de micelas directas como medios de reacción para la síntesis de NPs se han realizado estudios como el de *Mehta* y col. los cuales sintetizaron nanopartículas de Selenio (Se) por medio de dos sistemas de micelas directas compuestos de los surfactantes AOT y CTAB disueltos en agua, obteniendo de esta forma partículas esféricas cuyos tamaños se encontraban en un rango de 12.80–15.90 nm. Adicionalmente, los autores evidenciaron una correlación entre la concentración de surfactante y el tamaño de partícula, observando así que al disminuir la concentración de surfactante el tamaño de partícula se veía incrementado (*Mehta et al.*, 2008).

Así mismo, *Jiang* y col. estudiaron el rol de la temperatura en el proceso de crecimiento de nanopartículas de plata sintetizadas por medio de un sistema de micelas directas compuestas del surfactante AOT y usando tres agentes reductores de forma simultánea, los cuales fueron ácido cítrico, ácido ascórbico y borohidruro de sodio. Mediante esta metodología, los autores obtuvieron AgNPs esféricas y triangulares, cuyas bandas de plasmón superficial se encontraron en un rango de 700-1400 nm, lo cual permite que estas puedan ser utilizadas en aplicaciones ópticas, como sondas ópticas, sensores iónicos y sensores bioquímicos. Adicionalmente, estos autores evidenciaron el rol que juega la temperatura de reacción en los proceso de crecimiento de las partículas, permitiendo un mayor control de la forma y el tamaño de estas (*Jiang, Chen, Chen, Xiong, & Yu*, 2010).

Con relación a estudios relacionados con el uso de micelas directas basadas en el surfactante CTAB, *Lee* y col. sintetizaron nanobarras de plata mediante el método de crecimiento mediado por semillas, en el cual primero se prepararon AgNPs esféricas, las cuales se usaran como “semillas” para la generación de nanobarras. Estas semillas fueron preparadas por reducción de iones de plata con borohidruro de sodio en presencia de citrato de sodio dihidratado como agente

estabilizante. Un volumen de esta solución fue adicionado a una solución que contenía nitrato de plata, ácido ascórbico, y el surfactante CTAB disuelto en agua. Los autores evaluaron el efecto de la temperatura y el pH sobre la morfología y la selectividad de la reacción para generar mayoritariamente nanobarras. Ellos evidenciaron que el aumento de la temperatura de reacción y el pH dan lugar a una disminución de la relación de aspecto de las nanobarras de plata y una selectividad de la reacción hacia la generación mayoritariamente de nanobarras (Lee, 2004).

Otras de las variables que se ha evaluado en el proceso de síntesis por medio de crecimiento mediado por semillas, es el efecto de la concentración de surfactante, el cual fue estudiado por Zhang y col. los cuales evidenciaron que esta variable influye en el producto mayoritario y en la calidad de las nanobarras obtenidos. Los autores obtuvieron nanobarras de mejor calidad cuando adicionaron 15,0 mL de CTAB de concentración 0,1 M en el sistema de reacción estudiado. Adicionalmente, los autores estudiaron el proceso de envejecimiento de las nanobarras de plata, que puede dar lugar a cambios en la relación de aspecto de los mismos. Este proceso de envejecimiento se da debido a la oxidación de nanobarras de plata por la presencia de iones Br^- , O_2 , y a los procesos de maduración de Ostwald. Los autores determinaron que el proceso de formación de los nanobarras estaba controlado por factores cinéticos de la reacción, mientras que el proceso de envejecimiento es controlado por factores termodinámicos (W. Zhang et al., 2014).

Con respecto a estudios que comparan el producto obtenido por medio de micelas directas e inversas, se encuentra reportado el trabajo realizado por Mandal y col. los cuales sintetizaron por primera nanopartículas de cobre (Cu) utilizando micelas directas compuestas con el surfactante AOT. Las nanopartículas sintetizadas fueron esféricas y altamente cristalinas con un diámetro de 5-10 nm. Ellos evidenciaron que surfactante AOT tenía doble papel en el proceso de síntesis: reductor y estabilizante. Adicionalmente, realizaron una comparación de las NPs obtenidas, con

las CuNPs obtenidas por medio de micelas inversas compuestas de AOT/ isooctano, obteniendo mediante esta metodología nanopartículas de menor tamaño (diámetro <4 nm) (Mandal & De, 2016).

2.2. Uso de NPs en terapia fototérmica

Con relación a la terapia fototérmica, la cual representa una alternativa clínica para el tratamiento contra el cáncer, las nanopartículas de oro han demostrado ser excelentes candidatos para realizar este tipo de terapias, no sólo debido a la amplia variedad de tamaños y morfologías disponibles, que permiten optimizar la respuesta fototérmica a través de la modificación de la ubicación espectral de la longitud de onda de la banda de RPSL, sino también porque a través de su conjugación con diferentes tipos de moléculas, que son reconocidas únicamente por las células cancerosas, permite que este tipo de terapias tenga una alta selectividad disminuyendo así el daño a las células sanas. A pesar de las ventajas que tiene el uso de AuNPs, desde ya hace algunos años, se han empezado a reportar estudios relacionados con el uso de AgNPs en terapia fototérmica contra diferentes tipos de cáncer entre ellos el cáncer de ovario (Boca-Farcau et al., 2014). El tipo de nanoestructuras que frecuentemente han sido utilizadas en el campo de la biomédica incluye nanoesferas, nanoalambres, nanobarras, nanoplatos y nanocubos (Paramasivam et al., 2017). Cuando son usadas como agentes antimicrobianos por lo general se desea que posean una forma esférica, la cual presenta su banda de plasmón a una longitud cercana a 410 nm (Wani, Khatoon, Ganguly, Ahmed, & Ahmad, 2013). Al igual que en ocurre en las AuNPs, en las AgNPs es posible ajustar mediante ciertas variaciones en la metodología de síntesis la forma, el tamaño de las nanopartículas y la banda de plasmón AgNPs para que su longitud de onda se encuentra en la región del infrarrojo cercano, que es la región ideal para este tipo de aplicaciones médicas (Boca et al., 2011).

Experimental y teóricamente se ha encontrado que las desviaciones de geometría esférica afectan en gran medida las propiedades de las nanopartículas. Por lo tanto, se requiere un control estricto de la morfología de las partículas en orden de ajustar las propiedades de las nanopartículas. (Boca et al., 2011) Adicionalmente, esto permite la generación de partículas con nuevas propiedades y que podrían ser utilizadas en diferentes aplicaciones.

Boca y col. sintetizaron nanotriángulos de plata revestidos de quitosano con fuertes resonancias en el infrarrojo cercano (NIR) para utilizarlos como agentes fototérmicos en una línea celular de cáncer pulmón (NCI-H460). Los experimentos de hipertermia se llevaron a cabo irradiando células con las NPs internalizadas, utilizando una laser de titanio- zafiro, con una longitud de onda de 800 nm. Se encontró que la tasa de mortalidad celular en presencia de Chit-AgNPs es mayor que cuando se usan nanobarras de oro funcionalizadas con polientenglicol (PEG-AuNRs). Este último fue utilizado por los autores como un agente de hipertermia de referencia, debido a uso en este tipo de terapias. Ellos realizaron estudios de citotoxicidad de las Chit-AgNTs en una línea celular de células embrionarias de riñón humano (HEK), las cuales demostraron una buena compatibilidad, esencial para cualquier aplicación en ensayos *in vitro* (Boca et al., 2011).

Byeon y col. realizaron un estudio en el cual prepararon nanopartículas de Ag-TiO₂@ polietilenglicol (PEG) las cuales se obtuvieron continuamente en una configuración de un solo paso al hacer reaccionar apropiadamente TiO₂ recién sintetizado con AgNPs formada en un medio acuoso ultrasónico que contenía PEG. Las nanopartículas sintetizadas se emplearon como inductores para la terapia fotoinducida *in vitro* para destruir células de cáncer de cuello uterino (HeLa) a diferentes longitudes de onda de luz. Las mediciones de la citotoxicidad de las nanopartículas revelaron que la incorporación de PEG con las partículas de Ag-TiO₂ disminuía significativamente la citotoxicidad (viabilidad celular de más del $\sim 91\%$ a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$

concentración de partículas) de plata, y esto era comparable con las partículas de TiO_2 (células viabilidad de más del $\sim 90\%$). Cuando se irradiaron las células HeLa que fueron incubadas junto con las NPs, con láseres cuyas longitudes de onda eran 632 nm y 808 nm a las nanopartículas en las células HeLa, la viabilidad de las células se vio significativamente afectada (disminuyó a $\sim 4\%$ (632 nm) y $\sim 26\%$ (808 nm) a $200 \mu\text{g ml}^{-1}$, 5 min de tiempo de irradiación) (Byeon, 2016).

Yang y col. prepararon nanopartículas de resina multifuncional Ag@Au@ fenol formaldehído cargadas con AF fueron diseñados para destruir células tumorales mediante la irradiación IRC. Estas poseen la virtud de una buena fluorescencia, baja toxicidad, y buena orientación. El nano compuesto estaba conformado de un núcleo de Ag, una capa de Au, una capa externa compuesta de fenol y formaldehído y ácido fólico. La estructura núcleo-capas Ag @ PFR se preparó con un método hidrotermal simple después del precalentamiento. Posteriormente, se llenó la capa externa con una capa de Au sometido a altas temperaturas y se modificó la capa externa con un polielectrolito para cambiar su estado de carga superficial. Para lograr que las nanopartículas fueran selectivas células tumorales activamente, se unieron a la superficie moléculas de AF. Finalmente, se evaluó la efectividad de estos nanomateriales como agentes fototérmicos contra el cáncer de cuello uterino (HeLa). Para estos ensayos se utilizó un láser de longitud de onda de 808 nm y se irradió el cultivo células durante 5 minutos. Los resultados mostraron una disminución significativa de la viabilidad celular, junto con cambios morfológicos en la línea celular usada. (Yang et al., 2012)

En cuanto a las AgNPs funcionalizadas con AF, un estudio realizado por *Boca-Farcau y col.* y colaboradores direccionaron el conjugado hacia el receptor folato de la línea celular de cáncer de ovario humano: IH: OVCAR.3. Ellos utilizaron nanotriángulos de plata que fueron funcionalizados con biopolímeros de quitosano marcados con una molécula activa en RAMAN,

p-aminotiofenol (PATP) y conjugados con ácido fólico. Estudios comparativos revelaron la internalización específica de las NPs conjugadas en comparación con las NPs similares no funcionalizadas. Las células cancerosas fueron irradiadas con un láser de onda continua IRC, previamente internalizando las NPs, y se evidencio una respuesta terapéutica importante. (Boca-Farcu et al., 2014). Otro estudio en el cual realizaron la funcionalización de las NPs con AF, fue el realizado por Khan y col. los cuales sintetizaron NPs de seleniuro de plata (Ag_2S) funcionalizadas con ácido fólico para ser utilizadas en terapia fototérmica contra una línea de cáncer de pulmón (A549). Los resultados obtenidos por ellos mostraron que al irradiar con un láser de 808 nm y un tiempo de irradiación de 6,5 minutos, se alcanzó una temperatura de 54 °C bajo la cual evidenciaron un reducción del 55% en la viabilidad celular de las células cancerosas, demostrando así su potencial para utilizar este tipo de nanomateriales en terapia fototérmica. El nanomaterial evaluado fue altamente biocompatible (95%) a la concentración más alta (10 g / mL) (Khan et al., 2017).

Se ha reportado que la citotoxicidad de las AgNPs podría ser aprovechada como tratamiento contra el cáncer, como lo mencionan *Franco-Molina* y col. quienes observaron que las AgNPs presentan efectos citotóxicos en una línea celular de cáncer de seno (MCF-7) y fueron dependientes de la dosis, logrando inducir en la célula un proceso de apoptosis, al utilizar concentraciones entre 3.5 ng/mL y 14 ng/mL (Franco-Molina et al., 2010).

En otros estudios reportados como el de *Thompson* y col., se combina el efecto de la citotoxicidad de las AgNPs con la terapia fototérmica. Estos autores realizaron un estudio a nivel *in vitro* evaluando su respuesta a la hipertermia de 3 líneas celulares de seno (Dos de ellas cancerosas y una sana). Para ello usaron nanotriángulos de plata conjugados con quitosano, los cuales fueron preparados por una metodología de fase homogénea de crecimiento a partir de

semillas. Estas nanopartículas fueron diseñadas de tal forma que tuvieran una fuerte absorción en una longitud de onda cercana a 800nm, con el fin de generar calor de una forma más eficiente debido a la resonancia del plasmón inherente. Los dos grandes hallazgos que encontraron después de realizar ensayos de citotoxicidad y de hipertermia fueron que las AgNPs eran más citotóxicas para las líneas de células cancerosas (MCF7 and MDA-MB-231) a bajas concentraciones, y que estas fueron agentes fototérmicos eficientes para matar células cancerosas. Los autores encontraron que la concentración ideal de AgNPs está en un rango entre 20-250 mg/mL, para que el aumento de la temperatura pueda causar daños celulares irreversibles.(Thompson et al., 2014)

Otro estudio en que se destacan las ventajas de utilizar la citotoxicidad de las AgNPs junto con otro tipo de tratamientos, es el estudio realizado por *Wang* y col. en el cual demostraron que la AgNPs pueden inducir a que las células de Glioma C6 de rata entren en un proceso de muerte celular o apoptosis, además que incrementan la termosensibilidad en esta línea celular. Las AgNPs mostraron que su citotoxicidad es dependiente de la dosis y que la hipertermia en las células incrementa con el número de AgNPs internalizadas. Ellos encontraron que AgNPs pueden inhibir la viabilidad de las células cancerosas, debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, daño en el ADN, y finalmente hacen que la célula entre en un proceso de muerte celular o apoptosis (Wang et al., 2013).

3. Sección experimental

3.1. Síntesis de nanopartículas de plata

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata usando como medios de reacción micelas formadas por AOT y por CTAB, específicamente se emplearon: dos sistemas conformados por micelas directas: I. AOT/agua, II. CTAB/agua y un sistema conformado por micelas inversas: III. AOT/Isooctano.

3.1.1. Síntesis de AgNPs empleando micelas directas de AOT/Agua

Para realizar el proceso de síntesis por medio de esta metodología se siguió el protocolo descrito por *Jiang* y col., en el cual se emplean 100 mL de una mezcla de AgNO_3 y de AOT de concentración $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, respectivamente. Posteriormente, se adicionaron de manera secuencial volúmenes de las soluciones acuosas de los agentes reductores: 1.20 mL de ácido cítrico (1.0 M), 0.30 mL de L-ácido ascórbico (0.10 M), y 0.02 mL NaBH_4 (0.002 M), mantenido la agitación durante la adición de cada una de las soluciones. Una vez finalizada la adición de cada uno de los agentes reductores a la mezcla de reacción, se mantuvo la agitación durante ~ 30 s. Pasado este tiempo, se detuvo la agitación (*Jiang et al.*, 2010).

3.1.2. Síntesis de AgNPs empleando micelas directas compuestas de CTAB/Agua

Para realizar el proceso de síntesis por medio de esta metodología se utilizó el protocolo reportado por *Zhang* y col., en el cual se emplea una solución de “semillas” (nanopartículas esféricas) y una solución de crecimiento. Las nanopartículas “semilla” se generaron empleando 0.5 mL de una solución compuesta de AgNO_3 (0.01M) y citrato de sodio (0.01M) llevando un volumen final de 19 mL. Esta solución se sometió a agitación constante y simultáneamente se adicionaron 0.6 mL de NaBH_4 (0.01M). La solución de “crecimiento” se preparó empleando una mezcla acuosa de 0.5 mL de solución de AgNO_3 (0.01M), 1 mL de solución ácido ascórbico (0.1M) y 15mL de solución de CTAB (0.1M). Inicialmente se solubilizo el CTAB en agua con agitación constante y

temperatura de 40°C, hasta obtener una solución translúcida. Posteriormente a la solución de CTAB a temperatura ambiente se le adicionaron los volúmenes de AgNO_3 y ácido ascórbico previamente mencionados. Finalmente, se adicionaron a esta mezcla, 0.06 mL de solución de “semillas” y 1 mL de solución de NaOH (1M). Se agitó la mezcla por dos minutos adicionales y se detuvo la agitación (W. Zhang et al., 2014).

3.1.3. Síntesis de AgNPs empleando micelas inversas compuestas de AOT/ Isooctano

Para realizar este proceso de síntesis se preparó una solución de surfactante AOT/isooctano con una concentración de 0.05 M. En esta metodología, se usó como precursor metálico una solución acuosa de AgNO_3 0.5 M y como agente reductor una solución acuosa de NaBH_4 0.25 M. Para la síntesis de AgNPs se preparan dos soluciones una conteniendo 2 mL de la solución de AOT/Isooctano y 9 μL de la solución de AgNO_3 ($W_0 = 5$) y otra conteniendo 2 mL de la solución de AOT/Isooctano y 9 μL de la solución de NaBH_4 ($W_0 = 5$), ambas soluciones son sonicadas hasta obtener soluciones translúcidas y homogéneas. Finalmente, se mezclaron las dos soluciones micelares que contenían los precursores, y se sonicaron durante 30 segundos.

3.2. Proceso de transferencia de fase/precipitación

3.2.1. Proceso de precipitación de las AgNPs obtenidas mediante micelas directas

Las soluciones obtenidas del proceso de síntesis obtenidas fueron depositadas en tubos de micro centrifuga de 2 mL, y se centrifugaron a 10619 gravedades/ min durante 20 minutos. Una vez terminado el proceso de centrifugación, se retiró el sobrenadante y el sólido resultante corresponde a las AgNPs sintetizadas. En ambos casos el sólido obtenido fue lavado con una solución acuosa de etanol al 20% con el fin de retirar el exceso de surfactante. Esta solución fue sometida nuevamente a centrifugación bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

3.2.2. Proceso de transferencia de fase de las AgNPs obtenidas mediante micelas inversas

En este sistema para eliminar el solvente orgánico, al volumen de solución obtenida del proceso de síntesis se le adiciona el mismo volumen de una solución acuosa de acetona al 50%. De las dos fases obtenidas la superior corresponde a las AgNPs en fase orgánica y la fase acuosa contiene el exceso de surfactante. La fase orgánica se lleva a sequedad con nitrógeno y el sólido resultante se lava con una solución acuosa de acetona al 50 % para eliminar los residuos de surfactante y se centrifuga durante 20 minutos a 10619 gravedades / minuto. El sólido obtenido corresponde a las AgNPs sintetizadas en este medio de reacción.

3.3. Funcionalización de las nanopartículas de plata con ácido fólico (AgNPs@AF)

Las AgNPs obtenidas después del proceso de transferencia de fase y purificación fueron funcionalizadas con ácido fólico, adicionando al sólido obtenido en cada sistema 2 mL de solución acuosa de ácido fólico 1×10^{-3} M a pH: 9 (NaOH 1M).

Estas soluciones fueron sonicadas durante 5 minutos con el fin de facilitar la interacción de las AgNPs con las moléculas de ácido fólico. Posteriormente, fueron centrifugadas a 10619 gravedades / minuto durante 20 minutos. Una vez finalizó el proceso de centrifugación se retiró el sobrenadante o ácido fólico en exceso.

3.4. Caracterización de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico

3.4.1. Caracterización espectroscópica

Los espectros UV –Vis de las soluciones de AgNPs con y sin funcionalización fueron obtenidos empleando una celda de cuarzo de 1.0 cm de longitud de paso óptico, en la región de 200-1000 nm, utilizando un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453. Las cinéticas de formación de las AgNPs

cada uno de los medios de reacción, se obtuvieron empleando espectrófotometro y lector de microplacas Multiskan™ GO y el software Skanlt RE 4.1.

Los espectros de emisión de fluorescencia de las soluciones de AgNPs funcionalizadas con ácido fólico, se obtuvieron emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico, y un espectrofluorimetro Perkin Elmer L-55.

Los espectros des FT-IR se obtuvieron en un equipo Nicolet 1S50 FT-IR Thermo Scientific, empleando una celda ATR sobre la cual se depositaron las muestras sólidas y/o liquidas para su análisis.

Los espectros Raman se obtuvieron en un espectrómetro Raman, LabRAM HR Evolution de Horiba, equipado con un microscopio confocal Leica acoplado a una cámara de video. Las muestras de AF puro, AOT, y CTAB fueros medidas depositando una pequeña cantidad en el portamuestras del equipo. Las soluciones de AgNPs y AgNPs@AF fueron medidas depositando 10 μ L en una lámina de vidrio. La concentración aproximada de Ag de las soluciones utilizadas fue de 200 μ M.

Las condiciones del análisis fueron: láser de estado sólido de longitud de onda de 785 nm, potencia de laser de 80 mW, y los objetivos de 10X.

3.4.2. Determinación del potencial Zeta

Se realizaron mediciones de potencial Z en un equipo Zetasizer Nano, para cada una de las soluciones de AgNPs y AgNPs@AF preparadas.

3.4.3. Caracterización microscópica

Para la caracterización estructural, las dispersiones de AgNPs se depositaron sobre rejillas TEM (cobre) revestidas con carbono colocadas sobre papeles de filtro, de modo que el disolvente se

evaporó en condiciones ambientales. Las muestras se dispersaron en agua y se sonicaron durante 30 minutos antes de depositarse en las rejillas TEM. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) fueron obtenidas usando un microscopio FEI TECNAI G2 STWIN a 20-200 kV con una cámara Gatan ES100W. Finalmente, las imágenes fueron analizadas usando el software Gatan Digital Micrograph.

4. Resultados y discusión

4.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)

En cada uno de los sistemas micelares empleados como medios de reacción, se aseguró la efectiva formación de los agregados moleculares, para ello todos los procesos de síntesis se realizaron empleando soluciones de surfactante con concentraciones por encima del valor de la *CMC*.

La *CMC* es un parámetro importante que permite determinar la estabilidad y formación de los sistemas micelares utilizados como medios de reacción para la generación de AgNPs. Para el caso del sistema formado por el surfactante AOT disuelto en isooctano (Micelas inversas) se ha reportado una *CMC* de 1.7 mM (Manoj, Jayakumar, & Rakshit, 1996), mientras que para el sistema formado por el surfactante CTAB disuelto en agua (Micela directa) se ha reportado una *CMC* de 9×10^{-4} M (W. Li, Zhang, Zhang, & Han, 2006). Por otro lado, para el caso sistema AOT/ agua, hay discrepancia entre los valores obtenidos entre los diversos autores, debido a que en la mayoría de casos la determinación de la *CMC* se realizó para un sistema ternario acuoso, y no para un sistema binario como el utilizado en este estudio. Adicionalmente, se encontró únicamente un estudio en el que se reporta una *CMC* de 5 mM (Mandal & De, 2016) para un sistema AOT/ agua.

Teniendo en cuenta estas limitaciones para tener un valor confiable de la *CMC*, en este trabajo la concentración micelar crítica (*CMC*) operacional del sistema AOT/agua se determinó por medio de un método espectrofotométrico donde se evaluaron los cambios en el máximo de absorción del colorante cloruro de metiltionina (azul de metileno) con una concentración de $1,6 \times 10^{-4}$ M frente a la variación de la concentración de surfactante desde 5×10^{-5} hasta 1×10^{-3} M. Graficando los valores del máximo de absorción del colorante en función del logaritmo de la concentración de surfactante y empleando un ajuste sigmoideal se determina el punto de inflexión, el cual corresponde al valor de la *CMC* del surfactante en el sistema.

Los resultados obtenidos de esta determinación se observan en la figura 10.

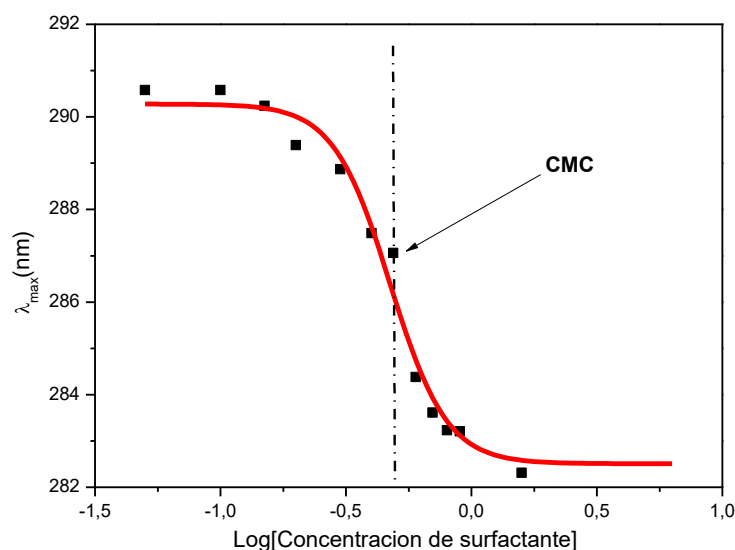


Figura 10. Gráfica λ_{max} del colorante azul de metileno de concentración $1,6 \times 10^{-4}$ M versus Log [Surfactante] indicando el punto correspondiente a la CMC del sistema.

El valor de la *CMC* para el sistema AOT/agua obtenido fue de 4×10^{-4} M. En la tabla 1 se presentan los valores de la *CMC* para cada uno de los sistemas evaluados junto con las concentraciones de surfactante que se utilizaron en los procesos de síntesis. Al comparar cada uno

de los valores de concentración en el proceso de síntesis con los valores correspondientes a la *CMC*, se observa que todos los valores de concentración usados en los procesos de síntesis se encuentran por encima de la *CMC*.

Tabla 1. *Comparación de las concentraciones usadas en los procesos de síntesis con el valor de la CMC.*

Sistema micelar	Concentración en la síntesis (moles/L)	<i>CMC</i> (moles/L)
AOT/agua	5.0×10^{-4}	4×10^{-4}
AOT/Isooctano	5.0×10^{-2}	1.7×10^{-3}
CTAB/agua	8.4×10^{-2}	9×10^{-4}

4.2. Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs a través de espectroscopia UV-vis

Teniendo en cuenta los protocolos de síntesis de AgNPs mencionados en los apartados 3.1.1., 3.1.2., y 3.1.3., se realizaron las cinéticas de formación.

4.2.1. Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema AOT/agua

Para el caso de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/ agua, se tomaron espectros UV-vis cada minuto durante 36 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.

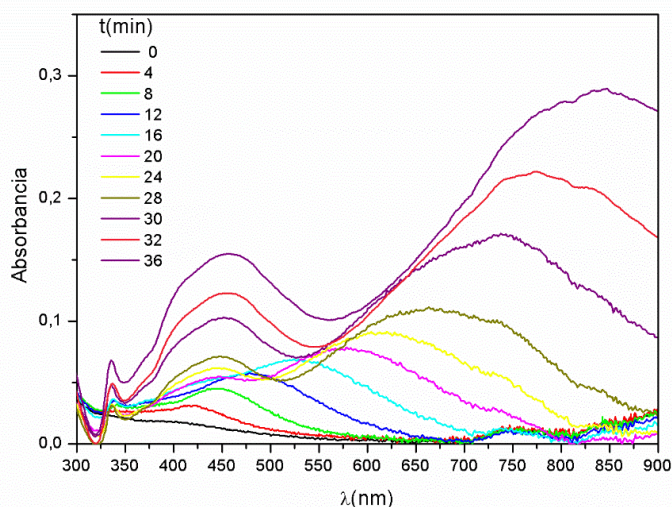


Figura 11. Seguimiento de la reacción de formación de las de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/agua.

En la figura 11 se observa como a los 4 minutos de reacción aparece una banda localizada a $\lambda_{\max} = 420\text{nm}$, esta banda con el tiempo se desplaza al rojo y aumenta su intensidad, mientras que alrededor de los 20 min se observa la aparición de una nueva banda a $\lambda_{\max} = 335\text{nm}$. Al final de la reacción aproximadamente a los 36 min se observa la estabilización de las bandas, definiendo un espectro de resonancia plasmónica característico de las AgNPs sintetizadas en este sistema con dos bandas localizadas a $\lambda_{\max} = 450\text{ nm}$ y $\lambda_{\max} = 826\text{nm}$ que corresponden a las contribuciones de la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción de las NPs a lo largo de los diferentes ejes de la nanopartículas (Mogensen & Kneipp, 2014) lo cual da lugar a la formación de NPs con diferentes morfologías tales como esferas, elipsoidales, triángulos y formas no definida (pseudo geometrías)

4.2.2. Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema AOT/isooctano

Para el caso de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/ agua, se tomaron espectros UV-vis cada 10 segundos durante 2 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12.

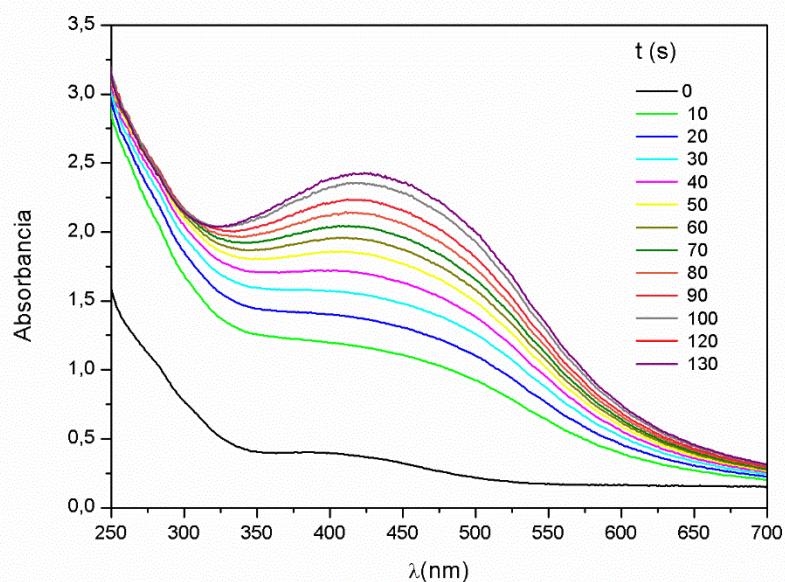


Figura 12. Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/isooctano.

En la figura 12, se observa que cuando se adiciona el volumen correspondiente de AgNO_3 a la solución micelar esta se torna de una coloración amarilla clara y el espectro muestra una banda ancha con una λ_{max} = de 417 nm. La formación de esta banda puede estar asociada a la reducción inicial de algunos iones plata en el centro acuso de las micelas, por efecto de las moléculas de surfactante AOT, dando así lugar a la formación de un número reducido de AgNPs semilla. Una vez iniciado el proceso de reducción empleando el agente reductor (NaBH_4) la banda de absorción inicial incrementa su absorbancia y se desplaza suavemente hacia longitudes de onda mayores. La estabilidad de esta banda de absorción se obtiene a los 2 minutos de reacción con una λ_{max} a 427nm.

4.2.3. Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs generadas mediante el sistema CTAB/agua

Para el caso de las AgNPs obtenidas mediante el sistema CTAB/ agua, se tomaron espectros UV-vis cada 10 segundos durante 70 segundos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13b.

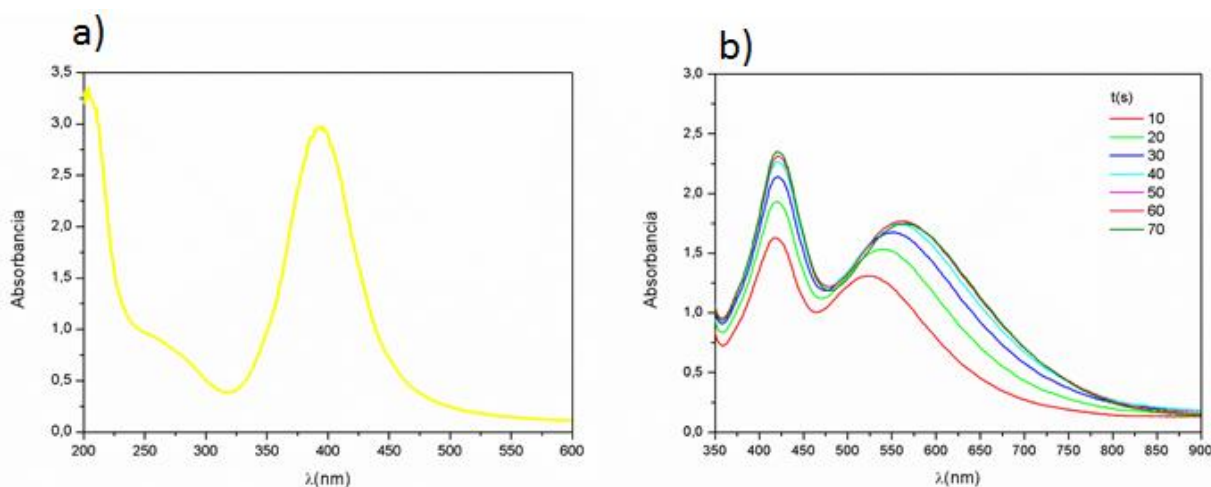


Figura 13. a) Espectros UV-vis de la solución de semillas b) Seguimiento de la reacción de formación de las AgNPs obtenidas mediante el sistema CTAB/agua.

En la figura 13a se observa el espectro característico de la solución de “semillas” este espectro presenta una banda de absorción centrada en 395 nm atribuida a la formación de AgNPs esféricas lo cual está en concordancia con lo reportado por Zhang y col. Estas AgNPs de tipo esférico fueron adicionadas a la solución de “crecimiento”, la cinética de formación en este sistema se empezó en el momento en que se adicionó la solución de NaOH. En la figura 13b se muestra inicialmente la presencia de dos bandas de absorción con λ_{max} a 416 nm y a 507 nm. Con el paso del tiempo en ambas bandas se observa un aumento en la intensidad de absorbancia, el λ_{max} de la primera banda permanece sin cambios importantes, mientras que en la segunda banda se desplaza hacia longitudes de onda mayores, logrando su estabilidad al minuto de reacción. Al final de la reacción se obtiene un espectro plasmonico característico con dos bandas a 416 y 565 nm.

4.3. Caracterización de las AgNPs sin funcionalizar

Las AgNPs sin funcionalizar sintetizadas a través de los tres sistemas micelares, fueron analizadas por medio de espectroscopia UV-Vis después de realizar el proceso de transferencia de fase para el caso de las AgNPs por medio del sistema de micelas inversas o precipitación mediante centrifugación para el caso de las AgNPs obtenidas mediante micelas directas, con el fin de determinar su banda de plasmón característica. Adicionalmente, se determinó la forma y la distribución de tamaño de partícula mediante microscopia de trasmisión electrónica (TEM) Finalmente, se determinó la carga superficial mediante las mediciones del potencial Zeta, con fin de evaluar la estabilidad de las AgNPs sintetizadas.

4.3.1. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema AOT/ agua

En la figura 15 se presentan los resultados de la caracterización de las AgNPs sintetizadas en el sistema AOT/agua por medio de espectroscopia UV-vis y microscopia TEM.

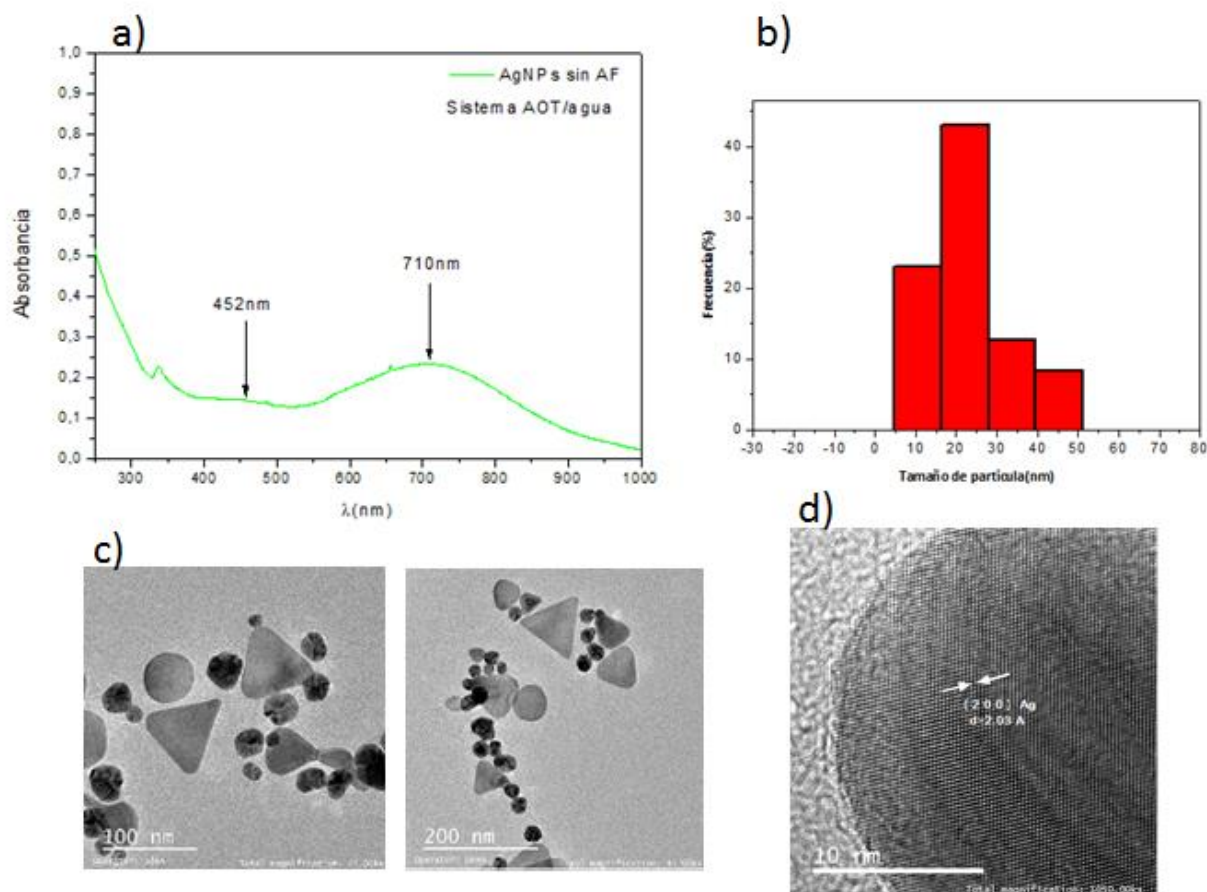


Figura 14. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/ agua (b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d) Determinación de planos cristalográficos.

En la figura 14a se muestra el espectro UV-vis característico de las AgNPs obtenidas en el sistema AOT/agua después de la purificación, donde se identifican dos bandas a 452 nm y 705 nm. Los análisis por microscopia TEM evidencian que las estructuras obtenidas presentan un diámetro promedio alrededor de 21.5 ± 5 (ver figura 14b) y formas de triángulos, prismas, esferas y otras formas indefinidas (ver Figura 14c). Frente a esta coexistencia de diferentes tipos de

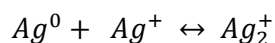
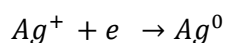
estructuras, en el estudio realizado *Jiang y col.* afirman que esta coexistencia puede ser causada por el tipo de estructura cristalina que presentan las AgNPs, la cual es una estructura cubica centrada en la caras (fcc) (Jiang et al., 2010). La presencia de este tipo de estructura en la AgNPs sintetizadas fue verificada mediante la medición de las distancias interplanares en algunas de las micrografías obtenidas mediante TEM. Las distancias interplanares fueron medidas usando el software Gatan Digital Micrograph, y pues correlacionadas con los respectivos índices miller usando el documento JCPDS-ICDD 04-0783. Las mediciones de estas distancias interplanares, permitieron identificar un plano Ag (200), el cual está relacionada con la formación de estructuras tipo fcc (Figura 14d)

Las estructuras obtenidas empleando este sistema como medio de reacción se atribuyen al efecto sinérgico de reducción utilizando tres de tipos diferentes de agentes reductores: ácido cítrico, ácido ascórbico y NaBH_4 . Adicionalmente, se conoce que la presencia del surfactante AOT, además de jugar un papel importante en la estabilidad de las AgNPs, también, influye en los procesos de crecimiento de estas en presencia de iones plata formando complejos como $\text{Ag}_2(\text{AOT})$, los cuales afectan la velocidad de reacción de los agentes reductores, así como la forma y el tamaño final de las partículas obtenidas (Jiang, Chen, Chen, & Yu, 2010).

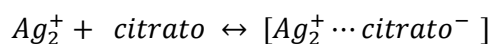
Entre los agentes reductores utilizados en el proceso de síntesis, el que presenta un menor potencial de reducción es el ácido cítrico, ya que para que mejorar su potencial de reducción requiere de condiciones de alta temperatura. *Jiang y col.* evidenciaron que la velocidad de reducción del ácido cítrico se reduce significativamente en presencia del surfactante AOT, debido a la formación de los complejos $\text{Ag}_2(\text{AOT})$ y $[\text{Ag}(\text{Cit})_2\text{AOT}]$. Adicionalmente, los autores evidenciaron la influencia de la relación molar ácido cítrico: nitrato de plata ($[\text{Cit}]/[\text{Ag}^+]$), observando que para relaciones molares mayores a 40, la reacción se torna más lenta y por lo

tanto tarda más en llegar a su punto de estabilidad. La razón para que suceda esto está relacionada con las altas concentraciones de iones citrato, las cuales dan lugar a la formación de complejos $[Ag_2^+ \cdots citrato^-]$ los cuales al igual que los complejos $Ag_2(AOT)$, causan una disminución de la velocidad de reducción del citrato dando lugar a que la reacción sea más lenta. La formación de estos complejos, soporta el hecho de que el proceso de síntesis se haya dado de una forma lenta y que tardara 35 minutos en llegar al punto de estabilidad de la reacción.

Debido a que el potencial de reducción del ácido cítrico es bajo, los agentes reductores que hicieron posible la reducción inicial de los iones Ag^+ fueron el ácido ascórbico y el $NaBH_4$. Adicionalmente, estos agentes reductores darían lugar a la formación de dímeros Ag_2^+ de en solución acuosa en la etapa inicial, como se observa en las reacciones mostradas a continuación:



Los dímeros formados en el paso anterior, interaccionan con los iones citrato dando lugar así a la formación de complejos $[Ag_2^+ \cdots citrato^-]$, los cuales podrían tener una influencia sobre la velocidad de la formación y crecimiento de las AgNPs.



Es importante tener en cuenta que en el proceso de síntesis se utilizó una baja relación molar de $[BH_4]/[Ag^+]$ debido a que el potencial de reducción de este agente reductor es alto, y para lograr la formación de nanoestructuras como los nanotriángulos se requiere una reacción lenta y controlada.

Además de la formación de dímeros de Ag^+ , Jiang y col, reportaron que bajo las condiciones evaluadas también se generan clústeres trimétricos Ag_3^+ , los cuales pueden servir como núcleos

para la adición de átomos de plata recién formados y, finalmente dar lugar a la formación de nanotriángulos de plata.

4.3.2. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema AOT/ Isooctano

Los resultados de la caracterización para las AgNPs sintetizadas empleando el sistema AOT/isooctano se muestran la figura 15.

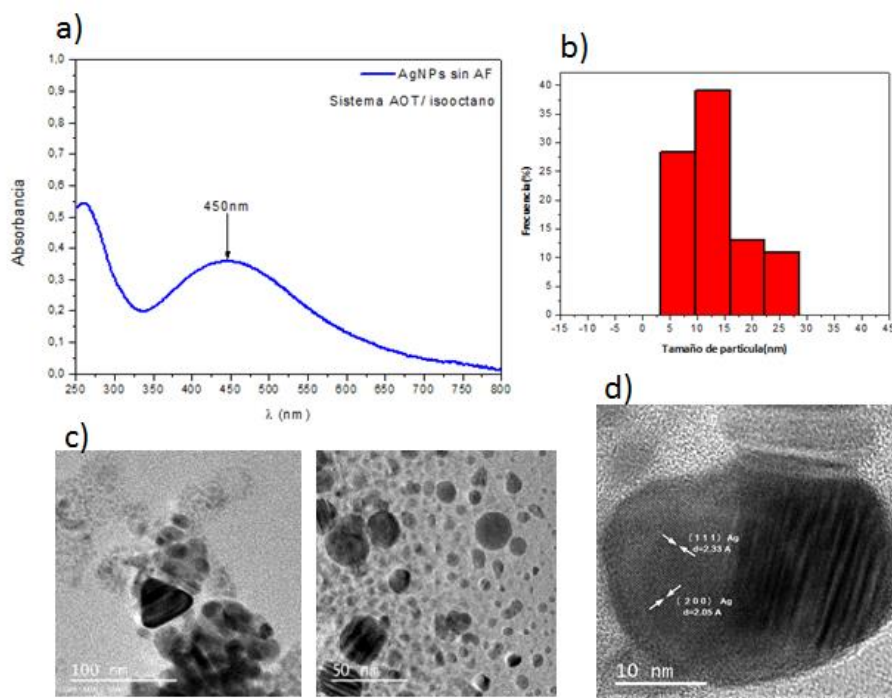


Figura 15. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/ isooctano b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d) Determinación de planos cristalográficos.

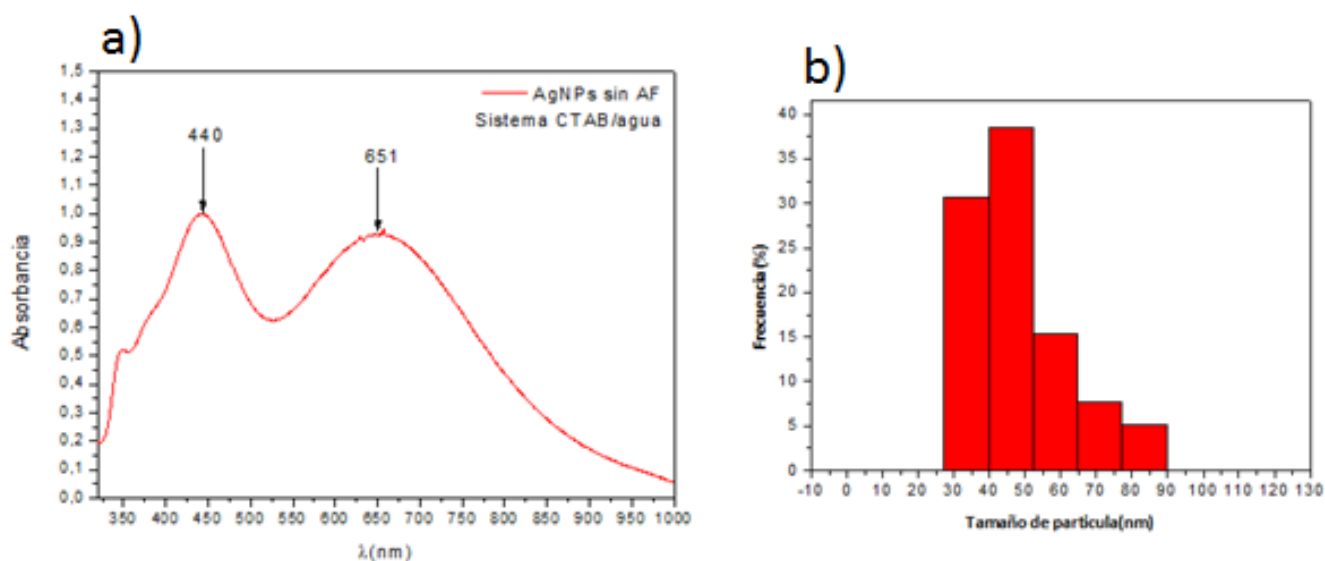
En la figura 15a se muestra el espectro UV-vis con una banda ancha a λ_{max} alrededor de 450 nm. Teniendo en cuenta el histograma presentado en la figura 15b, se determinó que el diámetro promedio de las partículas obtenidas es de 12.61 ± 6 nm, y las formas de las partículas obtenidas fueron mayoritariamente esferas, junto con algunas formas anisotrópicas (Figura 15c) Las

distancias interplanares fueron medidas siguiendo la misma metodología que se usó para el sistema anterior. Las mediciones de estas distancias interplanares, permitieron identificar los planos Ag (111) y Ag (200), los cuales están relacionados con la formación de estructuras cristalinas tipo fcc (Figura 15d)

Empleando este medio de reacción el tamaño promedio de partícula obtenido fue menor que el obtenido por medio de micelas directas de AOT/agua. La razón para esto, se atribuye al hecho que en las micelas inversas la reacción se lleva a cabo en un medio confinado (nanoreactor), donde las propiedades del medio acuoso son diferentes a las que presenta el agua neta. Adicionalmente, la relación molar ($[BH_4]/[Ag^+]$) empleada fue menor que 1, implica que el precursor metálico ($AgNO_3$) se encuentre en exceso con respecto al agente reductor ($NaBH_4$) lo que disminuye la velocidad de reacción y permite un mayor control, ya que la reducción de los iones plata es parcial, permitiendo así que a partir de algunos de los núcleos generados inicialmente ocurra un crecimiento controlado de las AgNPs anisotrópicas.

4.3.3. Caracterización de las AgNPs obtenidas a través del sistema CTAB/ agua

Los resultados de la caracterización para las AgNPs sintetizadas empleando el sistema CTAB/agua se muestran la figura 16.



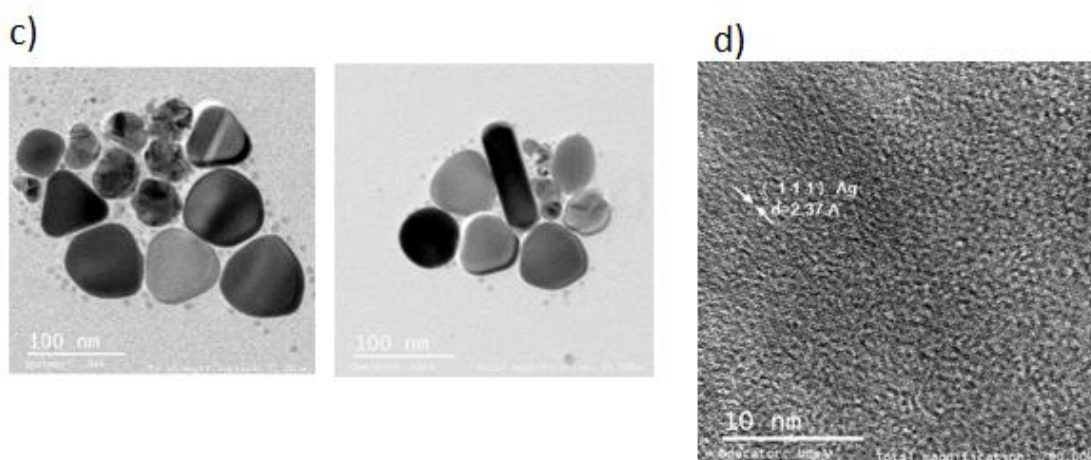


Figura 16. a) Espectro UV-vis de las AgNPs sin funcionalizar obtenidas en el sistema AOT/ isooctano b) Histograma de distribución de tamaño de partícula. c) Micrografías TEM d) Determinación de planos cristalográficos.

En la figura 16a se muestra el espectro UV-vis característico de estas estructuras después de la purificación, el cual presenta dos bandas con $\lambda_{\max}$ a 440 y 651 nm. Teniendo en cuenta el histograma presentado en la figura 16b, se determinó que el diámetro promedio de las partículas obtenidas esta alrededor de 45.98 ± 8 nm, y las formas de las partículas obtenidas son prismas triangulares, barras, esferas y otras formas indefinidas (Figura 16c). Las dos bandas plasmónicas obtenidas han sido correlacionadas por varios autores con la generación de nanobarras y nanoprismas triangulares, debido a los diferentes ejes de oscilación colectiva de electrones que se presentan en estas formas. En el caso de las nanobarras están presentes dos ejes de oscilación: transversal y longitudinal. La banda asociada con el eje transversal coincide con la banda de plasmón de las nanopartículas de tipo esférico, mientras que la banda longitudinal usualmente esta

desplazada hacia longitudes de ondas mayores, y está asociada con la formación de estructuras anisotrópicas (Toma, Zamarion, Toma, & Araki, 2010). La forma y la posición de estas bandas, está fuertemente asociada con un parámetro que se denomina *relación-aspecto*, el cual se define como la relación entre la longitud y el ancho de las nanobarras (Toma et al., 2010). En el caso de las esferas la *relación-aspecto* es 1, la *relación-aspecto* de las nanobarras obtenidas es pequeña correlacionada con la formación de nanobarras cortas tal como se observa en la figura 17b. Estos resultados están relacionados directamente con las condiciones de síntesis utilizadas, ya que la *relación-aspecto* se ve muy influenciada por el pH y la temperatura de síntesis (Lee, 2004). En el caso de este estudio, el pH fue ajustado a 12 mediante la adición de NaOH y la temperatura fue de 40°C. Estas condiciones fueron asociadas por Lee y col, con la formación de nanobarras de relación de aspecto pequeñas, ya que bajo esas condiciones el poder del reductor del ácido ascórbico es incrementado, dando lugar a un aumento en la velocidad de reducción de los iones plata y una estabilización rápida de las nanopartículas por la presencia del CTAB.

Otro de los productos de síntesis obtenidos fueron los nanoprismas triangulares, en los cuales las bandas de absorción están asociadas con los múltiples ejes de su forma triangular. Por lo general, las bandas plasmón en este caso se denominan excitaciones de plasmón dipolares y cuadrupolares en el plano. La resonancia dipolar es más intensa y se encuentra desplazada hacia longitudes de onda mayores, mientras que cuadrupolar es mucho más débil y se encuentra hacia longitudes de onda menores (Sherry, Jin, Mirkin, Schatz, & Van Duyne, 2006)

La mezcla de formas obtenidas está relacionada con el tipo de surfactante que se usó para generar los sistemas micelares (W. Zhang et al., 2014). Zhang y col, reportaron haber obtenido estructuras similares al utilizar un sistema micelar con CTAB/agua. Además, se ha reportado en estudios previos que la presencia de contraiones como Br⁻, Cl⁻ puede tener un efecto sobre la

forma de las partículas ya que estos iones se adsorben en ciertas facetas cristalinas causando un crecimiento direccionado. Así mismo, se ha reportado que la longitud de la cadena alquílica del surfactante catiónico afecta la velocidad de crecimiento de algunas de las facetas cristalinas de la estructura fcc (Lee, 2004). El efecto de los iones y la longitud de la cadena alquílica fue reportado por Lee y col. al remplazar, en el proceso de síntesis de crecimiento a partir de semillas, el CTAB por los surfactantes CTAC y DTAB (Lee, 2004). Con el primer surfactante se evaluó el efecto del cambio de la longitud de la cadena alquílica y con el segundo se evaluó el efecto del cambio del contraión. El efecto encontrado al realizar estas modificaciones del sistema evaluado fue que el producto de síntesis fue mayoritariamente esferas, a diferencia de los sistemas en los que se utiliza CTAB en los cuales se obtienen nanopartículas anisotrópicas.

Finalmente, con el fin de verificar el tipo de estructura cristalina presente en las AgNPs sintetizadas se realizó la medición de las distancias interplanares en algunas de las micrografías obtenidas mediante TEM. Las mediciones de estas distancias interplanares, permitieron identificar un plano Ag (111), el cual está relacionada con la formación de estructuras tipo fcc (Figura 16d)

4.3.4. Determinación del potencial Zeta

A continuación, se presenta en la tabla 2 los valores del potencial zeta para las estructuras obtenidas en cada uno de los sistemas micelares empleados como medio de reacción.

Tabla 2. *Valores de potencial Zeta de las AgNPs obtenidos en cada uno de los sistemas micelares.*

Sistema micelar	Potencial Zeta (mV)
AOT/ agua	-40.4± 7.74
AOT/isooctano	-45.8±5.94
CTAB/agua	+43.6±12.9

En la tabla 2 se observa que los valores de potencial Zeta de las AgNPs obtenidas mediante sistemas micelares compuestos del surfactante AOT corresponden a valores negativos, los cuales están asociados a la carga que proporcionan las moléculas de AOT residuales en la superficie de la nanopartícula. Adicionalmente, cabe mencionar que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango en el cual se consideran que las AgNPs son estables (valores más positivos que +30 mV y más negativos que -30) (Paszkievicz et al., 2016).

Por otro lado, los valores del potencial Zeta de las AgNPs obtenidas mediante sistemas micelares usando el surfactante CTAB corresponden a valor positivos, los cuales están asociados a la carga que proporcionan las moléculas de CTAB residuales en la superficie de la nanopartícula. Al igual que en el caso de los otros dos sistemas micelares, los valores se encuentran dentro del rango de estabilidad.

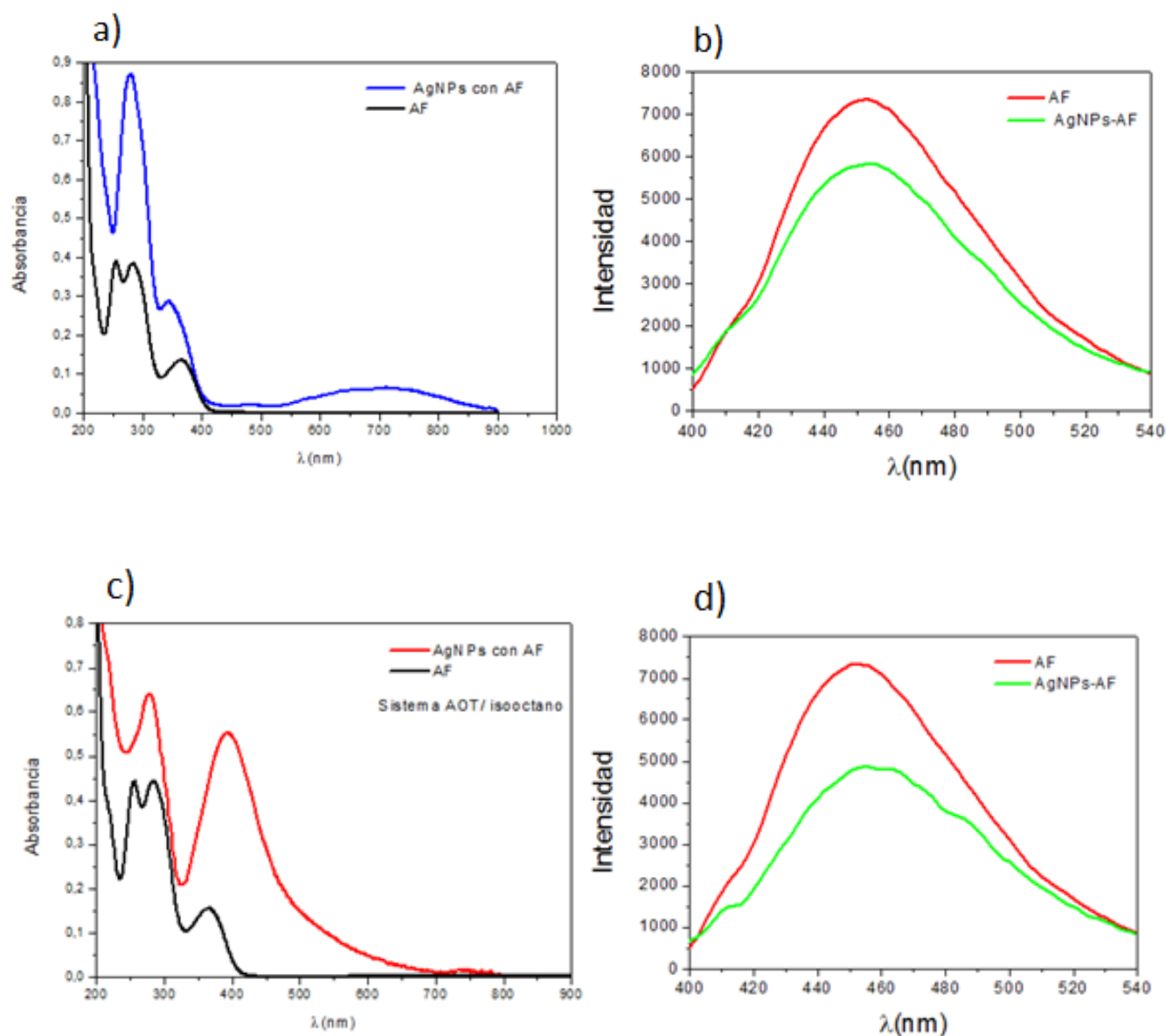
4.4. Caracterización de las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico

Las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico fueron caracterizadas por medio de espectroscopia UV-vis, emisión de fluorescencia, infrarrojo, y RAMAN, con el fin de analizar las interacciones entre las AgNPs y el ácido fólico. Adicionalmente, se realizaron mediciones del potencial Zeta con el fin de determinar la carga superficial y la estabilidad de las AgNPs después de la funcionalización.

4.4.1. Caracterización de la funcionalización de las AgNPs por UV-vis, fluorescencia y potencial Zeta.

4.4.1.1. *AgNPs@AF obtenidas a través del sistema micelar AOT/agua y el sistema micelar AOT/isooctano.*

En la figura 17 se observan los espectros UV-Vis y de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF mediante los sistemas micelares AOT/agua y AOT/ isooctano.



*Figura 17.*a) Espectro UV-vis de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar AOT/agua b) Espectro de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar AOT/agua c) Espectro UV-vis de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema AOT/ isooctano d) Espectros de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ agua.

En la figura 17a y 17c, se observan cambios en la banda UV-vis característica del ácido fólico, al interaccionar esta molécula con las AgNPs. Entre estos cambios están el aumento su absorbancia y la desaparición el doblete característico del ácido fólico en su forma básica.(G. Li, Magana, & Dyer, 2012). Esta modificación de la banda UV-vis del ácido fólico al interaccionar con AgNPs, también fue evidenciada en el estudio realizado por *Boca-Farcau* y col. los cuales sintetizaron AgNPs de forma triangular a través de la metodología de crecimiento a partir de semillas, y evaluaron el efecto térmico que estas podían generar al internalizarse en las células HeLa.

Adicionalmente a los análisis de espectroscopia UV-vis, se realizaron análisis por medio de espectroscopia de emisión de fluorescencia, la cual permite verificar la interacción entre NPs y fluoróforos como el ácido fólico, a través del efecto de aumento o apagamiento de la intensidad de la fluorescencia del fluoroforo al estar unido a la NPs .En el presente trabajo se utilizó una concentración del ácido fólico de 5×10^{-5} M., y una concentración aproximada de Ag de 200 μ M. La longitud de excitación usada fue de 364 nm.

En la figura 17b y 17d, se observan los espectros de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF obtenidas para los sistemas micelar AOT/agua y AOT/ isooctano y del AF libre. Se evidencia en ambos espectros es una disminución de la fluorescencia del AF. La fluorescencia de fluoróforos podría incrementarse o disminuirse debido a la presencia de NP metálicas. Este

aumento o disminución de la fluorescencia está influenciado por factores como el tamaño y forma de las NP, la orientación del fluoróforo, momentos dipolares relativos a las NPs, la tasa de decaimiento radiativo y rendimiento cuántico del fluoróforo (Lakowicz, 2006). Lakowicz y col. reportaron que a distancias muy cortas (<5 nm) entre la superficie de la AgNP y el fluoróforo, se observa una disminución de la fluorescencia. Del fluoróforo. (Lakowicz, 2005)

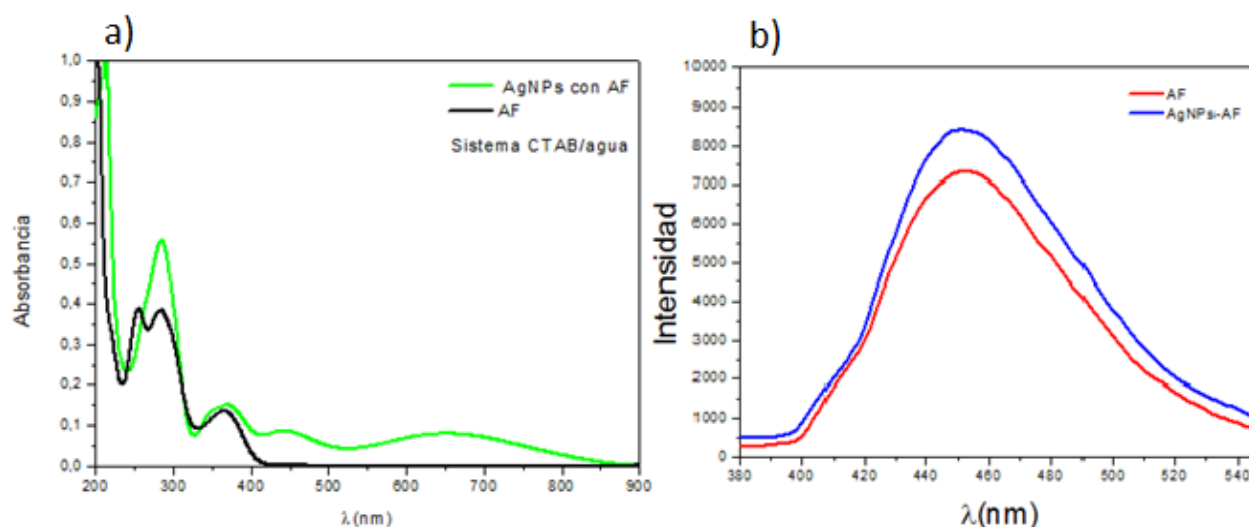
Entre los estudios que soportan este efecto “quenching” están el de *Zhao y col*, los cuales evidenciaron una disminución de la fluorescencia del 7-metoxi-8-(3-metil-2-butenil)-benzopiran-2-ona, la cual es una cumarina que actúa como bloqueador de los canales de calcio que se encuentran en las plantas. Ellos determinaron que para que se diera esta disminución de la fluorescencia debía aumentarse la velocidad no radiante del fluoróforo debido a la transferencia de energía y a la disminución de la velocidad radiante (Zhao et al., 2013). Adicionalmente, ellos estudiaron el efecto del tamaño de partícula sobre el grado de disminución de la fluorescencia del fluoróforo. Evaluaron partículas de 5, 8, 12, 17 y 25 nm, viendo que a medida que aumentaba el tamaño el efecto “quenching” aumentaba. (Zhao et al., 2013). Al correlacionar los resultados mencionados con los obtenidos para AgNPs@AF con los sistemas micelares AOT/ isooctano y AOT/ agua, es posible entender la razón porque las AgNPs@AF del sistema AOT/ agua, generaron una mayor disminución de la fluorescencia, que las obtenidas con el sistema AOT/isooctano. Las AgNPs@AF (sistema AOT/ isooctano) generaron un mayor efecto “quenching” debido a que el tamaño obtenido promedio fue de 12.61 ± 6 nm, mientras que con el sistema AOT/agua fue de 21.46 ± 5 nm.

Otro de los estudios que está acorde los resultados observados fue el realizado por *Pramanik y col*, los cuales evidenciaron que la formación de la monocapa de AOT estabilizante, no impide la interacción cercana de las AgNPs con moléculas de Safranina (Colorante); evidenciando así una

disminución de la fluorescencia del colorante. Las NPs en este estudio fueron sintetizadas mediante un sistema de micelas inversas al igual que los autores mencionados (Pramanik, Bhattacharya, & Imae, 2007).

4.4.1.2. *AgNPs@AF obtenidas a través del sistema micelar CTAB/agua*

En la figura 18. se observan el espectro UV-vis y de emisión de fluorescencia de las AgNPs@AF mediante el sistema CTAB/ agua



Con relación al espectro de emisión de fluorescencia obtenido (Figura 18b), se observó un incremento de la fluorescencia del AF. Estas diferencias observadas entre los sistemas micelares con CTAB y con AOT, pueden estar relacionadas con organización del surfactante para estabilizar las AgNPs, en el caso del surfactante AOT este las estabiliza las AgNPs, a través de la formación de una monocapa (Salabat, 2010) en la superficie, mientras que el surfactante CTAB las estabiliza mediante la formación de una bicapa (Hedberg et al., 2012) o de clusters micelares que rodean la superficie de las AgNPs (Skoglund et al., 2017) (Figura 19). La forma en que el surfactante se

organice en la superficie de las AgNPs determina la distancia de interacción entre la AgNP y el fluoróforo (AF).

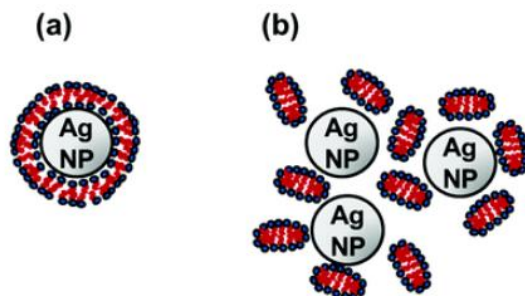


Figura 19. Representación de los dos posibles mecanismos de estabilización del surfactante CTAB
a) Formación de una bicapa en las AgNPs b) Presencia de clúster micelares que rodean la superficie de las AgNPs.

Los resultados obtenidos para las AgNPs@AF sintetizadas a través de un sistema CTAB/ agua, en las cuales se evidencio un incremento de la fluorescencia del AF, estar acordes con los resultados obtenidos en el estudio realizado por *Li y col* los cuales sintetizaron AgNPs cubiertas con 4-aminotiofenol, y al adicionar el fluoróforo naranja de acridina, la fluorescencia del colorante se incrementaba en presencia del 4-Aminotiofenol. Ellos afirman que esta molécula actúa como una “capa aislante” entre la superficie del metal y el fluoróforo, lo cual genera un aumento de la distancia de interacción entre los dos (M. Liu et al., 2011).

Por otro lado, el estudio realizado por *Liu y Wu*, evidenciaron que la presencia de las micelas de CTAB, generan un incremento de la fluorescencia de la molécula fisetina, la cual es un flavonoide. De acuerdo con los autores, las moléculas de Fisetina se solubilizan en la capa de Stern de las micelas de CTAB, y se enlazan principalmente a los grupos de cabeza de las micelas por interacciones electrostáticas y por efecto hidrofóbico. La presencia de las micelas entre las AgNP

y el fluoróforo genero un aumento de la fluorescencia. Los autores mencionan que posiblemente, el mecanismo mediante el cual se da este aumento es debido al efecto de acoplamiento de los dipolos oscilantes de la fisetina y el plasmón de resonancia de las AgNPs (X. Liu & Wu, 2015).

4.4.1.3. *Determinación del potencial Zeta*

En la tabla 3 se indican los valores del potencial zeta para las AgNPs@AF obtenidas en cada uno de los sistemas micelares empleados como medio de reacción.

Tabla 3. Valores de potencial Zeta de las AgNPs@AF obtenidos en cada uno de los sistemas micelares.

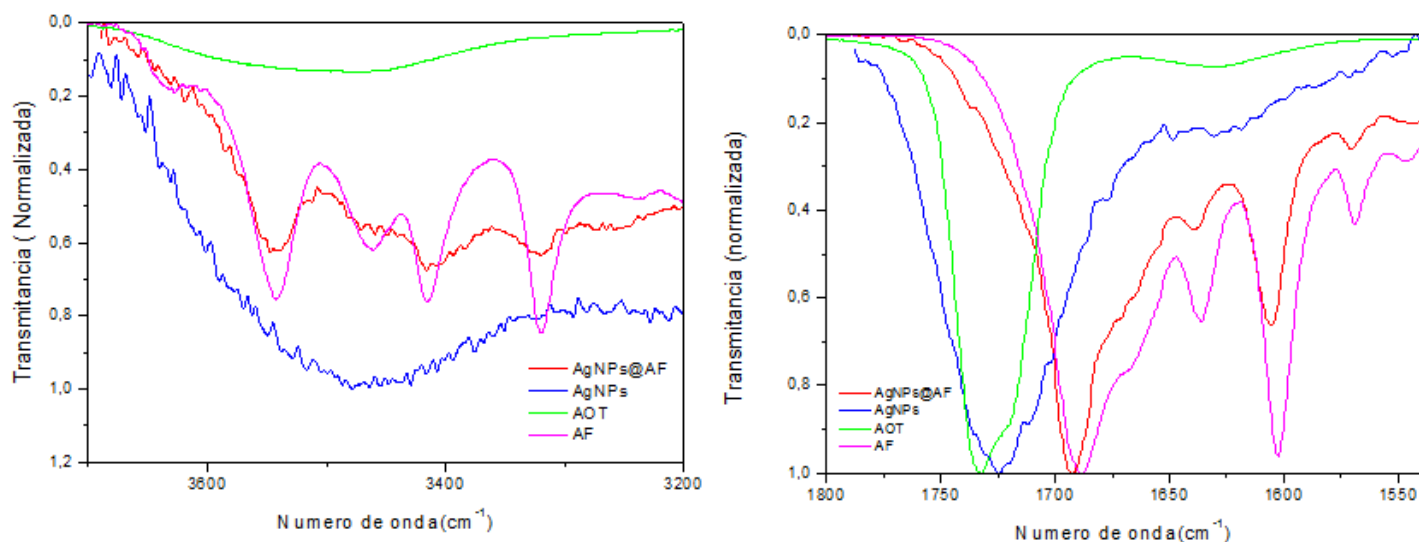
Sistema micelar	Potencial Zeta (mV)
AOT/ agua	-34.7 $\pm$ 7.03
AOT/isooctano	-36.3 $\pm$ 4.04
CTAB/agua	+43.9 $\pm$ 5.39

En la tabla 3 se observa que los valores de potencial Zeta de las AgNPs@AF preparadas mediante sistemas micelares conformados por el surfactante AOT corresponden a valores negativos, mientras que con AgNPs@AF preparadas mediante el sistema conformado con el surfactante CTAB el valor es positivo. Al igual que las AgNPs sus cargas están asociados a la carga proporcionada por las moléculas de AOT y CTAB residuales en la superficie de las nanopartículas, Adicionalmente, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango en el cual se consideran que las AgNPs son estables (valores más positivos que +30mV y más negativos que -30) (Paszkievicz et al., 2016).

4.4.2. Caracterización de la funcionalización de las AgNPs por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y raman.

4.4.2.1. Caracterización por FTIR de las AgNPs@AF sintetizadas a través de sistema micelar de AOT/ agua.

En la figura 20 se observan los espectros de FTIR de las AgNPs y las AgNPs@AF, junto con los espectros del ácido fólico y el AOT puros.



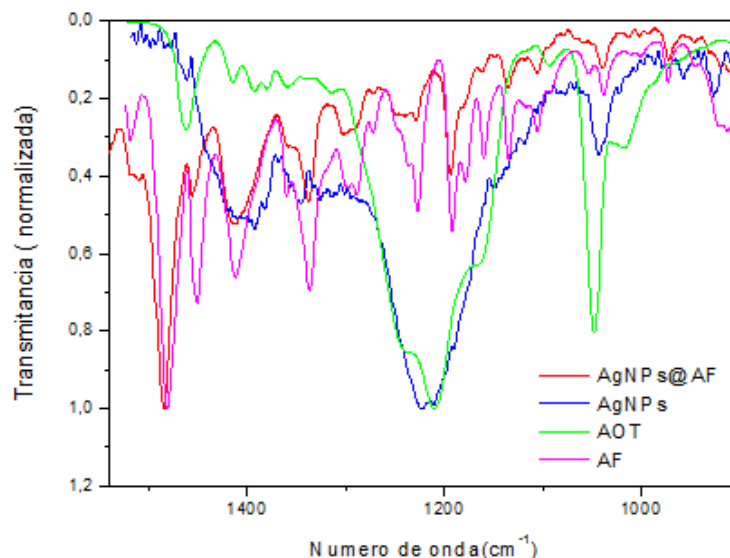


Figura 20. Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y AOT. (Sistema AOT/agua)

Tabla 4. Algunas asignaciones de las bandas de FTIR del AF libre y de AgNPs@AF (Sistema AOT/agua).

AF libre (cm ⁻¹)	AgNPs@AF (cm ⁻¹)	Asignación
3321	3318	Alargamiento OH (Ácido glutámico)
3542	3546	Alargamiento -NH ₂ (Pterina)
1482	1484	Alargamiento C=C aromático
1689	1693	Alargamiento -C=O (Pterina)
1603	1605	Flexión -C(NH ₂)(Pterina)

Las vibraciones asociadas a los grupos OH pertenecientes a la porción del ácido glutámico del AF y al grupo -NH₂ del anillo pterínico: 3321 cm⁻¹ y 3542 cm⁻¹ (Rawat, Singhal, & Kailasa, 2017) presentaron desplazamientos después de su interacción con las AgNPs (3318 cm⁻¹ y 3546 cm⁻¹

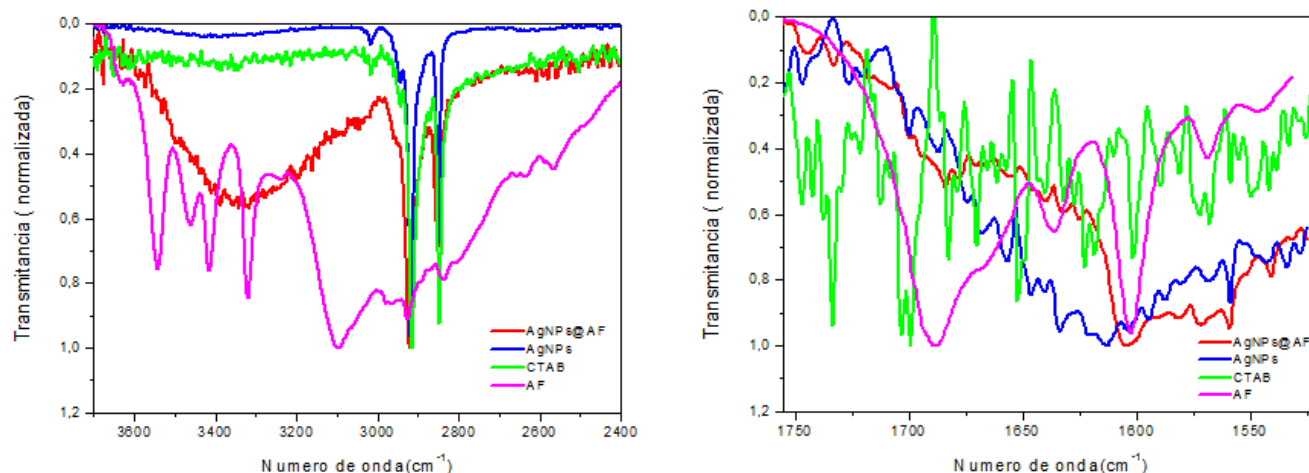
respectivamente)(Rawat et al., 2017) . La banda asociada al anillo aromático y al anillo pterínico: 1482 cm^{-1} (Rawat et al., 2017) también presento un desplazamiento (1484 cm^{-1}) en el espectro de las AgNPs@AF. Finalmente, las bandas asociadas a la vibración de los grupos C=O y -C (NH₂): 1689 cm^{-1} y 1603 cm^{-1} (G. Li et al., 2012) presentaron corrimientos (1693 cm^{-1} y 1605 cm^{-1} , respectivamente).(Tabla 4.)

Estos desplazamientos en las bandas vibracionales del ácido fólico indican que las AgNPs están posiblemente interaccionando con el ácido fólico tanto por el grupo amino del anillo pterínico, así como por ácidos carboxílicos, de la porción del ácido glutámico del ácido fólico.

Adicionalmente, en los espectros tanto de las AgNPs como las AgNPs@AF se evidencia la presencia de una de las bandas característica del surfactante AOT, la cual está asociada con el grupo S=O del ion sulfonato (1047 cm^{-1}). Esto indica que a pesar de realizar lavados con una solución de agua/ etanol, aún permanecen algunas moléculas del surfactante en la superficie de las AgNPs y AgNPs@AF. Esta evidencia de interacción observada a partir de los espectros IR, se correlaciona con la estabilización de las NP, con el valor negativo del potencial zeta.

4.4.2.2. Caracterización por FTIR de las AgNPs@AF sintetizadas a través del sistema micelar de CTAB/ agua

En la figura 21 se observa los espectros de IR de las AgNPs y las AgNPs@AF, además de los espectros del ácido fólico y el CTAB puros.



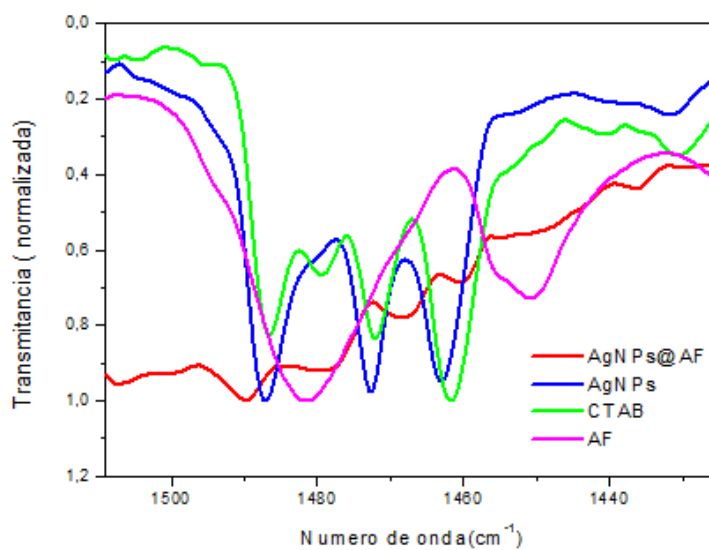


Figura 21. Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y CTAB. (Sistema CTAB/agua)

Tabla 4. Algunas asignaciones de las bandas de FTIR del AF libre y de AgNPs@AF

AF libre (cm^{-1})	AgNPs@AF (cm^{-1})	Asignación
3321	-----	Alargamiento OH (Ácido glutámico)
3542	-----	Alargamiento NH_2 (Pterina)
1482	1489	Alargamiento C=C aromático
1689	1684	Alargamiento C=O (Pterina)
1603	1605	Flexión $\text{C}(\text{NH}_2)$ (Pterina)

Las vibraciones asociadas a los grupos OH pertenecientes a la porción del ácido glutámico del AF y al grupo -NH_2 del anillo pterínico: 3321 cm^{-1} y 3542 cm^{-1} (Rawat et al., 2017), no aparecen

debido en esa región aparece una banda ancha alrededor de 3335 cm^{-1} , la cual se atribuye a la presencia de grupos OH. Estos grupos hidroxilo pueden estar asociados con el NaOH, utilizado para lograr el pH básico necesario para la reacción, o de los residuos de la solución agua/ etanol, que se utilizó en los dos lavados realizados para eliminar el exceso de surfactante. La banda asociada al anillo aromático y al anillo pterínico: 1482 cm^{-1} (Rawat et al., 2017) presenta un desplazamiento (1489 cm^{-1}) en el espectro de las AgNPs@AF. Finalmente, las bandas asociadas a las vibraciones del grupo C=O y C (NH₂): 1689 cm^{-1} y 1603 cm^{-1} (G. Li et al., 2012) presentaron también un desplazamiento al interaccionar la AgNPs con el AF (1684 cm^{-1} y 1605 cm^{-1} , respectivamente).

Estos desplazamientos en las bandas vibracionales relevantes del ácido fólico al igual que en el sistema anterior, indican que las AgNPs están posiblemente interaccionando con el AF. Sin embargo, en este caso la interacción parece que se da a través el grupo amino del anillo pterínico y no a través de los grupos carboxilo, ya que no se evidencia una banda definida correspondiente a los grupos OH de la porción del ácido glutámico del AF.

Adicionalmente, en los espectros de AgNPs y AgNPs@AF se evidencia la presencia de algunas bandas características del surfactante CTAB, entre las cuales se observan los estiramientos simétricos y antisimétricos (2848 cm^{-1} y 2915 cm^{-1}) del grupo $-(\text{CH}_2)-$ y la deformación antisimétrica (1462 cm^{-1}) (Huang, Chen, & Li, 2001). Lo anterior indica que a pesar de realizar lavados con una solución de agua/etanol, aún permanecen algunas moléculas del surfactante en la superficie de las AgNPs y AgNPs@AF. Esta evidencia observada a partir de los espectros IR, se correlaciona con el valor positivo de potencial zeta.

4.4.2.3. Caracterización por FTIR de las AgNPs@AF sintetizadas a través de sistema micelar de AOT/ isooctano

En la figura 22 se observa los espectros IR de las AgNPs y las AgNPs@AF, además de los espectros del ácido fólico y el AOT puros.

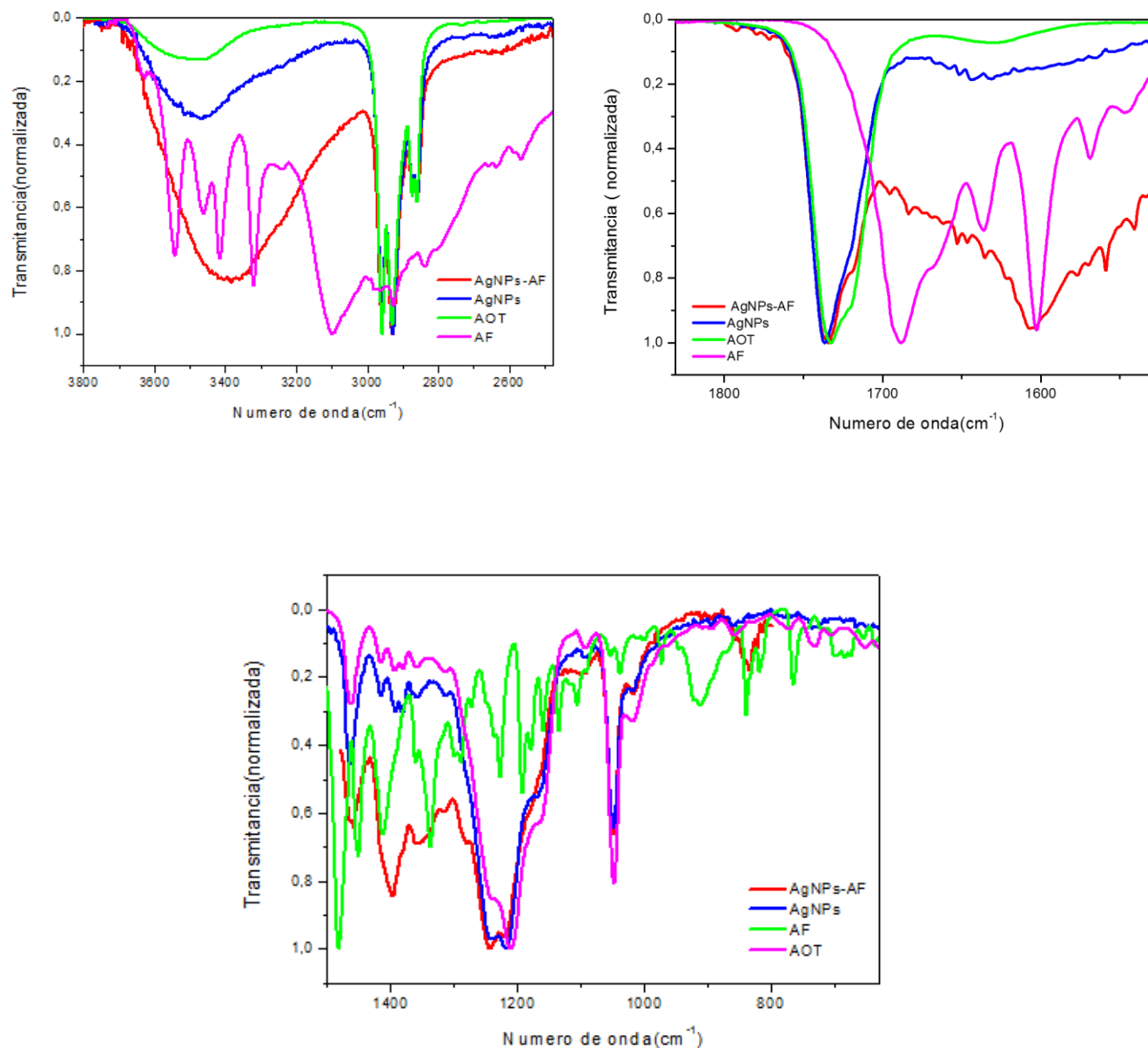


Figura 22. Espectros de FTIR de las AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y AOT (Sistema AOT/isooctano)

Tabla 5. Asignaciones de las bandas de FTIR del AF libre y de AgNPs@AF (Sistema AOT/isooctano)

AF libre (cm^{-1})	AgNPs@AF (cm^{-1})	Asignación
3321	-----	Alargamiento OH (Ácido glutámico)
3542	-----	Alargamiento NH_2 (Pterina)
1482	-----	Alargamiento $\text{C}=\text{C}$ aromático
1689	1694	Alargamiento $\text{C}=\text{O}$ (Pterina)
1603	1606	Flexión $\text{C}(\text{NH}_2)$ (Pterina)

Las vibraciones asociadas a los grupos OH de la porción del ácido glutámico del AF y al grupo -NH_2 del anillo pterínico: 3321 cm^{-1} y 3542 cm^{-1} (Rawat et al., 2017), no se evidenciaron debido a que en su lugar aparece una banda ancha en 3335 cm^{-1} correspondiente a grupos OH. La banda asociada al anillo aromático y al anillo pterínico: 1482 cm^{-1} (Rawat et al., 2017) no aparece en el espectro de las AgNPs@AF. Finalmente, las bandas asociadas a las vibraciones de los grupos $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}(\text{NH}_2)$: 1689 cm^{-1} y 1603 cm^{-1} (G. Li et al., 2012) presentaron también desplazamiento al interaccionar la AgNPs con el AF (1694 cm^{-1} y 1606 cm^{-1} , respectivamente) (tabla 5.).

Los desplazamientos y la desaparición de las bandas vibracionales observadas, relevantes del ácido fólico al igual que en el sistema anterior, indican que las AgNPs posiblemente interaccionan con el AF. Sin embargo, en este caso pareciera que la interacción se diera a través el grupo amino del anillo pterínico y no a través de los grupos carboxilo, ya que no se evidencia una banda definida correspondiente a los grupos OH de la porción del ácido glutámico del AF.

Al igual que los espectros obtenidos para el sistema AOT/ agua, en el sistema AOT/isooctano también se evidencia la presencia de una de las bandas característica del surfactante AOT, la cual está asociada con el grupo S=O del ion sulfonato (1047 cm^{-1}).

4.4.2.4. Caracterización por espectroscopia Raman de las AgNPs y AgNPs@AF sintetizadas a través de un sistema AOT/ agua y AOT/ isooctano.

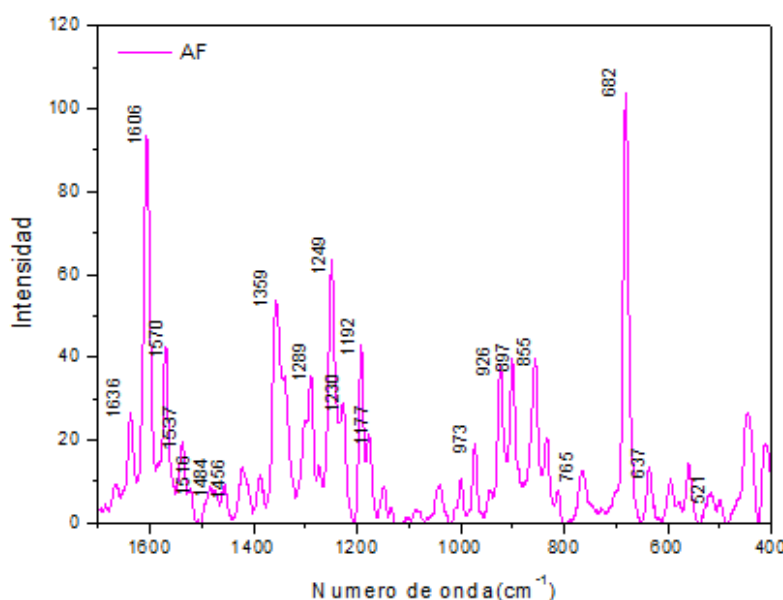
Al realizar la caracterización de estos sistemas a través de esta técnica, no se pudieron asignar las bandas correspondientes al AF, debido a que las bandas del surfactante AOT, solapan algunas de las bandas representativas. Las bandas Raman del surfactante AOT que fueron identificadas estuvieron asociadas a vibraciones del grupo sulfonato y el carbonilo (527 cm^{-1} y 650 cm^{-1} , respectivamente). Los espectros de las AgNPs obtenidas a través de estos dos sistemas se encuentran en la sección de anexos.

4.4.2.5. Caracterización por espectroscopia Raman de las AgNPs y AgNPs@AF sintetizadas a través de un sistema CTAB/ agua

En la figura 23a observa la presencia de bandas representativas del AF, las de mayor interés son las que podrían estar implicadas con la interacción de las AgNPs con el AF. Entre esas bandas se encuentran las asociadas con vibraciones del grupo NH_2 de la pterina y con los grupos OH de los carboxilos que se encuentran en la porción del ácido glutámico. En los anexos se presenta una tabla con las asignaciones de las bandas representativas del AF. Estas asignaciones fueron realizadas en el estudio desarrollado por Castillo y col., los cuales estudiaron la adsorción del AF sobre nanopilares de sílice cubiertos de plata, a través de espectroscopia Raman por incremento de superficie (SERS por sus siglas en inglés) y mediante cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) (Castillo et al., 2015).

En la figura 24b, se muestran los espectros de las AgNPs, AgNPs@AF y el CTAB. En el espectro de las AgNPs@AF se evidencia la presencia de bandas asociadas a las vibraciones de los grupos C=N (1590 cm^{-1} , 1592 cm^{-1} , 686) (Castillo et al., 2015) y el grupo OH de la pterina (1590 cm^{-1} y 686 cm^{-1}) (Castillo et al., 2015). Adicionalmente, se muestran las bandas asociadas con las vibraciones del grupo NH_2 perteneciente a la pterina (1592 cm^{-1}) y de los grupos OH pertenecientes a la porción del ácido glutámico (1236 cm^{-1} y 854 cm^{-1}). Estas bandas presentan corrimientos respecto a las encontradas en el AF libre, lo cual indica que posiblemente se está dando una interacción entre el AF y las AgNPs. Lo anterior se correlaciona con lo observado a través de la espectroscopia infrarrojo.

Adicionalmente, en el espectro Raman del surfactante se observa una banda representativa asociada a las vibraciones del grupo de cabeza de trimetilamonio (758 cm^{-1}). Estas observaciones serían una evidencia de la adsorción de CTAB a través de la interacción electrostática con el grupo de cabeza orientado hacia la superficie de AgNP con carga negativa. La carga superficial positiva neta (observada por las mediciones de potencial Zeta) surge de una combinación de una atracción electrostática entre el grupo de cabeza catiónico del surfactante y las AgNPs cargadas negativamente. Las interacciones hidrofóbicas entre las colas promueven la formación de una bicapa en la superficie de las AgNPs de bicapa del surfactante en la superficie. (Hedberg et al., 2012).



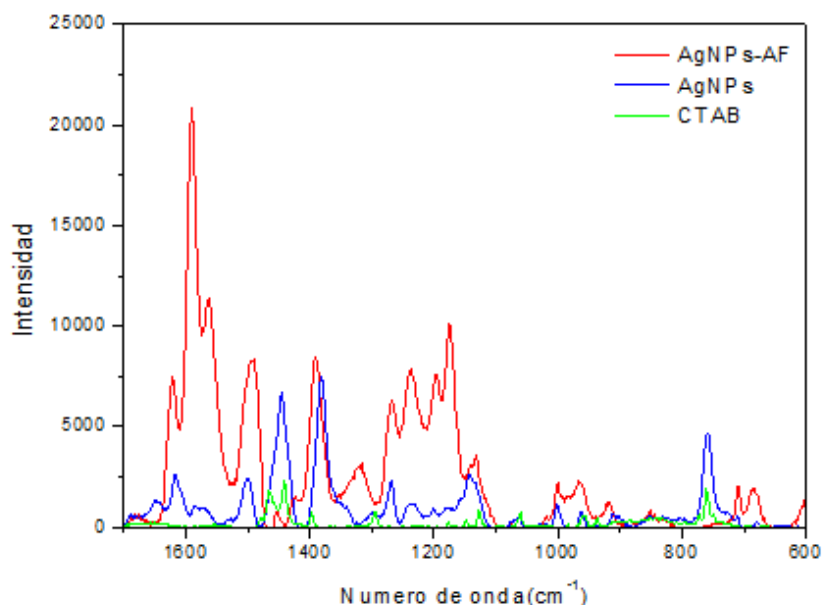


Figura 23. Espectros de Raman a) AF libre b) AgNPs, AgNPs@AF, AF libre, y CTAB.

5. Fotoactivación de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico y su efecto en células HeLa

5.1. Sección experimental

5.1.1. Evaluación de la respuesta térmica de las soluciones de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico

La fuente de irradiación utilizada, de marca ThorLabs Newton USA, está compuesta por un diodo láser de 808 nm y 638 nm, un regulador de temperatura del diodo, y un regulador de potencia.

Se irradiaron las soluciones de AgNPs y AgNPs- AF (2 mL) durante 10 minutos, registrando el aumento de temperatura cada minuto. Para el láser de 808 nm la potencia fue ajustada a un valor de 800 mW, mientras que para el láser de 638 nm la potencia fue ajustada en un valor de 650 mW.

MICELAS COMO NANOREACTORES

Para todos los experimentos la distancia entre la solución analizada y el diodo laser fue de aproximadamente 5 cm (Figura 24).



Figura 24. Montaje experimental para la irradiación de las soluciones de AgNPs con y sin funcionalización.

Los ensayos fueron realizados dispersando las AgNPs sin funcionalizar en el medio EMEM. La concentración de AgNPs se reporta en términos de $\mu\text{g (Ag)/mL}$. Los cálculos de la concentración inicial de Ag usada fue la usada en cada uno de los procesos de síntesis.

Tabla 6. *Concentraciones iniciales de Ag usadas en los proceso de síntesis usando micelas como medios de reacción.*

Método de síntesis	Concentración de Ag ($\mu\text{g/mL}$)
AOT/ agua	26.97
CTAB/agua	62.8
AOT/isooctano	60

Partiendo de las concentraciones de Ag mencionadas en la Tabla 6 se realizaron las respectivas diluciones de tal forma que la concentración en todos los casos fuera equivalente a 21.6 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 200 \mu\text{M}$). Esta última concentración fue la que se usó para realizar los ensayos de respuesta térmica.

5.1.2. Ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido fólico en células HeLa con y sin irradiación con IRC.

Para la realización de estos ensayos se utilizó la línea de células epiteliales HeLa, las cuales corresponde a células inmortalizadas de adenocarcinoma cervical humano. El crecimiento de esta línea celular se da a través de la adherencia de estas a la base de una caja o placa de cultivo. El medio de cultivo utilizado para esta línea celular fue *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM). A este medio de cultivo base se le adiciono suero fetal bovino (10%).

La viabilidad celular se define como el porcentaje de células viables dentro de una población total. Debido a que las células viables se encuentran metabólicamente activas, es posible determinar la viabilidad celular por medio de métodos colorimétricos como el método MTT (sal de bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol-2- il)-2,5-difenil tetrazolio). Este método se basa en el hecho de que las células viables o metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio, formando cristales de formazan insolubles en solución acuosa y (Cloruro de tetrazolio) solubles en DMSO que se cuantifican midiendo su absorción a 570nm (Mosmann, 1983).

Las células HeLa (960.000 células/pozo) se adicionaron en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C con atmosfera de CO₂ (5%) durante 24 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, las células se trataron con las AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar en medio EMEM, de acuerdo a las concentraciones mostradas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. *Concentraciones de las AgNPs usadas para los ensayos biológicos con células HeLa*

	Concentración	Concentración	Concentración
	1 (μM)	2(μM)	3(μM)
AOT/agua	200	100	20
CTAB/agua	200	100	20
AOT/Isooctano	200	100	20

Los tiempos de tratamiento que se evaluaron fueron 2 y 4 horas. En el caso de los ensayos sin irradiación, una vez termino el tiempo de tratamiento, se descartó el medio, y en su lugar se adicionaron 200 μL de solución MTT (500μg/mL en solución de HBSS). Se dejó en incubación durante 3 horas, y posteriormente se descarta la solución MTT y se adicionan 200 μL de DMSO, para lograr solubilizar los cristales formados. Finalmente, se realizó la lectura de la placa a 570 nm en un lector de microplacas Multiskan™ GO. El resultado obtenido de la lectura de las placas corresponde a los valores de absorbancia tanto de los controles como de cada uno de los pozos de tratamiento. Estos valores de absorbancia permiten calcular los porcentajes de viabilidad celular por medio de la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de los tratamientos}}{\text{Promedio de absorbancia de los controles}}$$

En el caso de los ensayos de irradiación pasado el tiempo de tratamiento, fue retirado el medio celular, y en su lugar fueron adicionados 200 μL medio EMEM nuevo, con el fin de descartar las AgNPs que no lograron internalizarse. Finalmente, las células fueron irradiadas durante 5 minutos en cada pozo a una potencia de 800 mW para el láser de 800 nm y 650 mW para el láser de 638 nm (Figura 25).-Una vez culminado el proceso de irradiación, se retiró el medio EMEM y se

adicionó el reactivo MTT. Los pasos posteriores son los mismos a los mencionados en el caso de los ensayos sin irradiación.

Los resultados de viabilidad celular fueron comparados usando el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de comparación de múltiples medias (test de Tukey)



Figura 25. Montaje experimental dentro de una cabina de flujo laminar para la irradiación con IRC de las células tratadas con AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar obtenidas mediante los tres sistemas micelares propuestos.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Respuesta térmica generada por la interacción de las nanopartículas de plata

5.2.1.1. Respuesta térmica usando el láser de 638 nm

Las soluciones de AgNPs evaluadas fueron las sintetizadas a través de los tres sistemas micelares descritos anteriormente y resuspendidas en el medio celular EMEM. La concentración seleccionada a evaluar en estos ensayos fue $200\mu\text{M}$, ya que a esta concentración no se evidenciaron efectos citotóxicos propios de las AgNPs.

Se evaluó el efecto termico generado por la irradiación de las nanopartículas de plata obtenidas en los tres sistemas micelares, usando láser de 638nm y una potencia de 650 mW (Figura 26).

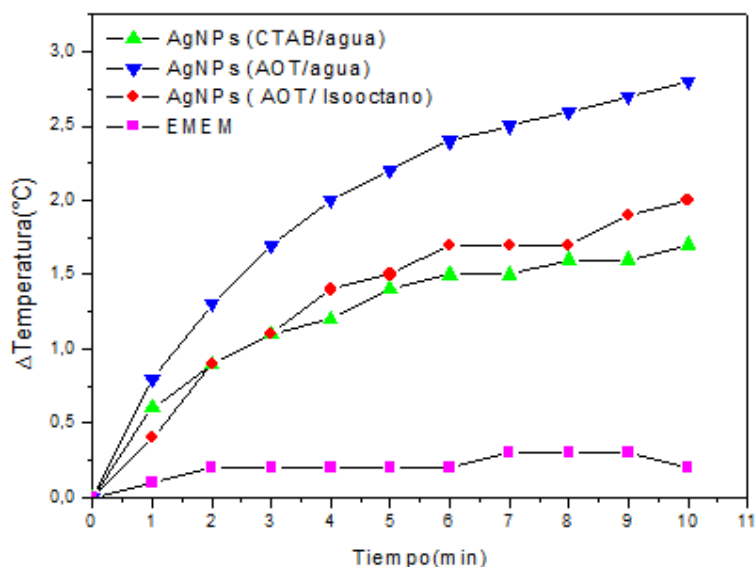


Figura 26. Curvas de calentamiento de las soluciones de AgNPs solubilizadas en medio EMEM irradiadas con el láser de 638 nm y una potencia de 650 mW. La temperatura inicial fue 21.4 °C.

Se observó un aumento de la temperatura poco significativo (ΔT : 0.2°C) con el blanco (EMEM). En cambio el calentamiento observado de las tres soluciones de AgNPs fue significativo. Los aumentos ΔT obtenidos para las soluciones de AgNPs con los sistemas AOT/agua, AOT/ isooctano y CTAB/ agua fueron 2.8, 2.0, y 1.7°C, respectivamente (Figura 27). Estas diferencias en los aumentos de temperatura, pueden estar relacionadas con factores la forma (Baffou, Quidant, & Girard, 2009), el tamaño (Iyahraja & Rajadurai, 2015) , el grado de polidispersión en tamaño o forma de las partículas (Qin et al., 2016), y el grado de solapamiento de la banda de plasmón con la longitud de onda de láser (Momen, 2016). La relación del tamaño y la forma de las NPs con su capacidad para generar un aumento de temperatura en el medio que la rodea, se relaciona con el

balance entre la dispersión y absorción de la radiación, la cual varía dependiendo de la magnitud esas dos variables (Baffou et al., 2009)

El mayor aumento de la temperatura se obtuvo en el caso de las AgNPs del sistema AOT/agua, la razón está relacionada con el tipo de geometría obtenido, el cual fue mayoritariamente triangulares. De acuerdo con *Baffou*, este tipo de geometría parece mostrar una mayor eficiencia térmica, debido a la presencia de esquinas y bordes puntiagudos. Adicionalmente, los mismos autores evidenciaron que las geometrías planas presentan una mayor eficiencia térmica, en comparación con estructuras como las nanobarras (Baffou et al., 2009). Adicionalmente, se debe tener en cuenta que su tamaño promedio fue 20-30 nm.

La poca diferencia entre los aumentos observados para las soluciones de AgNPs con los sistemas (AOT/Isooctano) y (CTAB/agua), a pesar de su diferencia en cuanto a las formas obtenidas; podría estar relacionada con la formación de algunos agregados que se evidencian en las AgNPs (sistema AOT/ Isooctano) (Figura 27) y el tamaño promedio obtenido en el caso las soluciones de NPs obtenidas mediante el sistema CTAB/agua (40-50 nm). De acuerdo con Maity y col. la presencia de agregados o de NPs de tamaño grande, incrementa la dispersión de la radiación, dando lugar a que se dé una eficiencia fototérmica baja.(Maity, Downen, Bochinski, & Clarke, 2011)

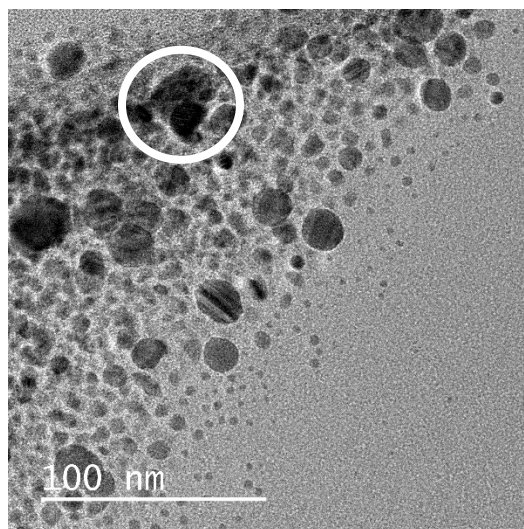


Figura 27. Micrografía de las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/ isooctano en la cual se evidencia la formación de algunos agregados.

5.2.1.2. Respuesta térmica usando el láser de 808nm

Las condiciones utilizadas para realizar este ensayo, fueron las mismas que se utilizaron para evaluar la respuesta térmica usando el láser de 638 nm.

Las curvas de calentamiento correspondientes a la irradiación con el láser de 638 nm y una potencia de 650 mW se observan en la figura 28.

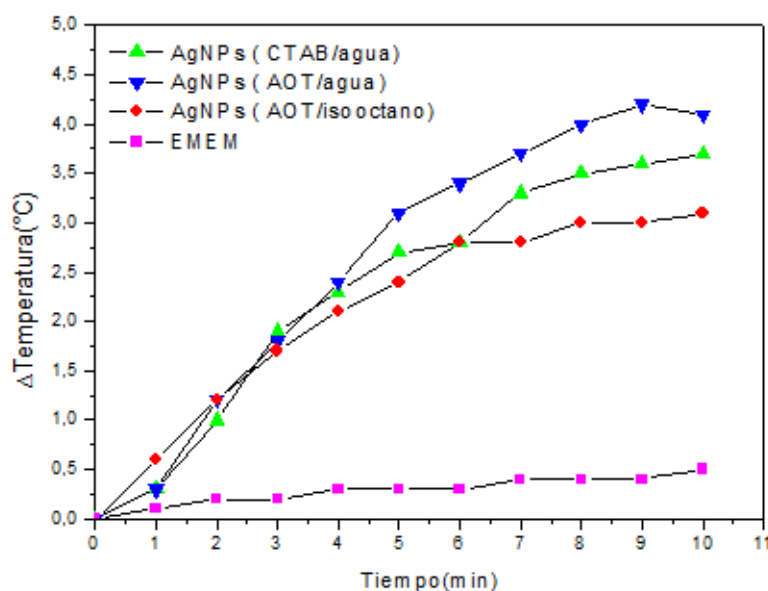


Figura 28. Curvas de calentamiento de las soluciones de AgNPs solubilizadas en medio EMEM irradiadas con el láser de 808nm y una potencia de 800 mW. La temperatura inicial fue 21.4 °C.

Con el blanco (EMEM) se observó un aumento de la temperatura poco significativo (ΔT : 0.5°C), con las soluciones de las AgNPs, los aumentos ΔT observados para los sistemas AOT/agua, AOT/ isooctano y CTAB/ agua fueron 4.1, 3.1 y 3.7°C, respectivamente. Estas diferencias en los

aumentos de temperatura, están relacionadas con los mismos factores mencionados en el caso de las curvas de calentamiento realizadas utilizando el láser de 638 nm.

El mayor aumento se observó con las AgNPs obtenidas mediante el sistema AOT/agua. La razón del mayor aumento, está relacionada con el tipo de geometría obtenido (formas triangulares) y el solapamiento de la banda de plasmón con la longitud de onda de la radiación. En comparación, con los otros dos sistemas, en el sistema AOT/ agua, la segunda banda de plasmón se encuentra desplazada hacia la región del infrarrojo cercano, permitiendo así que haya ese solapamiento de la banda de plasmón con la longitud de onda del láser, y dando lugar así a un aumento de la eficiencia para generar el efecto térmico.

En el caso de las AgNPs sintetizadas mediante el sistema CTAB/agua, el mayor aumento de la temperatura puede estar relacionada con la potencia del láser usada, el cual permitió que los nanobarras y los nanoprismas obtenidos generaran un mayor efecto térmico. Adicionalmente, una parte de su segunda banda de plasmón alcanza a solaparse con la longitud de onda del láser utilizado.

5.2.2. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación (808 nm, potencia 800 mW)

5.2.2.1. *AgNPs obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ agua*

La citotoxicidad de las AgNPs y AgNPs@AF obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ agua fue evaluada en ausencia y presencia de irradiación (808 nm) y bajo tiempos de tratamiento de 2 y 4 horas. (Figura 29)

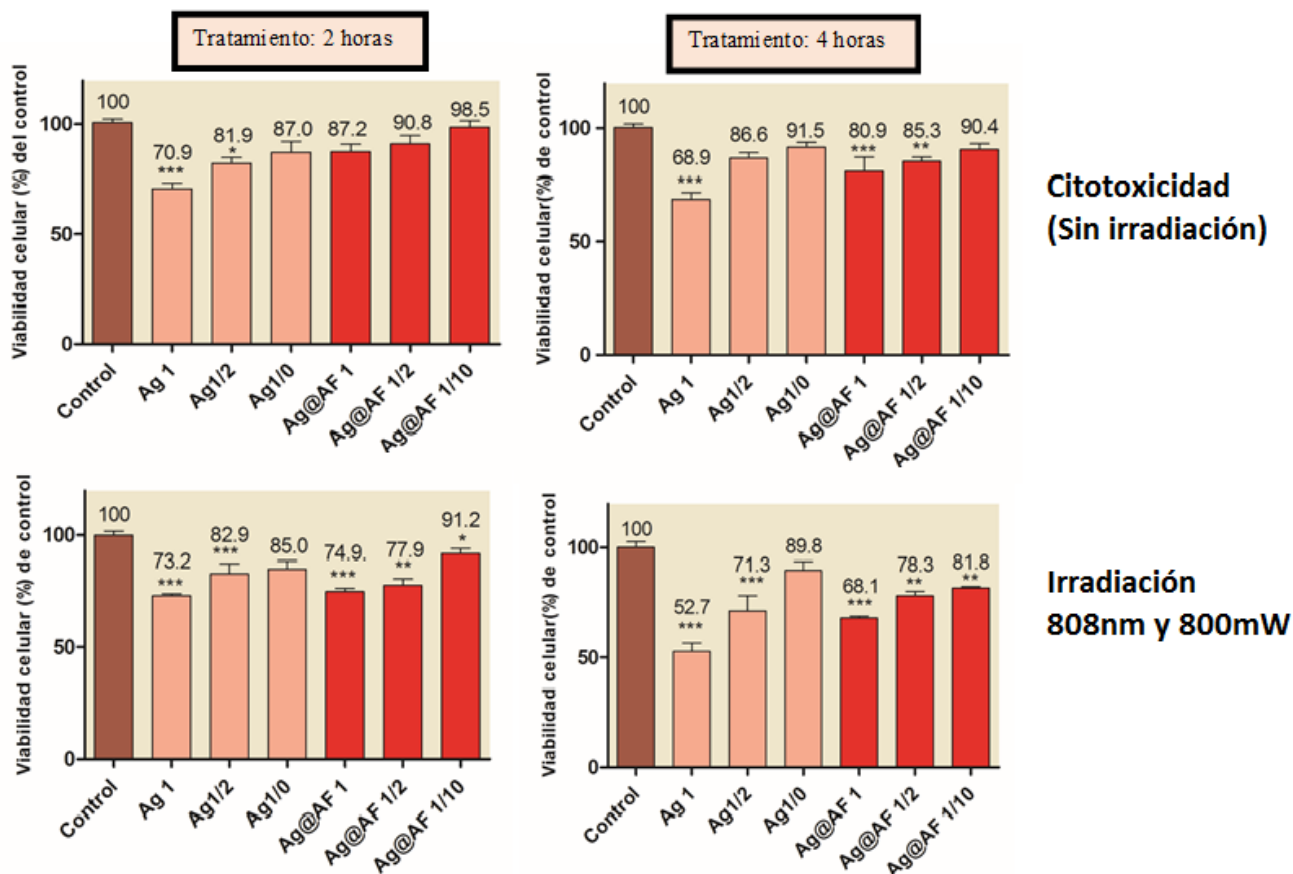


Figura 29. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs funcionalizadas (Ag@AF) y no funcionalizadas (Ag) sintetizadas por medio del sistema micelar AOT/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo 5 min.

Al analizar las tres concentraciones de AgNPs no funcionalizadas (Ag) en dos horas de tratamiento y sin irradiación, se observa que las concentraciones de 200 y 100 μ M presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, en donde la concentración de 200 μ M inhibió el porcentaje de viabilidad en aproximadamente 20% y la concentración de 100 μ M inhibió aproximadamente el 18% de la viabilidad celular.

Por otro lado, se observa que en el mismo tiempo de tratamiento y las mismas concentraciones, pero usando nanopartículas funcionalizadas (Ag@AF), la viabilidad celular aumenta y no se reportaron diferencias estadísticamente significativas en relación al control, lo que implica que la funcionalización de las AgNPs contribuye a la disminución de la citotoxicidad propia de las AgNPs. Lo anterior está acorde con lo evidenciado por Boca-Farcau y col, los cuales evaluaron la citotoxicidad de los nanotriángulos de plata funcionalizados con ácido fólico en una línea celular de cáncer de ovario, evidenciando una disminución significativa de la citotoxicidad con respecto a las AgNPs no funcionalizadas.

Al evaluar las nanopartículas no funcionalizadas, sin irradiación y con 4 horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 200 μ M, sin observar diferencias estadísticamente significativas en las otras concentraciones evaluadas. Por otro lado, se empiezan a observar efectos citotóxicos en las nanopartículas funcionalizadas con 4 horas de tratamiento, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, para la concentración de 200 μ M inhibió un porcentaje de viabilidad en aproximadamente 19% y la concentración de 100 μ M inhibió aproximadamente el 15% de la viabilidad celular.

A pesar de presentarse diferencias estadísticamente significativas con relación al control, en algunas de las concentraciones evaluadas, al comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos en las concentraciones evaluadas de nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con los dos tiempos de tratamiento, lo que implica que las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas presentan citotoxicidad similar para los dos tiempos de tratamiento evaluados.

Con respecto a los ensayos de irradiación (808nm), en la figura 30 se observa que las células control irradiadas no mostraron ser afectadas por la irradiación, se evidencia que no se encontraron

diferencias estadísticamente significativas entre las células control irradiadas y no irradiadas. Esto puede atribuirse al hecho de que los cromóforos presentes en los tejidos no absorben en el rango del IRC (Jaque et al., 2014), haciendo ver la terapia fototérmica inducida por IRC, como una técnica inocua, que no afecta los tejidos sanos, en los cuales no se internalizan las nanopartículas.

Con 2 horas de tratamiento con irradiación para el caso de las nanopartículas no funcionalizadas se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones de 200 y 100 μM . Para la concentración de 200 μM se observó una disminución de la viabilidad de aproximadamente el 27% y con 100 μM en aproximadamente del 17%. En el caso con 4 horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en las concentraciones de 200 y 100 μM . En este caso se observó una disminución de la viabilidad celular en torno de 48% para 200 μM y 29% para 100 μM evidenciando que con 4 horas de tratamiento aumenta la citotoxicidad de las nanopartículas no funcionalizadas.

Con relación al efecto que tienen las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la irradiación, se observó que con 200 μM y 2 horas de tratamiento estas nanopartículas inhiben en un 25% la viabilidad, 22% con 100 μM , y 9% con 20 μM . Cuando se comparó con 4 horas de tratamiento, se observa que la inhibición de la viabilidad celular es mayor: con 200 μM se observa un 32%, con 100 μM un 22% y con 20 μM un 18%, evidenciando una mayor citotoxicidad.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular obtenidos con las concentraciones evaluadas de nanopartículas con y sin funcionalización, para 2 y 4 horas de tratamiento e irradiadas; se observaron diferencias estadísticamente significativas para los dos tiempos de tratamiento. Estas diferencias se resaltan para las nanopartículas sin funcionalizar con la concentración de 200 μM .

Evidenciando, que en el caso de las nanopartículas funcionalizadas 2 horas de tratamiento son suficientes para observar un efecto de la irradiación en las células HeLa.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 2 horas (Figura 30), se evidencia que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, al comparar las nanopartículas funcionalizadas, se evidencia una disminución de la citotoxicidad en las células irradiadas, observando una disminución en torno de 13% para las dos las concentraciones mayores (200 y 100 μM) y aproximadamente 7% para la concentración de 20 μM ; evidenciando que las nanopartículas fueron posiblemente internalizadas por la célula debido

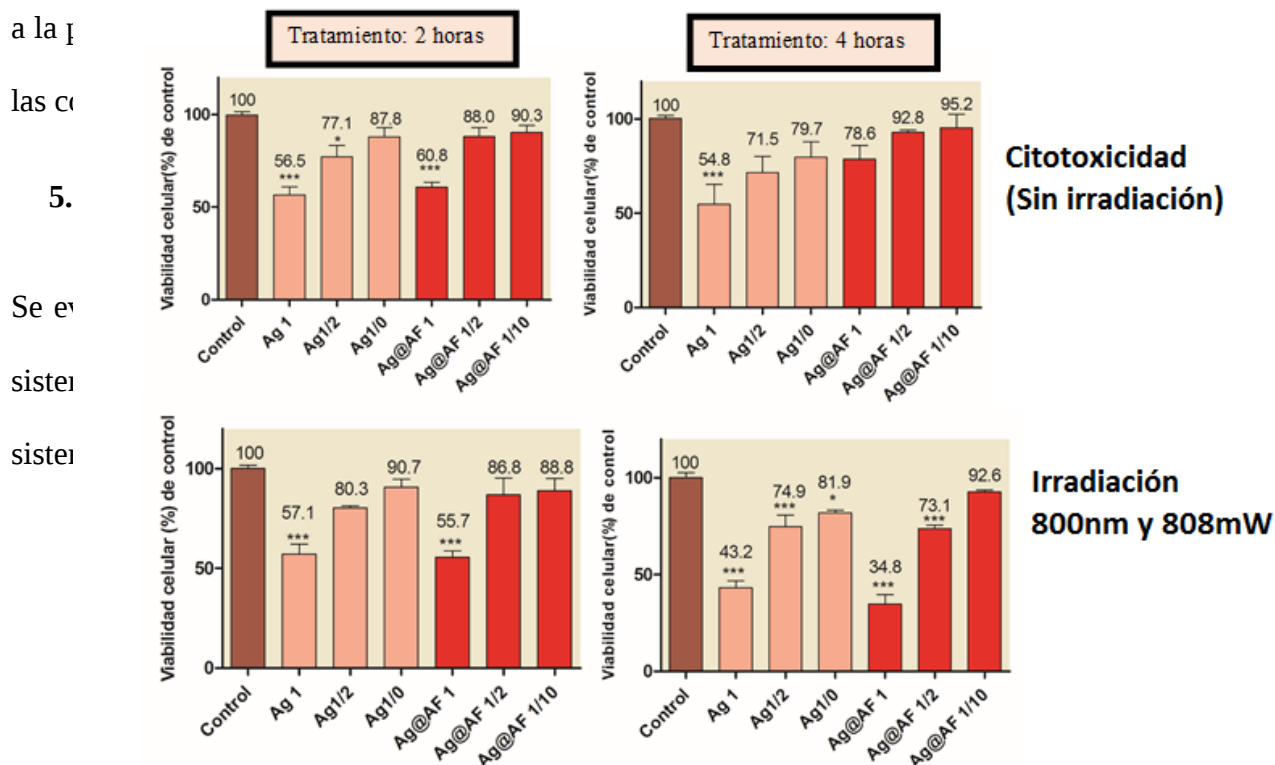


Figura 30. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs no funcionalizadas y funcionalizadas (Ag@AF), sintetizadas por medio del sistema micelar CTAB/agua. Las

MICELAS COMO NANOREACTORES

concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas. *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo 5 min.

Las nanopartículas no funcionalizadas presentaron una disminución de la viabilidad de aproximadamente 43.5% para 200 microlar, aproximadamente 22.9% para 100 micromolar y aproximadamente 12.2% para 20 micromolar bajo dos horas de tratamiento, y se evidenciaron diferencias significativas solo para las dos mayores concentraciones testadas.

Al analizar las tres concentraciones evaluadas de AgNPs no funcionalizadas (Ag) con dos horas de tratamiento y sin irradiación, se observó que con las concentraciones de 200 y 100 μ M presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, la concentración de 200 μ M inhibió un porcentaje de viabilidad en aproximadamente 44% y la concentración de 100 μ M inhibió aproximadamente el 23% de la viabilidad celular.

Por otro lado, se observa que en el mismo tiempo de tratamiento y las mismas concentraciones, pero usando nanopartículas funcionalizadas, la viabilidad celular aumenta levemente para las concentraciones de 100 y 20 μ M; la concentración de 200 μ M presentó una diferencia estadística significativa en relación al control, indicando una disminución de la citotoxicidad propia de las nanopartículas debido a su funcionalización.

Al evaluar las nanopartículas no funcionalizadas, sin irradiación y 4 horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente en la concentración de 200 μ M,

con un porcentaje de inhibición de la viabilidad de 45.2%. En el caso de nanopartículas funcionalizadas con 4 horas de tratamiento, en las 3 concentraciones testadas se observó una disminución de la citotoxicidad asociada a las nanopartículas de plata, evidenciando que el ácido fólico mejora la biocompatibilidad de las nanopartículas.

Al irradiar las nanopartículas no funcionalizadas con 2 horas de tratamiento, se observó que la concentración de 200 μM presentó una diferencia estadística significativa con respecto al control, con una disminución de la viabilidad de aproximadamente el 43%. Para las 3 concentraciones con 4 horas de tratamiento e irradiadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. En este caso se observó una disminución de la viabilidad celular en torno del 57% para 200 μM , 25% para 100 μM , y 18.1% para 20 μM , evidenciando que para 4 horas de tratamiento aumenta la citotoxicidad de las nanopartículas no funcionalizadas.

Con relación al efecto de las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la radiación, se observó que solo la concentración de 200 μM presentó una diferencia estadística significativa con 2 horas de tratamiento, observándose una inhibición de la viabilidad en torno de 44.3%. Cuando se comparó con 4 horas de tratamiento, la inhibición de la viabilidad celular fue de 65.2 %, para 200 μM , del 27% para 100 μM , evidenciando una mayor citotoxicidad para el tratamiento de 4 horas.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular observados para las concentraciones evaluadas de nanopartículas con y sin funcionalización, para 2 y 4 horas de tratamiento e irradiadas; las diferencias son estadísticamente significativas para los dos tiempos de tratamiento. Luego, para la máxima concentración de las nanopartículas funcionalizadas y 4 horas de tratamiento, mayor es el efecto fototóxico.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para 2 horas, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al evaluar las nanopartículas funcionalizadas, se evidencia una disminución de la citotoxicidad en las células irradiadas para la máxima concentración, observando una disminución en torno de 5.1% de la viabilidad. Esto sugiere que la internalización celular de las nanopartículas es mediada por el ácido fólico.

5.2.2.3. AgNPs obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ isooctano

De la misma forma se comparó la citotoxicidad de las nanopartículas obtenidas con el sistema micelar AOT/isooctano en presencia y ausencia de la irradiación y con 2 y 4 horas de tratamiento (Figura 31).

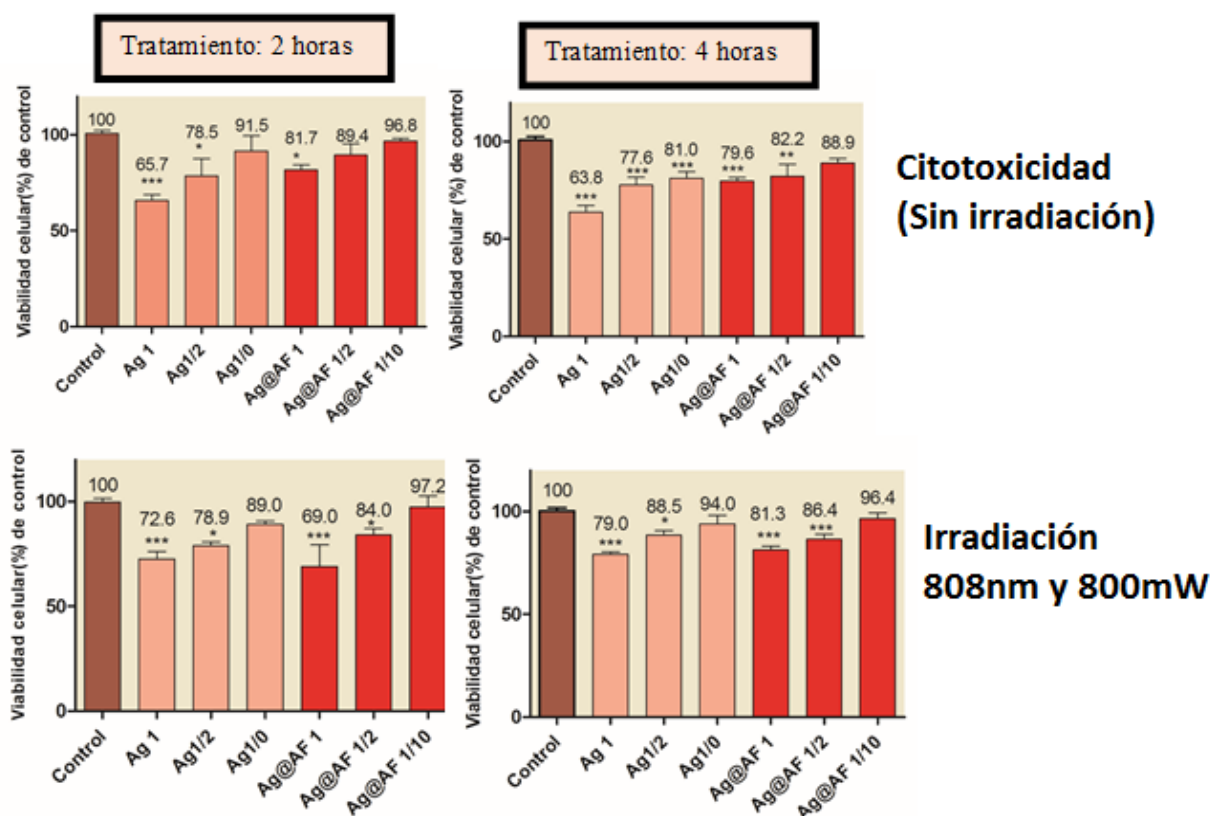


Figura 31. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas funcionalizadas

(Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/isooctano. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación 5 min.

Al analizar los resultados de AgNPs no funcionalizadas (Ag) con dos horas de tratamiento y sin irradiación, se observó que las concentraciones de 200 y 100 μ M presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, la concentración de 200 μ M inhibió un porcentaje de viabilidad en aproximadamente 34.3% y para la concentración de 100 μ M fue de 22%. Al comparar estos porcentajes de inhibición con los observados para otras las nanopartículas sintetizadas (AOT/agua y CTAB/agua), se puede evidenciar que estas nanopartículas son más citotóxicas que las obtenidas conl sistema AOT/agua, pero menos citotóxicas que las obtenidas con el sistema CTAB/agua.

Por otro lado, usando nanopartículas funcionalizadas con el mismo tiempo de tratamiento (2h) e iguales concentraciones, se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control para la concentración de 200 μ M. Sin embargo, para las 3 concentraciones testadas se observó un aumento de los porcentajes de viabilidad celular con respecto a las nanopartículas no funcionalizadas.

Al evaluar las nanopartículas no funcionalizadas con 4 horas de tratamiento y sin irradiación, se observaron diferencias estadísticamente significativas para las 3 concentraciones testadas, con porcentajes de inhibición de la viabilidad celular de: 36.2% para 200 μ M, 22.4 para 100 μ M, y 19% para 20 μ M. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas y 4 horas de tratamiento, para las 3 concentraciones testadas se observó una disminución de la citotoxicidad asociada a las

nanopartículas de plata, observándose nuevamente, como en los sistemas anteriores, que la presencia del ácido fólico mejora la biocompatibilidad de las nanopartículas.

Al irradiar las nanopartículas no funcionalizadas con 2 horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las concentraciones de 200 μM 100 μM . Los porcentajes de inhibición de la viabilidad celular observados para estas concentraciones fue 27.4% y 21%, respectivamente.

Para las nanopartículas funcionalizadas y con 4 horas de tratamiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las dos mayores concentraciones testadas. En este caso se observó una disminución de la viabilidad celular en torno del 21% para 200 μM y en torno del 12% para 100 μM , observándose que a las 4 horas una aparente disminución de la citotoxicidad. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico comparativo entre los porcentajes obtenidos con los dos tiempos de tratamiento, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, lo cual indica que para ambos tiempos de tratamiento, los porcentajes de viabilidad celular son similares.

En el caso de las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la radiación, se observó que la única concentración con una diferencia estadística significativa fue para 200 y 100 μM , con 2 horas de tratamiento, los porcentajes de inhibición de la viabilidad celular fueron: 31% para 200 μM y 16% para 100 μM . Al comparar con 4 horas de tratamiento, se observó una aparente disminución de la citotoxicidad, similar a lo observado para las nanopartículas no funcionalizadas y cuyos porcentajes de inhibición fueron: 19% para 200 μM y 14% para 100 μM . Sin embargo, al realizar el análisis estadístico comparativo entre los porcentajes obtenidos para los dos tiempos de tratamiento, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, tal como se observó para las nanopartículas no funcionalizadas.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 2 horas, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, al comparar con las nanopartículas funcionalizadas, se evidencia una disminución de la citotoxicidad en las células irradiadas para las dos máximas concentraciones, observando una disminución de la viabilidad celular en torno de 16%, para 200 μM y 5.4% para 100 μM . Nuevamente se puede indicar que el ácido fólico media la internalización de las nanopartículas y la disminución de la viabilidad celular es el efecto de la radiación.

5.2.3. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células HeLa en ausencia y presencia de irradiación (638 nm, potencia 650mW)

5.2.3.1. AgNPs obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ agua

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas sintetizadas con el sistema AOT/agua en ausencia y presencia de la irradiación con el láser de 638 nm, con tiempos de tratamiento de 2 y 4 horas (Figura 32).

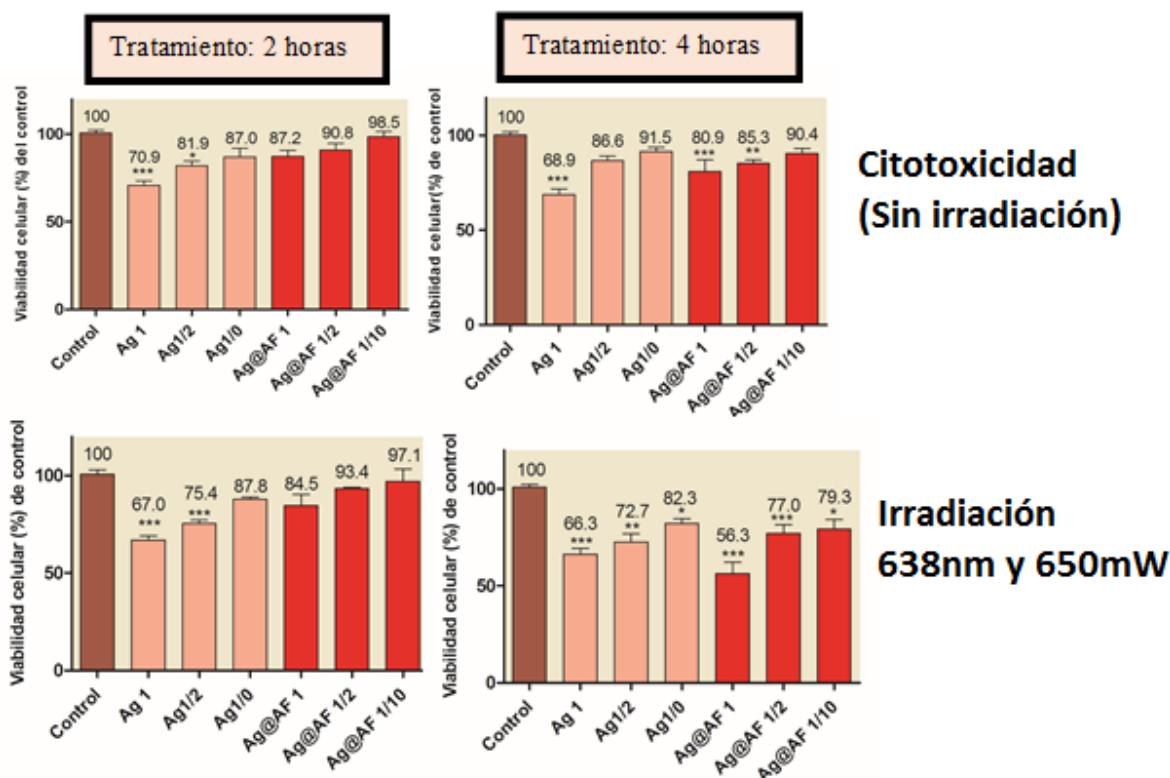


Figura 32. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min.

Las células control irradiadas no mostraron ser afectadas por la irradiación con el láser, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células control irradiadas y no irradiadas.

Las nanopartículas no funcionalizadas y con 2 horas de tratamiento e irradiadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las concentraciones de 200 μ M 100 μ M, con porcentajes de inhibición de la viabilidad celular de 33 % y 25 %, respectivamente. Para 4 horas de tratamiento e iluminadas, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las 3 concentraciones testadas. En este caso, se observó una disminución de la viabilidad celular en torno del 34% para 200 μ M, del 27.3 % para 100 μ M y del 18% para 20 μ M. El aumento de la citotoxicidad observado es debido a la irradiación.

Con relación al efecto que tienen las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la irradiación, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las concentraciones testadas con un tiempo de 2 horas de tratamiento. En el caso del tratamiento con 4 horas, se observaron diferencias estadísticamente significativas para las 3 concentraciones testadas y los porcentajes de inhibición de la viabilidad celular fueron: 44% para 200 μ M, 23%

para 100 μM y 21% para 20 μM . Luego la citotoxicidad fue mayor para un tiempo de tratamiento de 4 horas.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular medidos para las concentraciones evaluadas de nanopartículas con y sin funcionalización, para 2 y 4 horas de tratamiento y con irradiación; se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos de tratamiento. Para una concentración de 200 μM de nanopartículas funcionalizadas y 4 horas de tratamiento se presentó la mayor inhibición de la viabilidad celular al irradiarlas.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 2 horas, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 4 horas si se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la máxima concentración de las nanopartículas funcionalizadas, con una disminución de la viabilidad celular en torno de 25%, confirmando que la internalización de las nanopartículas es favorecida por el ácido fólico, y la disminución de la viabilidad celular se debe a la radiación.

5.2.3.2. *AgNPs obtenidas mediante el sistema micelar CTAB/ agua*

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas sintetizadas con el sistema CTAB/agua en ausencia y presencia de la irradiación con el láser de 638 nm, con tiempos de tratamiento de 2 y 4 horas (Figura 33).

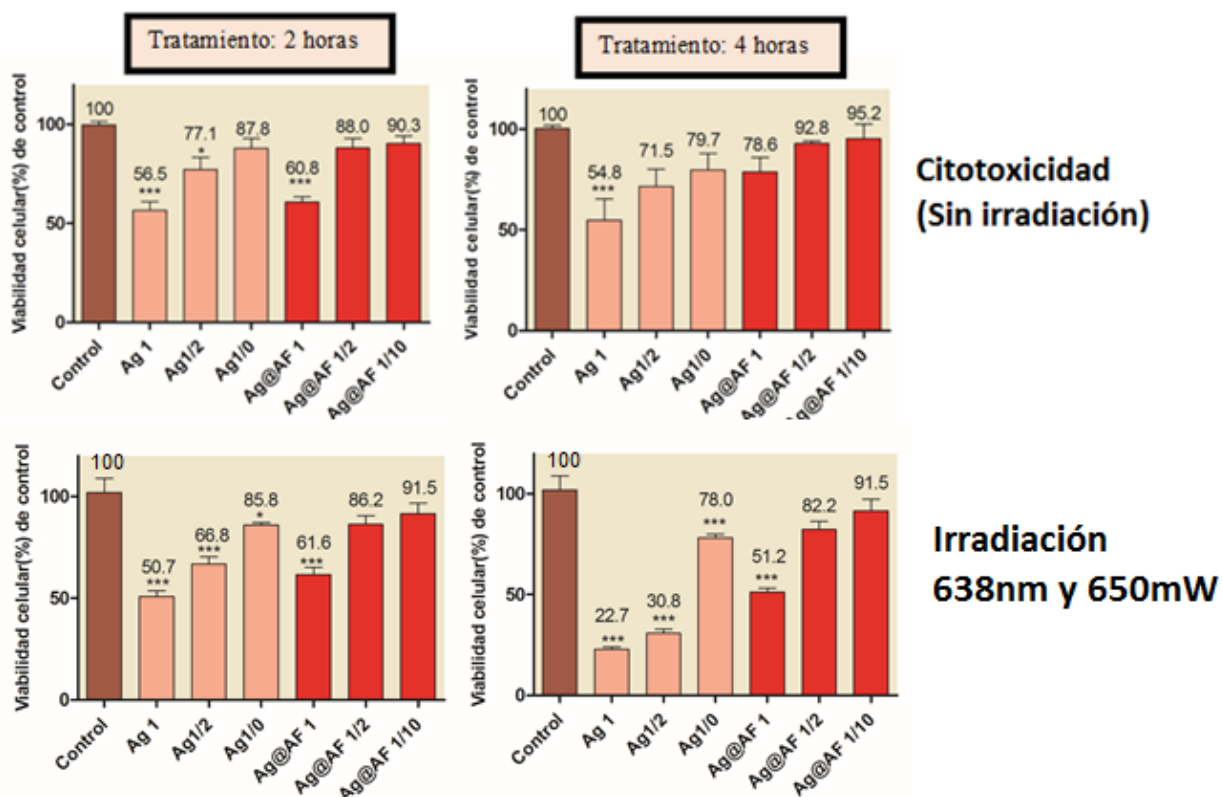


Figura 33. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar CTAB/agua. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 y Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min.

Para las nanopartículas no funcionalizadas con 2 horas de tratamiento e irradiación, las 3 concentraciones testadas presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los porcentajes de inhibición de la viabilidad celular observados son los siguientes: 49.3 % para 200 μ M, 33.2% para 100 μ M, y 14.2% para 20 μ M. En el caso de 4 horas de tratamiento, nuevamente 3 concentraciones testadas presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Se observó una disminución de la viabilidad celular en torno del 77.3 % para

200 μM , en torno del 69.2 % para 100 μM , y en torno del 22% para 20 μM . El aumento de la citotoxicidad se debe a la irradiación.

En el caso de las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la irradiación únicamente la muestra de mayor concentración presentó una diferencia estadística significativa en ambos tiempos de tratamiento. El porcentaje de inhibición de la viabilidad celular para el tiempo de tratamiento 2 horas fue 38.4% y de 49.9% y para el tiempo de tratamiento de 4 horas. Estos valores muestran que la mayor citotoxicidad se da para un tiempo de tratamiento de 4 horas.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular obtenidos para las concentraciones evaluadas de nanopartículas con y sin funcionalización, con 2 y 4 horas de tratamiento e irradiadas; se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos de tratamiento. El mayor efecto sobre la viabilidad celular se observó para las dos mayores concentraciones de nanopartículas no funcionalizadas con 4 horas de tratamiento e irradiadas.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 2 horas, no se presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 4 horas si se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las dos concentraciones máximas de las nanopartículas no funcionalizadas. Adicionalmente, se evidencio una disminución de la viabilidad celular en torno de 27.4 % en el caso de las nanopartículas funcionalizadas y a la máxima concentración, confirmando que las nanopartículas fueron internalizadas por la célula debido al ácido fólico, y atribuyendo esta disminución de la viabilidad al efecto de la irradiación.

5.2.3.3. *AgNPs obtenidas mediante el sistema micelar AOT/ isooctano*

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas funcionalizadas y no funcionalizadas sintetizadas con el sistema AOT/isooctano en ausencia y presencia de la irradiación con un láser de 638 nm, con tiempos de tratamiento de 2 y 4 horas (Figura 34).

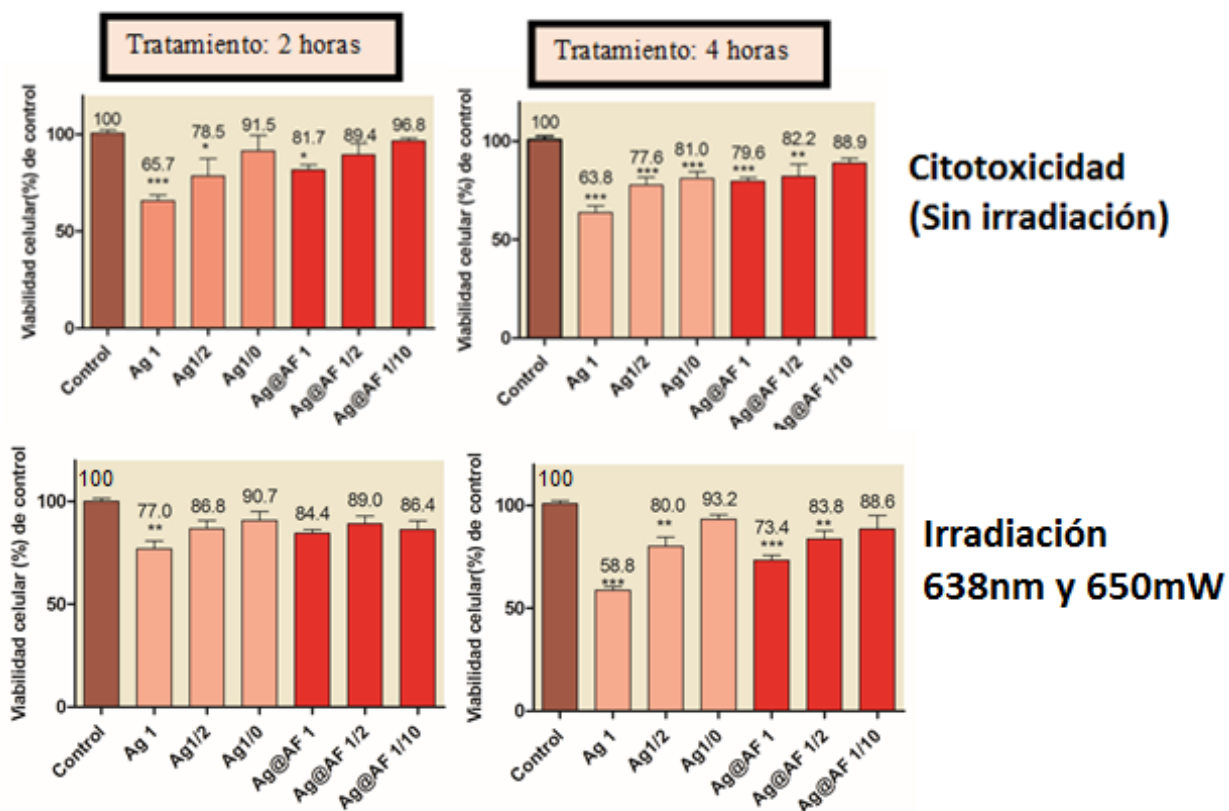


Figura 34. Efecto citotóxico con y sin irradiación de las AgNPs y funcionalizadas (Ag@AF) sintetizadas con el sistema micelar AOT/isooctano. Las concentraciones de Ag evaluadas fueron Ag 1 y Ag@AF 1: 200 μ M, Ag 1/2 Ag@AF 1/2: 100 μ M, Ag 1/10 y Ag@AF 1/10: 20 μ M, control: Células HeLa no tratadas. Los tiempos de tratamiento fueron 2 y 4 horas, *, **, *** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente. Tiempo de irradiación por pozo: 5 min.

Al irradiar las nanopartículas no funcionalizadas con 2 horas de tratamiento se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control únicamente en la concentración de 200 μM . Para esta concentración se obtuvo un porcentaje de inhibición de la viabilidad celular de 23 %. En el caso de 4 horas de tratamiento, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas para las dos máximas concentraciones. Se observó una disminución de la viabilidad celular en torno del 41.2 % para 200 μM y en torno del 20 % para 100 μM . Luego el aumento de la citotoxicidad se debe a la irradiación para un tiempo de 4 horas.

Con un tiempo de tratamiento de 2 horas para las nanopartículas funcionalizadas en presencia de la irradiación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las tres concentraciones testadas. Sin embargo, para un tiempo de tratamiento de 4 horas si hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las dos máximas concentraciones. Los porcentajes de inhibición de la viabilidad celular obtenidos fueron: 27% para 200 μM y 16.2 para 100 μM . Estos porcentajes muestran que para un tiempo de tratamiento de 4 horas se empieza a observar un efecto citotóxico de las nanopartículas funcionalizadas en presencia de irradiación.

Al comparar los porcentajes de viabilidad celular medidos para las concentraciones evaluadas de nanopartículas con y sin funcionalización, con 2 y 4 horas de tratamiento y radiación; se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos de tratamiento. Estas diferencias se encontraron para las dos máximas concentraciones de nanopartículas no funcionalizadas e indicando que un mayor efecto de la irradiación sobre la viabilidad celular para las 4 horas de tratamiento y máxima concentración.

Al comparar los tratamientos con y sin irradiación para un tiempo de 2 horas, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. De igual forma, con un tiempo de tratamiento de 4 horas tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con

y sin irradiación. Sin embargo, se evidencio una disminución de la viabilidad celular en torno de 6.2 % en el caso de las nanopartículas funcionalizadas y la máxima concentración con un tiempo de tratamiento de 4 horas, confirmando que las nanopartículas fueron internalizadas por la célula debido al ácido fólico, y atribuyendo esta disminución de la viabilidad al efecto de la irradiación..

5.2.4. Comparación de los resultados obtenidos para las AgNPs y AgNPs@AF obtenidas mediante los tres sistemas micelares

Al comparar la citotoxicidad de las nanopartículas sin funcionalizar en ausencia de luz y sintetizadas por los tres sistemas micelares, para la máxima concentración testada (200 μM), las nanopartículas más citotóxicas son las sintetizadas con el sistema CTAB/agua (% de disminución de la viabilidad celular del 44%) y un tiempo de tratamiento de 2 horas. Sin embargo, al funcionalizar con ácido fólico la citotoxicidad disminuye para los dos tiempos de tratamiento. La mejor biocompatibilidad de las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico está acorde con los resultados obtenidos por *Boca-Farcau y col.*, los cuales evaluaron nanotriangulos de plata cubiertos de quitosano y funcionalizados con ácido fólico en una línea celular de cáncer de ovario con un tiempo de tratamiento de 24 horas, y observaron que para una concentración de 2.8 $\mu\text{g/mL}$ de plata, la citotoxicidad de las AgNPs disminuyó. La diferencia de la citotoxicidad entre las AgNPs y AgNPs@AF, puede estar relacionada al hecho que las AgNPs liberan una mayor cantidad de iones plata al medio celular, en comparación con las AgNPs@AF, donde en el ácido fólico recubre la superficie y aumenta la estabilidad de las AgNPs en el medio celular (Boca-Farcau et al., 2014).

Por otro lado, al irradiar las AgNPs@AF sintetizadas con los sistemas AOT/agua y CTAB/agua con el láser de 808 nm, presentaron un mayor efecto citotóxico que las AgNPs@AF sintetizadas con el sistema AOT/ isooctano para un tiempo de tratamiento de 4 horas, y el máximo efecto

citotóxico se evidencio para 2 horas de tratamiento. A pesar de que AOT/ isooctano presenta el máximo efecto en menor tiempo que en los otros dos sistemas, el mayor porcentaje de inhibición de la viabilidad celular se observa en el sistema CTAB/agua, lográndose una disminución del 66.2% de la viabilidad celular con un tiempo de tratamiento de 4 horas. La razón por la que estas nanopartículas disminuyen en un mayor porcentaje la viabilidad celular en presencia de la irradiación, puede estar relacionada con la forma anisotrópica de las nanopartículas (prismas triangulares, barras, esferas y otras formas indefinidas), ya que de acuerdo con estudios previos de *Boca-Farcau y col.* y *Mackey y col.*, los nanoprismas triangulares y las nanobarras, han mostrado ser mejores agentes fototérmicos que las nanoesferas, en presencia de radiación del tipo IRC (Mackey, Ali, Austin, Near, & El-Sayed, 2014). En el estudio de *Boca-Farcau y col.*, mencionaron una disminución de la viabilidad celular del 69% en presencia de un láser de 808nm, al evaluar las AgNPs@AF en una línea celular de cáncer ovario. Esta disminución es similar a la observada del 65% con las AgNPs@AF obtenidas con el sistema micelar CTAB/agua. Sin embargo, los autores evaluaron un tiempo de tratamiento más extenso que los evaluados en este trabajo (24 horas) y el tiempo de irradiación por pozo fue de 10 minutos.

En otro estudio realizado por *Thompson y col.* se evaluó el efecto fototérmico generado por las AgNPs de forma triangular sintetizadas mediante una metodología en la cual se emplearon precursores similares a los utilizados en este trabajo. Su efecto se evaluó en dos líneas de celulares de cáncer de seno, observando una disminución de la viabilidad celular cercana al 90% después de irradiar las células con un láser de 808nm, durante un minuto en cada pozo. Sin embargo, a pesar de la diferencia del tiempo de irradiación con respecto al presente estudio (5 min) las concentraciones de Ag que se usaron fueron altas (100-250 $\mu\text{g/mL}$), en comparación con las que se utilizaron en este estudio ($\sim 21 \mu\text{g/mL}$) (Thompson et al., 2014)

Por otro lado, al irradiar con el láser de 638 nm, los mayores porcentajes de inhibición de la viabilidad celular se obtuvieron al utilizar las AgNPs@AF sintetizadas con los sistemas AOT/agua y CTAB/agua. Los porcentajes de disminución de la viabilidad celular obtenidos con un tiempo de tratamiento de 4 horas, fueron: 44% y 50%, respectivamente. Sin embargo, en el caso del sistema CTAB/agua se evidencio que para un tiempo de tratamiento 2 horas, se observa un efecto citotóxico por la irradiación, en comparación con los otros dos sistemas, en los cuales para ese tiempo de tratamiento no presentaban diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las tres concentraciones testadas. Adicionalmente, los porcentajes de disminución de la viabilidad celular medidos, están acordes con los observados por *Byeon y col*, los cuales obtuvieron una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente el 40%, bajo condiciones similares a las utilizadas este estudio (láser 632 nm, 5 minutos de irradiación por pozo, 5 horas de tratamiento, concentración de Ag de 20 µg/mL y en células HeLa) usando un sistema de nanopartículas híbridas compuestas de Ag, TiO₂ y polietilenglicol (Byeon, 2016).

Adicionalmente a la anisotropía de la nanopartículas, el tamaño promedio de las AgNPs obtenidas con el sistema AOT/isooctano (10-15 nm) fue menor al obtenido en las nanopartículas con los sistemas micelares AOT/agua (20-30 nm) y CTAB/agua (40-50 nm) ; y se ha indicado que el tamaño apropiado para lograr un efecto fototérmico es alrededor de 50 nm , lo cual puede explicar la diferencia del efecto fototérmico observado.

6. Conclusiones

Los procedimientos de síntesis mediante sistemas micelares y la caracterización realizada sugieren la formación de nanopartículas de plata anisotrópicas.

Mediante los sistemas de micelas directas es posible obtener nanopartículas de plata de tamaños superiores a los 20 nm y con formas triangulares y otras formas no definidas, cuyas bandas de absorción se encuentran en el rango del IRC.

Mediante el sistema de micelas inversas utilizado, fue posible obtener nanopartículas de plata de tamaños menores a 20 nm, y con formas esféricas y triangulares.

La funcionalización el AF permitió disminuir la citotoxicidad sin irradiación de las AgNPs obtenidas mediante los tres sistemas micelares, permitiendo mejorar su biocompatibilidad con las células HeLa.

Las AgNPs funcionalizadas con ácido fólico sintetizadas mediante los tres sistemas mostraron ser potenciales agentes fototérmicos efectivos, logrando reducir hasta en un 65.2% de la viabilidad de las células HeLa, utilizando un láser de 808nm, y hasta un 50% de la viabilidad celular utilizando el láser un 638nm bajo un tiempo de tratamiento de 4 horas.

Bibliografía

- Baffou, G., Quidant, R., & Girard, C. (2009). Heat generation in plasmonic nanostructures: Influence of morphology. *Applied Physics Letters*, 94(15), 153109. <https://doi.org/10.1063/1.3116645>
- Barnickel, P., Wokaun, A., Sager, W., & Eicke, H.-F. (1992). Size tailoring of silver colloids by reduction in microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 148(1), 80–90. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90116-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90116-4)
- Berhault, G., Bausach, M., Bisson, L., Becerra, L., Thomazeau, C., & Uzio, D. (2007). Seed-Mediated Synthesis of Pd Nanocrystals: Factors Influencing a Kinetic- or Thermodynamic-Controlled Growth Regime. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(16), 5915–5925. <https://doi.org/10.1021/jp0702752>
- Boca, S. C., Potara, M., Gabudean, A.-M., Juhem, A., Baldeck, P. L., & Astilean, S. (2011). Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Letters*, 311(2), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.06.022>
- Boca-Farcau, S., Potara, M., Simon, T., Juhem, A., Baldeck, P., & Astilean, S. (2014). Folic Acid-Conjugated, SERS-Labeled Silver Nanotriangles for Multimodal Detection and Targeted Photothermal Treatment on Human Ovarian Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 11(2), 391–399. <https://doi.org/10.1021/mp400300m>
- Byeon, J. H. (2016). Scalable hybrid chemical manufacture to photothermal therapy: PEG-capped phototransducers. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep31351>
- Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Wu, K., Roza, C. E., Schmidt, M. S., & Boisen, A. (2015). Silver-capped silicon nanopillar platforms for adsorption studies of folic acid using surface

- enhanced Raman spectroscopy and density functional theory: Ag NP platforms for adsorption studies of FA. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(11), 1087–1094. <https://doi.org/10.1002/jrs.4734>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
- Dahman, Y. (2017). An Introduction to Nanotechnology**By Yaser Dahman, Hok Heng Lo, and Mark Edney. In *Nanotechnology and Functional Materials for Engineers* (pp. 1–17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51256-5.00001-0>
- de Aberasturi, D. J., Serrano-Montes, A. B., & Liz-Marzán, L. M. (2015). Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Advanced Optical Materials*, 3(5), 602–617. <https://doi.org/10.1002/adom.201500053>
- Francois Bouton. (2010). *Influence of terpenes and terpenoids on the phase behavior of micro- and macro-emulsions* (p.). Unpublished. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11844.12168>
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Sierra-Rivera, C. A., Gómez-Flores, R. A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., ... Rodríguez-Padilla, C. (2010). Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 148. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-148>
- Ganguli, A. K., Ganguly, A., & Vaidya, S. (2010). Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chem. Soc. Rev.*, 39(2), 474–485. <https://doi.org/10.1039/B814613F>
- Gutierrez, J. A., Cruz, J., Rondón, P., Jones, N., & Ortiz, C. (2016). Small gold nanocomposites obtained in reverse micelles as nanoreactors. Effect of surfactant, optical properties and

- activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *New J. Chem.*, 40(12), 10432–10439.
<https://doi.org/10.1039/C6NJ02259F>
- Hedberg, J., Lundin, M., Lowe, T., Blomberg, E., Wold, S., & Wallinder, I. O. (2012). Interactions between surfactants and silver nanoparticles of varying charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 369(1), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.004>
- Huang, L., Chen, X., & Li, Q. (2001). Synthesis of microporous molecular sieves by surfactant decomposition. *Journal of Materials Chemistry*, 11(2), 610–615.
<https://doi.org/10.1039/b005770n>
- Iyahraja, S., & Rajadurai, J. S. (2015). Study of thermal conductivity enhancement of aqueous suspensions containing silver nanoparticles. *AIP Advances*, 5(5), 057103.
<https://doi.org/10.1063/1.4919808>
- Jaque, D., Martínez Maestro, L., del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., ... García Solé, J. (2014). Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*, 6(16), 9494–9530. <https://doi.org/10.1039/C4NR00708E>
- Jiang, X. C., Chen, W. M., Chen, C. Y., Xiong, S. X., & Yu, A. B. (2010). Role of Temperature in the Growth of Silver Nanoparticles Through a Synergetic Reduction Approach. *Nanoscale Research Letters*. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9780-1>
- Khan, M. S., Talib, A., Pandey, S., Bhaisare, M. L., Gedda, G., & Wu, H.-F. (2017). Folic Acid navigated Silver Selenide nanoparticles for photo-thermal ablation of cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 564–570.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.070>

- Krutyakov, Y. A., Kudrinskiy, A. A., Olenin, A. Y., & Lisichkin, G. V. (2008). Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects. *Russian Chemical Reviews*, 77(3), 233–257. <https://doi.org/10.1070/RC2008v077n03ABEH003751>
- Lakowicz, J. R. (2005). Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Analytical Biochemistry*, 337(2), 171–194. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.026>
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lee, G. (2004). Preparation of silver nanorods through the control of temperature and pH of reaction medium. *Materials Chemistry and Physics*, 84(2–3), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2003.11.024>
- Li, G., Magana, D., & Dyer, R. B. (2012). Photoinduced Electron Transfer in Folic Acid Investigated by Ultrafast Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(10), 3467–3475. <https://doi.org/10.1021/jp300392a>
- Li, H., Cheng, Y., Liu, Y., & Chen, B. (2016). Fabrication of folic acid-sensitive gold nanoclusters for turn-on fluorescent imaging of overexpression of folate receptor in tumor cells. *Talanta*, 158, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.038>
- Li, W., Zhang, M., Zhang, J., & Han, Y. (2006). Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(4), 438–442. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0069-y>
- Lim, W. Q., & Gao, Z. (2016). Plasmonic nanoparticles in biomedicine. *Nano Today*, 11(2), 168–188. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.02.002>

- Liu, M., Zhang, Z., Liu, G., Dong, J., Sun, Y., Zheng, H., & Li, G. (2011). Fluorescence Enhancement of Modified Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(11), 9721–9724. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5303>
- Liu, X., & Wu, X. (2015). Fluorescence enhancement of fisetin by silver nanoparticles with cetyltrimethyl ammonium bromide micelles. *RSC Advances*, 5(10), 7433–7439. <https://doi.org/10.1039/C4RA12726A>
- Mackey, M. A., Ali, M. R. K., Austin, L. A., Near, R. D., & El-Sayed, M. A. (2014). The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy: Theory and *In Vitro* Experiments. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(5), 1319–1326. <https://doi.org/10.1021/jp409298f>
- Maity, S., Downen, L. N., Bochinski, J. R., & Clarke, L. I. (2011). Embedded metal nanoparticles as localized heat sources: An alternative processing approach for complex polymeric materials. *Polymer*, 52(7), 1674–1685. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.01.062>
- Mandal, S., & De, S. (2016). Copper nanoparticles in AOT “revisited”-direct micelles versus reverse micelles. *Materials Chemistry and Physics*, 183, 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.08.046>
- Manoj, K. M., Jayakumar, R., & Rakshit, S. K. (1996). Physicochemical Studies on Reverse Micelles of Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate at Low Water Content. *Langmuir*, 12(17), 4068–4072. <https://doi.org/10.1021/la950279a>
- Mehra, N. K., Mishra, V., & Jain, N. K. (2013). Receptor-based targeting of therapeutics. *Therapeutic Delivery*, 4(3), 369–394. <https://doi.org/10.4155/tde.13.6>
- Mehta, S. K., Chaudhary, S., Kumar, S., Bhasin, K. K., Torigoe, K., Sakai, H., & Abe, M. (2008). Surfactant assisted synthesis and spectroscopic characterization of selenium nanoparticles

- in ambient conditions. *Nanotechnology*, 19(29), 295601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/29/295601>
- Mogensen, K. B., & Kneipp, K. (2014). Size-Dependent Shifts of Plasmon Resonance in Silver Nanoparticle Films Using Controlled Dissolution: Monitoring the Onset of Surface Screening Effects. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(48), 28075–28083. <https://doi.org/10.1021/jp505632n>
- Momen, H. M. (2016). Effects of particle size and laser wavelength on heating of silver nanoparticles under laser irradiation in liquid. *Pramana*, 87(2). <https://doi.org/10.1007/s12043-016-1233-7>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ*, 84(2), 322.
- Niederberger, M., & Pinna, N. (2009). *Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents*. London: Springer London. <https://doi.org/10.1007/978-1-84882-671-7>
- Noritomi, H., Igari, N., Kagitani, K., Umezawa, Y., Muratsubaki, Y., & Kato, S. (2010). Synthesis and size control of silver nanoparticles using reverse micelles of sucrose fatty acid esters. *Colloid and Polymer Science*, 288(8), 887–891. <https://doi.org/10.1007/s00396-010-2214-x>
- Paramasivam, G., Kayambu, N., Rabel, A. M., Sundramoorthy, A. K., & Sundaramurthy, A. (2017). Anisotropic noble metal nanoparticles: Synthesis, surface functionalization and

- applications in biosensing, bioimaging, drug delivery and theranostics. *Acta Biomaterialia*, 49, 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.066>
- Paszkiewicz, M., Gołębiewska, A., Rajski, Ł., Kowal, E., Sajdak, A., & Zaleska-Medynska, A. (2016). Synthesis and Characterization of Monometallic (Ag, Cu) and Bimetallic Ag-Cu Particles for Antibacterial and Antifungal Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/2187940>
- Pileni, M. P. (Ed.). (1989). *Structure and reactivity in reverse micelles*. Amsterdam ; New York: Elsevier.
- Pramanik, S., Bhattacharya, S. C., & Imae, T. (2007). Fluorescence quenching of 3,7-diamino-2,8-dimethyl-5-phenyl phenazinium chloride by AgCl and Ag nanoparticles. *Journal of Luminescence*, 126(1), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2006.06.008>
- Prema, P. (2011). Chemical mediated synthesis of silver nanoparticles and its potential antibacterial application. In *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering-From Analysis and Modeling to Technology Applications*. InTech. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/chemical-mediated-synthesis-of-silver-nanoparticles-and-its-potential-antibacterial-application>
- Rawat, K. A., Singhal, R. K., & Kailasa, S. K. (2017). One-pot synthesis of silver nanoparticles using folic acid as a reagent for colorimetric and fluorimetric detections of 6-mercaptopurine at nanomolar concentration. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 249, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.018>

- Sajanlal, P. R., Sreeprasad, T. S., Samal, A. K., & Pradeep, T. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews*, 2(1), 5883. <https://doi.org/10.3402/nano.v2i0.5883>
- Salabat, A. (2010). Prediction of silver nanoparticles size synthesized in microemulsion system. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 84(7), 1255–1256. <https://doi.org/10.1134/S0036024410070290>
- Sanchez-Dominguez, M., Pemartin, K., & Boutonnet, M. (2012). Preparation of inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: A soft and versatile approach. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.007>
- Sau, T. K., & Rogach, A. L. (2010). Nonspherical Noble Metal Nanoparticles: Colloid-Chemical Synthesis and Morphology Control. *Advanced Materials*, 22(16), 1781–1804. <https://doi.org/10.1002/adma.200901271>
- Sherry, L. J., Jin, R., Mirkin, C. A., Schatz, G. C., & Van Duyne, R. P. (2006). Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. *Nano Letters*, 6(9), 2060–2065. <https://doi.org/10.1021/nl061286u>
- Shrestha, L. K., Shrestha, R. G., Vilanova, N., Rodriguez-Abreu, C., & Ariga, K. (2014). In-Situ Formation of Silver Nanoparticles Using Nonionic Surfactant Reverse Micelles as Nanoreactors. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(3), 2238–2244. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8548>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>

- Singha, D., Barman, N., & Sahu, K. (2014). A facile synthesis of high optical quality silver nanoparticles by ascorbic acid reduction in reverse micelles at room temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 413, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.009>
- Skoglund, S., Blomberg, E., Wallinder, I. O., Grillo, I., Pedersen, J. S., & Bergström, L. M. (2017). A novel explanation for the enhanced colloidal stability of silver nanoparticles in the presence of an oppositely charged surfactant. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(41), 28037–28043. <https://doi.org/10.1039/C7CP04662F>
- Tadros, T. (Ed.). (2013). *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8>
- Thompson, E. A., Graham, E., MacNeill, C. M., Young, M., Donati, G., Wailes, E. M., ... Levi-Polyachenko, N. H. (2014). Differential response of MCF7, MDA-MB-231, and MCF 10A cells to hyperthermia, silver nanoparticles and silver nanoparticle-induced photothermal therapy. *International Journal of Hyperthermia*, 30(5), 312–323. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.936051>
- Toma, H. E., Zamarion, V. M., Toma, S. H., & Araki, K. (2010). The coordination chemistry at gold nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(7), 1158–1176. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700003>
- Tran, C. D., & Yu, S. (2005). Near-infrared spectroscopic method for the sensitive and direct determination of aggregations of surfactants in various media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.031>
- Wang, R., Chen, C., Yang, W., Shi, S., Wang, C., & Chen, J. (2013). Enhancement Effect of Cytotoxicity Response of Silver Nanoparticles Combined with Thermotherapy on C6 Rat

- Glioma Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(6), 3851–3854.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7156>
- Wani, I. A., Khatoon, S., Ganguly, A., Ahmed, J., & Ahmad, T. (2013). Structural characterization and antimicrobial properties of silver nanoparticles prepared by inverse microemulsion method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 243–250.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.001>
- Willets, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1), 267–297.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>
- Wu, Y.-N., Wu, Yang, Ratinac, Thordarson, Jahn, ... Chen. (2013). The anticancer properties of iron core–gold shell nanoparticles in colorectal cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 3321. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47742>
- Xu, J., Shen, X., Jia, L., Xu, Z., Zhou, T., Li, X., ... Zhu, T. (2017). Facile synthesis of folic acid-conjugated fluorapatite nanocrystals for targeted cancer cell fluorescence imaging. *Materials Letters*, 203, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.05.102>
- Yang, P., Xu, Q.-Z., Jin, S.-Y., Lu, Y., Zhao, Y., & Yu, S.-H. (2012). Synthesis of Multifunctional Ag@Au@Phenol Formaldehyde Resin Particles Loaded with Folic Acids for Photothermal Therapy. *Chemistry - A European Journal*, 18(30), 9294–9299.
<https://doi.org/10.1002/chem.201201173>
- Zhang, J., Han, B., Liu, M., Liu, D., Dong, Z., Liu, J., ... Rong, L. (2003). Ultrasonication-Induced Formation of Silver Nanofibers in Reverse Micelles and Small-Angle X-ray Scattering Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(16), 3679–3683.
<https://doi.org/10.1021/jp026738f>

- Zhang, W., Hu, G., Zhang, W., Qiao, X., Wu, K., Chen, Q., & Cai, Y. (2014). Surfactant-directed synthesis of silver nanorods and characteristic spectral changes occurred by their morphology evolution. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 64, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2014.07.029>
- Zhao, H., Song, F., Zhang, J., Wang, F., Liu, J., & Liu, Y. (2013). Fluorescence quenching of osthole by silver nanoparticles. *Journal of the Optical Society of America B*, 30(9), 2387. <https://doi.org/10.1364/JOSAB.30.002387>

Apéndices

Apéndice A. Fotografías de los cambios de coloración a través del tiempo de las AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar AOT/ agua.



Apéndice B. Fotografía de la coloración final de AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar AOT/ isooctano.

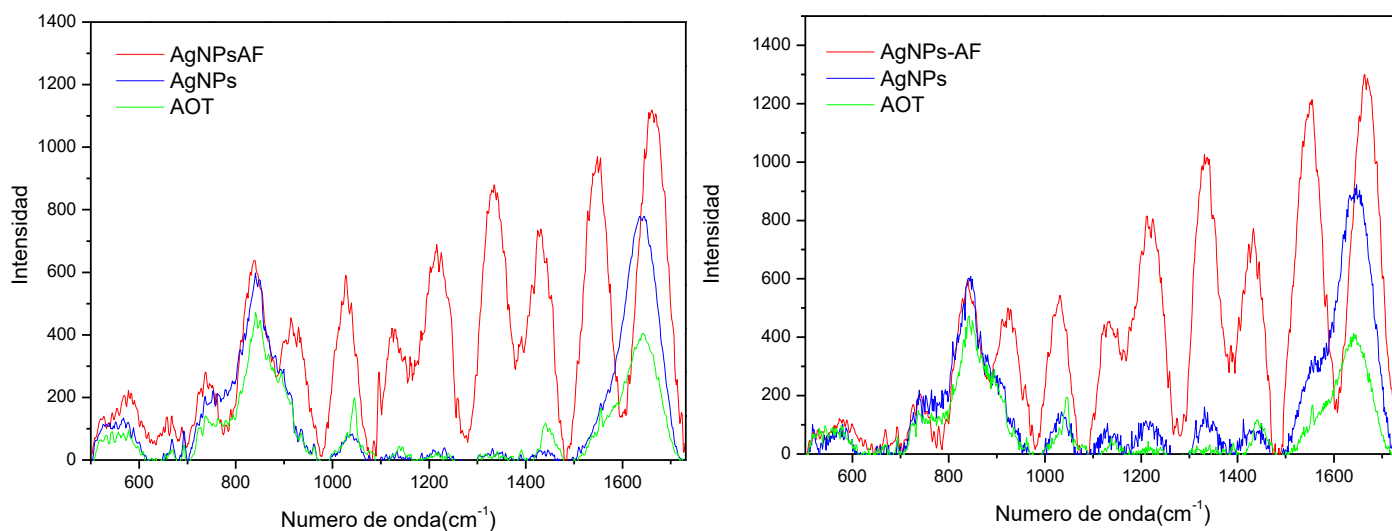


MICELAS COMO NANOREACTORES

Apéndice C. A) Solución de “Semillas” B) Coloración final de las AgNPs preparadas utilizando el sistema micelar CTAB/ agua.



Apéndice D. Espectros Raman de las AgNPs, AgNPs@AF, sintetizadas a través de los sistemas micelares AOT/agua y AOT/isooctano.



Apéndice E. Asignaciones de las bandas Raman del ácido fólico libre. (Castillo et al., 2015)

AF libre (cm ⁻¹)	Asignación
1636	$\rho(\text{OH})\text{s}(\text{NH}_2)\nu(\text{C}=\text{N})(\text{pt})$
1607	$\text{s}(\text{NH}_2)\nu(\text{C}=\text{N})(\text{pt}); \nu(\text{C}=\text{C})\rho(\text{CH})(\text{paba})$
1570	$\text{s}(\text{NH}_2)\nu(\text{C}=\text{N})\rho(\text{OH})(\text{pt}); \rho(\text{NH})\nu(\text{C}=\text{C})(\text{paba})$
1483	$\rho(\text{NH})\text{s}(\text{CH}_2)\nu(\text{C}=\text{C})(\text{paba}); \rho(\text{NH})\text{s}(\text{CN})(\text{GA})$
1457	$\nu(\text{C}=\text{C})\rho(\text{CH})(\text{pt}); \rho(\text{NH})(\text{CH})(\text{paba})$
1420	$\text{s}(\text{CH}_2)\nu(\text{C}=\text{N})\rho(\text{CH})(\text{OH})(\text{pt})$
1388	$\rho(\text{CH}_2)(\text{OH})\nu(\text{C}=\text{N})(\text{pt})$
1367	$\nu(\text{C}=\text{N})\rho(\text{CH})(\text{OH})\omega(\text{CH}_2)(\text{pt})$
1288	$\rho(\text{OH})(\text{CH})(\text{pt}); \rho(\text{CH})(\text{paba}); \rho(\text{NH})(\text{OH})(\text{CH})\omega(\text{CH}_2)(\text{GA})$

MICELAS COMO NANOREACTORES

1249	$\rho(\text{CH})(\text{paba}); \rho(\text{NH})(\text{OH})(\text{CH})\omega(\text{CH}_2)(\text{GA})$
1230	$t(\text{CH}_2)(\text{pt}); \rho(\text{CH})(\text{paba}); \rho(\text{NH})(\text{OH})(\text{CH})\omega(\text{CH}_2)(\text{GA})$
1192	$\rho(\text{OH})v(\text{C}=\text{C})t(\text{CH}_2)(\text{pt}); \rho(\text{CH})(\text{paba})$
1177	$t(\text{CH}_2)(\text{pt}); \rho(\text{CH})(\text{paba})$
1044	$\rho(\text{CH}_2)v(\text{C}-\text{C})(\text{GA})$
972	$\rho(\text{CH}_2)\rho(\text{OH})(\text{CH}_2)(\text{pt}); \rho(\text{NH})(\text{CH})(\text{paba})$
926	$\rho(\text{CH})(\text{pt}) \text{ oop};$
897	$b(\text{C}=\text{C})(\text{paba}); \rho(\text{OH})(\text{GA})$
855	$b(\text{C}=\text{C})(\text{paba}); \rho(\text{OH})t(\text{CH}_2)v(\text{C}-\text{C})(\text{GA})$
764	$\rho(\text{CH}_2)(\text{GA})$
680	$v(\text{C}=\text{N})\rho(\text{CH})(\text{OH})(\text{pt}) \text{ oop def}; \rho(\text{CH})(\text{NH})(\text{paba})$
636	$v(\text{C}=\text{N})(\text{pt}) \text{ def}; \text{paba def}; \rho(\text{CH}_2)\rho(\text{OH})(\text{GA});$
519	$\rho(\text{NH}_2)(\text{pt}) \text{ def}; \rho(\text{NH})(\text{CH})(\text{paba}) \text{ oop def}$