



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Síntesis y caracterización de nanopartículas
de oro utilizando micro y nano-emulsiones:
un enfoque sustentable”**

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:

ROCIO PAOLA CARRILLO GAYTAN

DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ MUÑOZ

CO-DIRECTOR

DR. RUBÉN DARÍO RIVERA RANGEL

Guanajuato, Gto.

Noviembre 2022



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
POSGRADO EN QUÍMICA



**“Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro utilizando
micro y nano-emulsiones: un enfoque sustentable”**

T E S I S

QUE, PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A:

ROCIO PAOLA CARRILLO GAYTAN

DIRECTORA

**DRA. MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ
MUÑOZ**

CO-DIRECTOR

DR. RUBÉN DARÍO RIVERA RANGEL

MIEMBROS DEL JURADO

DR. GUSTAVO RANGEL PORRAS

Presidente

DRA. TERESA ALEJANDRA RAZO LAZCANO

Secretario

DRA. NAYELY PINEDA AGUILAR

Vocal

DRA. ROSALBA FUENTES RAMÍREZ

Sinodal Suplente

Guanajuato, Gto.

Noviembre 2022

DECLARATORIA

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad del presente trabajo titulado:

“Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro utilizando micro y nano-emulsiones: un enfoque sustentable”

El trabajo de esta tesis fue realizado por la Q. Rocío Paola Carrillo Gaytán, para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas; en los laboratorios del Departamento de Química Sede Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, bajo nuestra dirección.

ATENTAMENTE

Dra. María del Pilar González Muñoz

Dr. Rubén Darío Rivera Rangel

A mis padres,

Rocío Rosario y Sergio

AGRADECIMIENTOS

He reservado una página de este escrito para agradecer sinceramente todo el apoyo que recibí durante mi formación como Maestra en Ciencias Químicas.

Gracias Dra. Pilar por confiar en mí y brindarme todo lo necesario para poder desarrollar mi proyecto. Sin duda, ha sido una gran guía cuando me perdía en el mar de información, y un buen ejemplo a seguir por su dedicación y compromiso con la vida académica y la investigación.

Dr. Darío, quiero agradecer enormemente el conocimiento que has compartido conmigo, la atención y dedicación asesorándome en este proyecto tan interesante. Espero haber contribuido tan solo un poco al notable trabajo que iniciaste.

Quiero agradecer a mi familia por comprender mi deseo de iniciar una carrera en la ciencia y apoyarme incondicionalmente a cumplirlo. A mis amigos y, especialmente, a las nuevas personas que conocí en el trayecto, por escucharme y aconsejarme. A mis compañeras de laboratorio Adriana, Diana, Diany y Lupita por formar un ambiente de comprensión y ayuda mutua en todo momento. A la dra. Tere y al dr. Mario por su intervención como guías para la realización de un mejor proyecto.

Finalmente, agradezco a CONACYT por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría (CVU: 1077266). También me permito agradecer a la Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, la División de Ciencias Naturales y Exactas, la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado y al programa JUVENTUESGTO, por el apoyo económico para dar a conocer el proyecto entre la comunidad científica. Al Laboratorio Nacional LACAPFEM-UG por la disposición de los equipos de caracterización y al CIMAV- Unidad Monterrey por los análisis de SEM y STEM.

-Q. Rocío Paola Carrillo Gaytán

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la síntesis de nanopartículas de oro evaluando la capacidad del extracto acuoso de hojas de Chaya maya (ECM) como agente reductor para los iones de Au(III), además, se estudió la influencia que tienen los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados controlando la formación de nanopartículas de oro. Dichos sistemas están compuestos por: aceite de ricino como fase oleosa, una mezcla de surfactante y co-surfactante, Brij O10 y 1,2-hexanodiol, respectivamente, en relación 1:1 y una fase acuosa. Las fases acuosas utilizadas fueron el ECM y una solución estándar de Au(III) como precursor. El ECM mostró ser un buen agente reductor, sin embargo, los componentes del extracto por sí mismo no logran controlar el crecimiento de las partículas formadas. Este inconveniente se solucionó llevando a cabo la síntesis en microemulsiones y nano-emulsiones, cumpliendo favorablemente con su rol como nano-reactores. El aspecto de las dispersiones coloidales de nanopartículas de oro obtenidas en los sistemas de micro y nano-emulsión presentaron un color rojo/violeta característico de la presencia de nanopartículas esféricas, los tamaños de nanopartícula promedio se encuentran en el intervalo de 19 a 40 nm. Aunado a lo anterior, al estar suspendidas en agua mostraron una buena estabilidad. El tamaño de las nanopartículas de oro obtenidas por este método depende de la cantidad de fase acuosa en el sistema y del tipo de microestructura presente.

ABSTRACT

In the present work, the synthesis of gold nanoparticles was carried out, evaluating the capacity of the aqueous extract of Chaya maya leaves (ECM) as a reducing agent for Au(III) ions, in addition, the influence of microemulsion and nano-emulsion systems controlling the formation of gold nanoparticles. These systems are made up of castor oil as oily phase, a mixture of surfactant and co-surfactant, Brij O10 and 1,2-hexanediol (1:1), respectively, and an aqueous phase. The aqueous phases used were the ECM and a standard solution of Au(III) as precursor. The ECM proved to be a good reducing agent, however, the components of the extract by themselves are not able to control the growth of the produced particles. This drawback was solved by carrying out the synthesis in microemulsions and nano-emulsions, favorably performing their role as nano-reactors. The appearance of the colloidal dispersions of gold nanoparticles obtained in the micro- and nano-emulsion systems presented a red/violet color characteristic of the presence of spherical nanoparticles, the nanoparticle size average is in the range of 19 to 40 nm. Added to this, being suspended in water showed good stability. The size of the gold nanoparticles obtained by this method depends on the amount of aqueous phase in the system and the type of microstructure present.

ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE OBJETOS.....	x
ABREVIACIONES	xiv
INTRODUCCIÓN	xvi
HIPÓTESIS.....	xviii
JUSTIFICACIÓN.....	xviii
OBJETIVOS	xix
CAPÍTULO 1 <i>ANTECEDENTES</i>	1
1.1. MATERIALES NANOESTRUCTURADOS	2
1.1.1. Nanopartículas metálicas	4
1.1.2. Nanopartículas de oro	5
1.1.3. Etapas de formación de las nanopartículas de oro	6
1.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	10
1.2.1. Resonancia de plasmón de superficie	10
1.2.2. Dispersión de luz dinámica	14
1.2.3. Potencial Zeta.....	15
1.2.4. Microscopía electrónica de barrido	17
1.2.5. Espectroscopía Raman	18
1.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	20
1.3.1. Métodos químicos	22
1.3.2. Métodos de síntesis inducidos por distintas fuentes de radiación	22
1.3.3. Métodos electroquímicos.....	23
1.3.4. Métodos de ultrasonido.....	24
1.3.5. Métodos biológicos.....	24
1.3.5.1. Síntesis de nanopartículas utilizando extractos naturales	25
1.4. CHAYA MAYA	27

1.5. SISTEMAS MICROEMULSIONADOS Y NANO-EMULSIONADOS COMO NANO-REACTORES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	31
1.5.1. Emulsiones.....	31
1.5.1.1. Nano-emulsiones	35
1.5.1.2. Surfactantes.....	37
1.5.2. Microemulsiones	39
CAPÍTULO 2 SECCIÓN EXPERIMENTAL	45
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	46
2.2. MÉTODOS	47
2.2.1. Obtención del extracto acuoso de hojas de Chaya maya (ECM)	47
2.2.2. Poder reductor del extracto	48
2.2.3. Comportamiento fásico	50
2.2.4. Conductividad.....	51
2.2.5. Síntesis directa de nanopartículas de oro	51
2.2.6. Síntesis de nanopartículas de oro en microemulsiones y nano-emulsiones..	52
2.2.7. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	53
CAPÍTULO 3 <i>Síntesis directa de nanopartículas de oro utilizando el extracto acuoso de hojas de chaya maya como agente reductor</i>	55
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA	56
3.1.1. Características generales del extracto acuoso	56
3.1.2. Análisis del extracto de Chaya maya mediante micro-Raman.....	58
3.1.3. Capacidad antioxidante- poder reductor	60
3.1.4. Conclusiones Parciales.....	61
3.2. SÍNTESIS DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO USANDO EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA COMO AGENTE REDUCTOR..	63
3.2.1. Influencia de la concentración del precursor de oro	63
3.2.2. Influencia de la concentración del extracto.....	66
3.2.3. Conclusiones Parciales	69
CAPÍTULO 4 <i>Sistemas microemulsionados y nano-emulsionados como nano-reactores para la síntesis de nanopartículas de oro utilizando extracto acuoso de hojas de chaya maya como reductor</i>	70
4.1. SISTEMAS MICROEMULSIONADOS Y NANO-EMULSIONADOS COMO NANO-REACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	

UTILIZANDO EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA COMO REDUCTOR.....	71
4.1.1. Comportamiento fásico de los sistemas	71
4.1.2. Caracterización de las AuNPs	74
4.1.3. Estudio de la influencia del pH en los sistemas	80
4.1.4. Funcionalización de las AuNPs y propiedades SERS.....	83
4.1.5. Conclusiones Parciales.....	86
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	88
BIBLIOGRAFÍA	89

ÍNDICE DE OBJETOS

Índice de figuras

Figura 1.1.1. Ejemplos de nanopartículas clasificadas de acuerdo con su dimensionalidad.....	2
Figura 1.1.2. Ejemplos de funcionalización de la superficie de la nanopartícula.	5
Figura 1.1.3. a) Espectros UV-vis registrados durante la formación de AuNPs (inserción) e intensidad de la banda SPR frente al tiempo. b) Radio de esfera medio y número normalizado de partículas representado frente al tiempo de reacción derivado de SAXS. c) Estado de oxidación formal promedio del oro derivado de espectros XANES normalizados representados frente al tiempo de reacción; fracción de volumen de partículas calculada a partir de datos SAXS. d) Ilustración esquemática del proceso deducido de formación de nanopartículas de oro. Adaptado de [40].	8
Figura 1.1.4. A-B) Evolución temporal del tamaño/forma de los nanocristales de oro formados en una reacción con proporción NaCit: H ₂ AuCl ₄ 7:1 y 2:1, respectivamente. C) proporción NaCit: H ₂ AuCl ₄ 2:1, ajustando el pH a 7.2. D) Ilustración esquemática de dos vías de reacción para la síntesis de nanocristales de oro por reducción de citrato. Adaptado de [41].	9
Figura 1.2.1. Espectros de absorbancia simulados para el campo electromagnético incidente a 90° y diferentes ángulos de polarización. Obtenido de [3].	11
Figura 1.2.2. a) Eficiencias de extinción en función de la longitud de onda de la luz incidente de un cubo de plata, distintos cubos truncados y una nanopartícula esférica. b) Nanopartícula de cubo, y dos cubos truncados diferentes, y la esfera. Adaptados de [47].	11
Figura 1.2.3. Espectros UV-vis de AuNPs: (a) 2.1 nm; (b) 4.6 nm; (c) 6nm; (d) 8.8 nm; (e) 11.4 nm; (f) 13.4 nm. Parte inferior, aspecto de las AuNPs. Adaptado de [48].	12
Figura 1.2.4. Apariencia de distintas soluciones coloidales oro con diferente morfología variando a) la relación aspecto de las nano-varillas, b) el espesor de capa de las nano-capas y c) la concentración de oro en nano-jaulas. Adaptado de [49].	13
Figura 1.2.5. a) Configuración de la doble capa eléctrica entre una partícula y el fluido que la rodea. b) Principio de la celda utilizada para medir la movilidad electroforética. Adaptado de [54].	16
Figura 1.2.6. Comparación entre la dispersión Rayleigh, Raman Stokes y anti-Stokes, y sus desplazamientos.	18
Figura 1.3.1. Esquema ilustrativo de los métodos de síntesis top-down y bottom-up.	21
Figura 1.4.1. Variedades de chaya a) estrella, b) picuda, c) chayamansa y d) redonda. Adaptado de [103].	28
Figura 1.4.2. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos comúnmente encontrados en extractos acuosos de hojas de <i>C. chayamansa</i>	29
Figura 1.4.3. Estructuras químicas de algunos de los compuestos flavonoides reportados en extractos acuosos de hojas de <i>C. chayamansa</i>	30
Figura 1.5.1. Fenómenos físicos que desestabilizan una emulsión.	34
Figura 1.5.2. Métodos de formación de nano-emulsiones.	36

Figura 1.5.3. Tipos de microestructuras comúnmente encontradas en microemulsiones: a) O/W, b) bicontinuas y c) W/O.....	39
Figura 1.5.4. Ilustración esquemática del mecanismo de formación de la meso-fase a partir de la interfase de la microemulsión. Obtenido de [130].....	42
Figura 1.5.5. Apariencia de microemulsión (izquierda), emulsión (centro) y nano-emulsión (derecha). Obtenida de [147]......	44
Figura 2.1.1. Estructuras químicas de los componentes utilizados para formular los sistemas micro y nano-emulsionados.....	46
Figura 2.2.1. Reacción CUPRAC. Adaptado de [153]......	49
Figura 2.2.2. Reacción FRAP. Adaptado de [156]......	49
Figura 2.2.3. Diagrama ternario de fases utilizado para realizar un barrido rápido del comportamiento de fase, a partir de la dilución con extracto de chaya maya (ECM) de mezclas aceite/ surfactante: co-surfactante (O/S:C) a temperatura constante.....	50
Figura 2.2.4. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de AuNPs en microemulsiones y nano-emulsiones.	52
Figura 3.1.1.1. Porcentaje de humedad perdida en las hojas de chaya maya después del proceso de secado.....	56
Figura 3.1.1.2. Espectros UV-vis de extractos acuosos de hojas de Chaya maya a diferentes concentraciones. Recuadro: ampliación de la región entre 625-725 nm.....	57
Figura 3.1.1.3. Espectro UV-vis del extracto acuoso (1) hidroetanólico y (2) acuoso de hojas de Chaya maya. Recuadro: aspecto de los extractos.	58
Figura 3.1.2.1. Espectro de dispersión Raman del ECM al 10 %. Adquirido con láser de 780 nm, potencia de 24 mW, 64 exposiciones por 1 segundo, lente de 50 X y apertura con orificio de 25 μm	59
Figura 3.1.3.1. Análisis del poder reductor del ECM al 1 % respecto a los días en almacenamiento a 4 °C, mediante CUPRAC.	61
Figura 3.2.1. a) Gráfica de la absorbancia de la SPRB a 523 nm respecto al tiempo de reacción de las nanopartículas obtenidas con el ECM al 2% con diferentes concentraciones de precursor de oro. b) espectros UV-vis de la SPRB de las AuNPs sintetizadas con 0.50 mM y el ECM al 2 % a diferentes tiempos de reacción.	64
Figura 3.2.2. Gráficos de distribución de tamaños por intensidad después de 5 y 90 minutos de reacción con una concentración de Au^{3+} de a) 0.25 mM y b) 0.50 mM, manteniendo la concentración del ECM al 2 %.	65
Figura 3.2.3. Tendencia del tamaño de partícula promedio de las AuNPs sintetizadas con ECM al 2 % y diferentes concentraciones de Au después de 90 min. Mediante DLS.	65
Figura 3.2.4. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad obtenidos mediante DLS de las AuNPs sintetizadas con ECM 2 % y $[\text{Au}^{3+}]$ 0.75 mM.	66
Figura 3.2.5. Resultados de las AuNPs sintetizadas con el ECM a diferentes concentraciones manteniendo la concentración del precursor a 0.75 mM a) SPRB observada mediante espectroscopía UV-vis. b) Gráfica de la tendencia de la Absorbancia a 523 nm respecto a la concentración del ECM.	67
Figura 3.2.6. Aspecto de las AuNPs sintetizadas con diferentes concentraciones de ECM después de a) un minuto de reacción y b) 25 minutos de reacción.	67

Figura 3.2.7. Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas directamente con el ECM al 4 % después de diferentes tiempos en reacción.	68
Figura 3.2.8. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad obtenidos mediante DLS de las AuNPs sintetizadas con ECM 4% y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.	69
Figura 4.1.1.1. Mezclas con relación inicial O/S:C tituladas con 100 % de fase acuosa.	71
Figura 4.1.1.2. Diagrama de fases pseudo-ternario que muestra las distintas zonas del sistema fase acuosa/Brij O10:1,2-hexanodiol (1:1) /Aceite ricino. Obtenido a 25 °C. Comparando las zonas de nE cuando se tiene como fase acuosa agua Milli-Q o el ECM.....	72
Figura 4.1.1.3. Curvas de conductividad siguiendo la línea de dilución 30/70 (diagrama) adicionando a) ECM y b) solución estándar de oro como fase acuosa.	73
Figura 4.1.2.1. Espectro UV-vis las AuNPs obtenidas en las composiciones a) A, B2 y C3; b) B y C2; c) C y D y; d) E, F y G. En los recuadros se presenta el aspecto físico de los sistemas coloidales después de 100 minutos de reacción en los sistemas de microemulsión y nano-emulsión.	75
Figura 4.1.2.2. Gráfica de la distribución del tamaño de partícula obtenido mediante DLS por intensidad de las muestras E, F y G.....	77
Figura 4.1.2.3. Distribución de tamaño de partícula promedio de las AuNPs sintetizadas en diferentes composiciones, obtenido mediante a) DLS y b) STEM.	78
Figura 4.1.2.4. Micrografías STEM de las AuNPs a una escala de 2 μ m y 200 nm, acompañadas del histograma de distribución del diámetro de nanopartícula de las muestras a) B2, b) C2, c) D, d) E, e) F y f) G.	79
Figura 4.1.2.5. Potencial Z de las AuNPs sintetizadas con diferentes composiciones en los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados.	80
Figura 4.1.3.1. Espectros UV-vis de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G sin modificar (0) y modificando el pH del precursor de 0.5 a 1.5. En el recuadro se presenta la apariencia física de las AuNPs variando el pH del precursor.....	81
Figura 4.1.3.2. Micrografía STEM de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G modificando el pH del precursor a 1.5.	81
Figura 4.1.3.3. Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G disminuyendo el pH del ECM (1) y sin modificación alguna (0). Recuadro: aspecto de las AuNPs.....	82
Figura 4.1.4.1. Espectros de dispersión Raman de las AuNPs F, E, D2, C2 y B2. Adquirido con láser de 532 nm, 64 exposiciones por 1 segundo, lente de 50 X, potencia de 7 mW, aperturas con ranura 50 μ m (B2 y E) y orificio de 50 μ m (D2, C2 y F).....	84
Figura 4.1.4.2. Espectro SERS del ECM al 10 % con AuNPs sintetizadas (línea azul). Adquirido con un láser de 633 nm, potencia de 8 mW, objetivo de 50 X, 64 exposiciones por un segundo y una apertura con orificio de 25 μ m. Comparado con el espectro del ECM al 10 % (línea roja), presentado en la Figura 3.1.4.....	85

Índice de tablas

Tabla 1.3-1. Métodos top-down para la síntesis de nanopartículas metálicas.....	21
---	----

Tabla 1.4-1. Comparación de composiciones nutricionales de hojas de chaya (<i>Cnidoscolus chayamansa</i> McVaughn) y espinacas (<i>Spinacia oleracea</i> L.) por 100 g de peso fresco. Obtenida de [99].	27
Tabla 1.5-1. Tipos de dispersiones coloidales y ejemplos.	32
Tabla 1.5-2. Métodos mecánicos de emulsificación.	33
Tabla 1.5-3. Tipos principales de surfactantes de acuerdo con el grupo hidrofílico.	38
Tabla 1.5-4. Escala de equilibrio lipofílico hidrofílico (HLB) mostrando la clasificación de las aplicaciones del surfactante. Obtenido de [124].	38
Tabla 1.5-5. Comparación entre microemulsiones y nano-emulsiones.	44
<i>Tabla 2.2-1. Composiciones evaluadas para la síntesis de AuNPs.</i>	53
Tabla 3.1-1. Asignación de las señales Raman que corresponden a compuestos flavonoides en el espectro del extracto de chaya maya al 10 %.	60
Tabla 3.2-1. Distribución del tamaño medio y porcentaje de intensidad de las AuNPs sintetizadas con ECM 2 % y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.	66
Tabla 3.2-2. Distribución del tamaño medio y porcentaje de intensidad de las AuNPs sintetizadas con ECM 4 % y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.	69
Tabla 4.1-1. Longitud de onda máxima de las AuNPs sintetizadas en los sistemas micro y nano-emulsionados con diferentes composiciones O/S:C/W.	76
Tabla 4.1-2. Resultados de la síntesis de AuNPs modificando y sin modificar el pH del precursor.	82

Índice de Ecuaciones

Ecuación (1.1-1)	3
Ecuación (1.1-2)	3
Ecuación (1.2-1)	14
Ecuación (1.2-2)	14
Ecuación (1.2-3)	16
Ecuación (1.5-1)	40
Ecuación (2.2-1)	48
Ecuación (2.2-2)	48

ABREVIACIONES

ECM	Extracto acuoso de hojas de chaya maya	STEM	Microscopía electrónica de barrido-transmisión (Scanning Transmission Electron Microscopy)
nm	nanómetro		
AuNPs	Nanopartículas de oro	UV-vis	Ultravioleta-visible
MNPs	Nanopartículas metálicas	CCD	Dispositivo de carga acoplada
SPR	Resonancia de plasmón de superficie (Surface Plasmon Resonance)	NaBH ₄	Borohidruro de sodio
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
HAuCl ₄	Ácido tetracloroaurico	CHCl ₃	Triclorometano
SAXS	small-angle X-ray scattering	MeOH	Metanol
XANES	X-ray absorption nearedge spectroscopy	W/O	Agua en aceite
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)	O/W	Aceite en agua
NaCit	Citrato de sodio	O/W/O	Aceite en agua en aceite
SPRB	Banda de resonancia de plasmón de superficie (Surface Plasmon Resonance Band)	W/O/W	Agua en aceite en agua
ICO	Icosaedros	PIT	Inversión de fase por temperatura
TC	Cubos truncados	PIC	Inversión de fase por concentración
CO	Cuboctaedro	HLB	Balance hidrofílico-lipofílico (hydrophilic-lipophilic balance)
R	Relación-aspecto	TEOS	Tetraetoxisilano
$\lambda_{\text{máx}}$	longitud de onda máxima	HCl	Ácido clohídrico
R _H	Radio hidrodinámico	Brij O10	Éter de polioxietilen(10)oleílico
D	Coefficiente de difusión	O	Aceite (oil)
DLS	Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering)	S	Tensoactivo (surfactant)
		C	Co-tensoactivo
		W	Fase acuosa (water)

ECM	Extracto acuoso de hojas de Chaya maya	TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
m/V	masa/Volumen	FeCl ₃	Cloruro de hierro(III)
mL	mililitros	rpm	Revoluciones por minuto
µm	micrómetros	mM	milimol/Litro
CUPRAC	Capacidad antioxidante reductora cúprica (Cupric reducing antioxidant capacity)	EtOH	Etanol
FRAP	Poder antioxidante reductor férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power)	cps	Cuentas por segundo
AA	Ácido ascórbico	Abs	Absorbancia
		u. a.	unidades arbitrarias
		PDI	Índice de polidispersidad

INTRODUCCIÓN

Un nanomaterial es aquel que tiene al menos una de sus dimensiones en el rango nanométrico (1 nm a 100 nm) [1]. Las nanopartículas metálicas, especialmente las nanopartículas de metales nobles como oro, plata o platino son de gran importancia en la química ya que tienen numerosas aplicaciones en diferentes áreas por su estabilidad y propiedades particulares, empleadas directamente o soportadas en las superficies de otros materiales [2]. Podemos destacar las nanopartículas de oro, debido a que pueden ser fácilmente identificadas por su característica banda de resonancia de plasmón de superficie [3], que depende de su tamaño y morfología, poseen mayor estabilidad química y física, tiene propiedades bactericidas, magnéticas y no toxicidad [4]. Son ampliamente aplicadas en óptica, catálisis, sensores, medicina, entre otros.

Los métodos que consisten en la formación de nanopartículas a partir de la unión de átomos, moléculas o partículas más pequeñas [5] están basados tanto en procesos físicos, químicos como biológicos. Aquellos que involucran procesos biológicos, generalmente, cumplen con las grandes ventajas de la química verde, la cual puede considerarse como una ideología que se basa en el *diseño de procesos y productos químicos que reduzcan o eliminen el uso y generación de sustancias peligrosas* [6]. Estos métodos ayudan a producir nanomateriales no-tóxicos o de baja toxicidad y a generar biocompatibilidad para poder emplearlos en áreas como la medicina o la biotecnología [7]. Los métodos de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas son los segundos más reportados en los últimos años, después de la síntesis por fuentes bioenergéticas [8]. Debido a su bajo costo y que, se puede sintetizar nanomateriales en condiciones limpias y en periodos de tiempo reducidos a partir de fuentes naturales renovables; además, no es necesario tener un delicado control de los agentes reductores como es el caso de los métodos que involucran microorganismos.

Existe una gran variedad de plantas que pueden ser utilizadas como agente reductor de las partículas metálicas [9], en este trabajo se utilizó el extracto acuoso de las hojas de *Cnidocolus chayamansa*, popularmente conocida como Chaya maya. La Chaya maya es una planta nativa de México y Centroamérica, de gran relevancia histórica en la Península de Yucatán, México e introducida en la dieta tradicional debido a su aporte nutrimental [10] como proteínas, vitaminas, ácido ascórbico, calcio, potasio, hierro entre otros [11]. Además, se han

estudiado las propiedades antioxidantes de la Chaya mostrando su capacidad de prevenir enfermedades cancerígenas [12], así como sus efectos hipoglucémicos e hipolipidémicos [13]. Se puede considerar que es un recurso renovable ya que puede crecer en una gran variedad de suelos, en climas cálidos y lluviosos, así como en áreas de sequía ocasional; y crece más rápidamente en climas cálidos [14].

La preparación de nanopartículas metálicas coloidales en sistemas nano-emulsionados y microemulsionados conformadas por aceite/ tensoactivo/ agua y utilizando reductores tanto clásicos como no tradicionales ha demostrado ser un método viable sobre todo para la obtención de distribuciones de tamaño de nanopartícula y morfologías definidas [15]. Las nano-emulsiones, son un tipo de emulsiones que poseen un tamaño de gota que ronda en el intervalo nanométrico (entre 20 y 200 nm), por lo cual pueden presentar apariencia traslúcida. Aunque las nano-emulsiones son sistemas que no están en equilibrio y requieren de algún tipo de energía para su formación, el tamaño de gota tan pequeño le confiere estabilidad cinética ante la sedimentación [16]. Haciendo un análisis comparativo entre las nano-emulsiones y las microemulsiones, a simple vista las microemulsiones son dispersiones coloidales transparentes, monofásicas y ópticamente isotrópicas; su principal diferencia radica en que, las microemulsiones son estables termodinámicamente [17], es decir, no se necesita de aporte de energía al sistema para su formación. La principal ventaja que poseen las nano-emulsiones sobre las microemulsiones es que requieren menor concentración de surfactante para su formación.

Dependiendo del rol de cada componente, ya sea como agente dispersante o como fase dispersa, se pueden obtener microestructuras del tipo agua en aceite (water-in-oil, W/O), donde la fase continua es el medio oleoso y la fase acuosa es la fase dispersa; en las microemulsiones aceite en agua (oil-in-water, O/W) se tiene como fase dispersa la fase oleosa en una fase acuosa continua. También se puede presentar una combinación de ambos sistemas en una llamada fase bicontinua, donde las cantidades de agua y aceite son similares. Es indispensable estudiar el comportamiento físico para comprender la naturaleza de los sistemas ya que, según el tipo de estructura presente en el sistema se tendrán diferentes ambientes para la obtención de nanopartículas y, consecuentemente, diferentes características de las nanopartículas, influyendo también en la eficiencia del método.

HIPÓTESIS

Obtener nanopartículas de oro en sistemas micro y nano-emulsionados con tamaños y formas controlados definidos por los sistemas, empleando el extracto acuoso de las hojas de *Cnidioscolus chayamansa* como agente reductor.

JUSTIFICACIÓN

Trabajos previos utilizando el extracto acuoso de hojas de Chaya maya demostraron ser eficientes en la reducción de iones de plata(I), su poder reductor se atribuye a compuestos fenólicos y flavonoides que logran extraerse en medio acuoso [18]. Los sistemas compuestos por fase acuosa/Brij O10:1,2-hexanodiol (1:1) /aceite de ricino, fueron estudiados previamente y probados con éxito para la obtención de nanopartículas de plata [19]. Debido al control que proporcionan los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados sobre el crecimiento y la forma de las nanopartículas, así como la capacidad de implementar reductores suaves como los extractos naturales para la reducción de iones metálicos, en este proyecto se propone trabajar con los sistemas descritos anteriormente, empleando el extracto acuoso de hojas de Chaya maya en fase acuosa, que actuará como agente reductor maya para la síntesis de nanopartículas de oro.

El método de síntesis aquí propuesto es un método simple que puede llevarse a cabo en condiciones suaves, ya que no requiere aporte energético adicional. Además de que los componentes empleados son de baja o nula toxicidad, por lo que las nanopartículas de oro podrían ser aplicadas en áreas como la cosmética, medicina o biotecnología.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología de síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando microemulsiones y nano-emulsiones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinación del comportamiento físico del sistema Fase acuosa/Brij O10:1,2-hexanodiol (1:1) /Fase oleosa; fase acuosa: agua y extracto acuoso de hojas de Chaya maya y mezcla del extracto de Chaya maya y precursor metálico; fase oleosa: aceite de ricino.
- 2) Caracterización de los sistemas elegidos para la síntesis mediante conductividad, espectroscopía Raman y dispersión de luz dinámica.
- 3) Preparación de nanopartículas de oro en microemulsiones y nano-emulsiones utilizando como reductor al extracto de hojas de *C. chayamansa* y evaluación de los parámetros físicos y químicos durante la síntesis.
- 4) Caracterizar las nanopartículas obtenidas en las diferentes condiciones.
- 5) Correlacionar el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas con las condiciones de síntesis.



CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES



1.1. MATERIALES NANOESTRUCTURADOS

Antes de introducir algunas de las rutas de síntesis comúnmente empleadas para la fabricación de nanopartículas metálicas es primordial definir los alcances que tiene la ciencia de los nanomateriales, así como destacar la importancia de su estudio.

Un nanomaterial es aquel que tiene al menos una de sus dimensiones en el rango nanométrico (1 *nm* a 100 *nm*). Por lo que la nanociencia se podría definir como el estudio de materiales o sustancias con al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica y, a la nanotecnología como el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de estos nanomateriales.

En la naturaleza y a lo largo de la historia, se han encontrado materiales nanoestructurados que ayudan a cumplir funciones biológicas o que están involucrados en diferentes técnicas [20]. Se considera que las perspectivas planteadas por Richard Feynman en una conferencia para la American Physical Society (1959) motivaron a la comunidad científica a enfocarse en la construcción de materiales cada vez más pequeños e iniciando así la era de la nanociencia como un área interdisciplinaria donde físicos, químicos y biólogos contribuyen a su desarrollo. Aunque, el progreso fundamental de la nanociencia y la nanotecnología se logró hasta después de 1980 con la invención del microscopio de túnel [21].

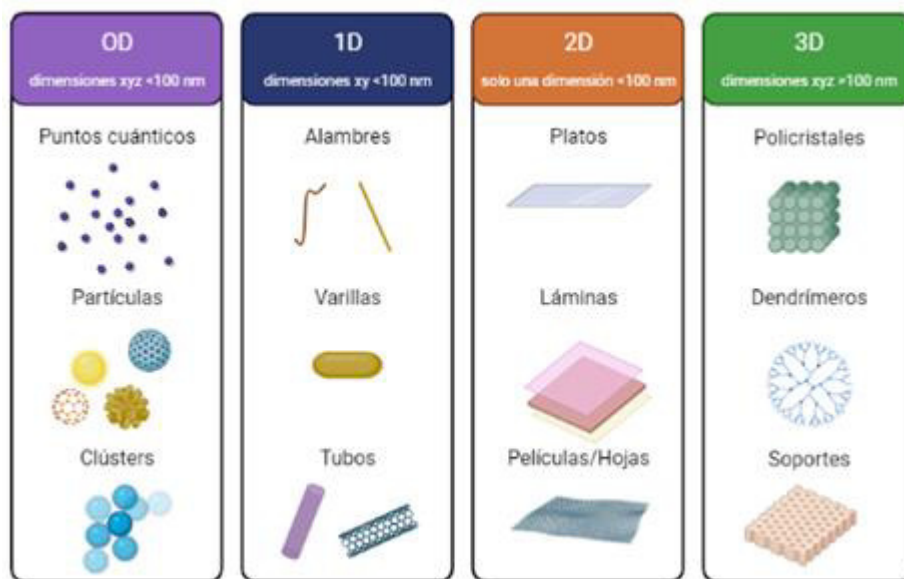


Figura 1.1.1. Ejemplos de nanopartículas clasificadas de acuerdo con su dimensionalidad.

Los materiales nanoestructurados pueden ser clasificados por su dimensionalidad en cuatro clases: 0D, 1D y 2D (**Figura 1.1.1**). Se clasifican como 0D al tener todas sus dimensiones en escala nanométrica como los puntos cuánticos, clústeres y partículas esféricas; los nanomateriales 1D poseen una dimensión encima del rango nanométrico (>100 nm) como los del tipo nanotubos o nanoalambres; los materiales 2D tales como platos o láminas tienen dos de sus dimensiones fuera del rango nanométrico. Aquellos materiales 3D, aunque no suelen considerarse como nanoestructurados por sí mismos, pueden emplearse como matrices para soportar alguna de las estructuras 0D, 1D o 2D [22]. Otro tipo de clasificaciones involucran su morfología, composición química o el estado en el que se encuentren [1].

La principal importancia de la nanotecnología radica en que las propiedades para una misma aplicación pueden mejorarse considerablemente controlando y disminuyendo el tamaño de partícula. Especialmente se pueden acomodar alrededor de unos mil átomos en un cubo de 1 nm³, por lo que los fenómenos que ocurren a escala nanométrica podrían considerarse como múltiples interacciones atómicas, estando en el límite del régimen cuántico. Teniendo una partícula esférica de radio r , se tiene que al disminuir el tamaño de partícula a un nivel cada vez más pequeño la relación área superficial-volumen (S) incrementa de la siguiente manera:

$$S = \frac{A}{V} \quad (1.1-1)$$

donde A es el área de la esfera que es igual a $4\pi r^2$ y V es el volumen que corresponde a $\frac{4}{3}\pi r^3$, sustituyendo y simplificando la **Ecuación 1.1-1** se tiene que:

$$S = \frac{3}{r} \quad (1.1-2)$$

Cuando el radio se ve reducido a niveles nanométricos, la mayor parte de los átomos que conforman la partícula se encuentran en la superficie y, como consecuencia, sus propiedades comparadas con los materiales convencionales son distintas.

Por ejemplo, la temperatura de fusión en metales con tamaños menores a 30 nm tiende a decrecer debido a que requieren una menor energía de activación por la alta relación superficie-volumen. El área superficial tan grande que poseen los nanomateriales les otorga la

capacidad de almacenar más energía, lo cual los hace muy prometedores en la creación de baterías cada vez más eficientes. Las propiedades mecánicas tales como dureza, resistencia, tensión, tracción, fatiga, entre otras también suelen ser superiores comparadas a los materiales convencionales. Cierta tipo de materiales con propiedades magnéticas pueden convertirse en materiales súper-magnéticos a temperatura ambiente al disminuir considerablemente su tamaño. Al decrecer el tamaño del material cambian drásticamente sus propiedades ópticas ya que el tamaño de partícula es incluso menor que la longitud de onda de la luz visible. [1, 23]

1.1.1. Nanopartículas metálicas

Además de las nuevas propiedades que adquiere un material a escala nanométrica, las cuales les permiten ser aplicados en distintas áreas tales como la biotecnología, tecnologías de la información, industria de los alimentos, agricultura y cosméticos, las nanopartículas metálicas (MNPs) poseen una característica que las hace destacar entre otros materiales y es la llamada resonancia de plasmón de superficie o Surface Plasmon Resonance (SPR). Generalmente, las propiedades ópticas y electrónicas de las MNPs se deben a esta característica y será descrita más a detalle en el subtema 1.2.1, en este tema se abordarán algunas de las aplicaciones de las MNPs de acuerdo con sus características, así como su mecanismo de formación.

Las nanopartículas de metales nobles tienen especial interés como catalizadores químicos, en la fabricación de nanomedicinas, materiales nanoelectrónicos, biosensores, etc. Al modificar las MNPs formando aleaciones o composites, exhiben propiedades electrónicas, ópticas y catalíticas únicas que son diferentes a las de las nanopartículas individuales.

La mayoría de las aplicaciones se basan en la funcionalización de la superficie para proveer la estabilidad coloidal necesaria y en la biocompatibilidad que las nanopartículas adquieran (**Figura 1.1.2**), siendo factores clave para su desarrollo el control sobre el tamaño, la distribución de tamaños y la forma [24]. El área de investigación sobre las MNPs es muy activa, mientras unos grupos de investigación desarrollan nuevas rutas de síntesis para obtener mejores distribuciones de tamaño, diferentes morfologías como esferas, platos, triángulos, barras, alambres, estrellas, etc. Otros grupos estudian las propiedades que adquieren diferentes nanopartículas.

Algunas nanopartículas de metales nobles han mostrado ser excelentes sustratos en la técnica de espectroscopía Raman con superficie mejorada (SERS, Surface-enhanced Raman scattering) para detectar moléculas individuales [25, 26]. Las MNPs pueden conjugarse fácilmente con diferentes moléculas como péptidos o anticuerpos para el marcaje activo o pasivo de células específicas [5], también suelen recubrirse con polímeros para favorecer la biocompatibilidad y prolongar la circulación *in vivo* para la liberación de fármacos y genes [27]. Una amplia gama de nanopartículas de oro se funcionalizan ya sea con ligandos específicos, sales o con moléculas orgánicas que permitan formar sitios de unión competitivos para detectar biomoléculas, genes o patógenos, en donde dependiendo del grado de agregación o estabilización coloidal se puede relacionar con la concentración del analito [28, 29]. En el área medioambiental se han diseñado sensores colorimétricos y fluorométricos basados en MNPs para la detección de otros iones metálicos gracias a sus propiedades optoelectrónicas que dependen de su tamaño, la funcionalización de las nanopartículas ayuda a que el nanomaterial sea altamente específico para iones particulares [30, 31].

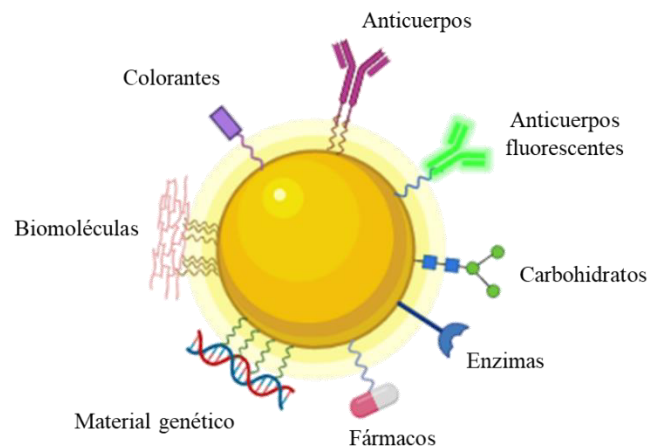


Figura 1.1.2. Ejemplos de funcionalización de la superficie de la nanopartícula.

1.1.2. Nanopartículas de oro

La historia de las nanopartículas de oro (AuNPs) se remonta a la época de los antiguos Romanos que usaban oro coloidal para teñir vidrio con fines decorativos. A partir de la década de 1850 inicia la era moderna del estudio de las AuNPs, cuando Michael Faraday comparte sus observaciones sobre las diferencias en las propiedades que tienen las soluciones de oro coloidal y el oro a granel [32].

Dentro de las ventajas que tienen las nanopartículas de oro es que son unas de las más estables y fáciles de manipular. Por su relativamente baja citotoxicidad suelen aplicarse en biomedicina, ya que la arquitectura de superficie puede ser altamente ajustable y multivalente ofrece el potencial para incorporar múltiples agentes terapéuticos, así como para atacar y proteger moléculas en la superficie de una sola nanopartícula, por lo que se espera que mejoren la entrega y la eficacia de las cargas útiles terapéuticas [33]. En la terapia fototérmica se aprovechan las propiedades ópticas de las AuNP, en la que un aumento de temperatura localizada induce una respuesta hipertérmica en el tejido objetivo. Las AuNPs convierten la luz en calor con alta eficiencia, y la longitud de onda de absorción se puede ajustar alterando la forma y el tamaño de las AuNPs [34]. La terapia fototérmica ofrece la ventaja de tener una alta absorción de la radiación del infrarrojo cercano, las AuNP pueden atacar tumores en tejidos profundos y pueden combinarse con terapia de liberación de fármacos.

La toxicidad de las AuNPs puede verse afectada por su forma, tamaño, sustancias químicas superficiales, carga y dosis. Se ha vuelto primordial evaluar el perfil *in vivo* de los nanomateriales antes de cualquier posible aplicación terapéutica [35]. Se han realizado estudios para evaluar la distribución y acumulación en el hígado y otros órganos. En un estudio en el que inyectaron nano-varillas de oro vía subcutánea reveló que la mayor parte permaneció el lugar de la inyección [36]. Sin embargo, los iones de oro liberados en el sistema produjeron daño oxidativo tisular en el sitio.

Por otra parte, Connor y colaboradores [4], realizaron una investigación sobre la absorción celular y la citotoxicidad de las AuNPs con células humanas, con el objetivo de determinar las interacciones de una serie de nanopartículas definidas que contienen una variedad de estabilizadores y modificadores de superficie con una línea celular de cáncer humano establecida. Dicho estudio sugiere que las AuNPs esféricas con una variedad de modificadores de superficie no son inherentemente tóxicas para las células humanas, a pesar de ser absorbidas por las células, aunque dejan a discusión probar con muchas otras variables y sobre los efectos a largo plazo en presencia de nanopartículas.

1.1.3. Etapas de formación de las nanopartículas de oro

La síntesis de AuNPs con reductores químicos fuertes suele llevarse a cabo de forma muy rápida, distinguiéndose dos etapas principales durante su formación. Una primera etapa en donde ocurre

la rápida reducción de los iones de oro a monómeros de Au^0 , con la formación de partículas primarias. En la segunda etapa las partículas primarias crecen debido a la coalescencia acompañada de una disminución del número de partículas.

Con el citrato de sodio, al ser un reductor menos fuerte, la reacción de formación de las AuNPs es lo suficientemente lenta para estudiar minuciosamente su mecanismo de formación. En el método de Turkevich [37] se proponía inicialmente un mecanismo de formación de las nanopartículas de oro coloidales que consistía de dos etapas, la nucleación seguida por el crecimiento. Trabajos posteriores [38, 39] sugieren una etapa intermedia de aglomeración previo a la etapa de crecimiento. Partiendo de la reacción del ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) con citrato de sodio para formar cloruro de oro y dicarboxiacetona, la dicarboxiacetona actuará como agente de nucleación organizando el cloruro de oro mientras se descompone en acetona. La etapa intermedia consiste en la formación de aglomerados, seguida del crecimiento de las nanopartículas hasta que el precursor sea completamente consumido.

Polte y col. [40] realizaron un estudio empleando radiación de sincrotrón usando las técnicas de small-angle X-ray scattering (SAXS) y X-ray absorption near edge spectroscopy (XANES) para monitorear directamente la reducción del precursor y la formación de nanopartículas. Distinguiendo en diferentes condiciones de temperatura y concentración de precursor tres fases principales. La primera fase consta de dos pasos iniciales, comenzando con un proceso rápido de nucleación en el que alrededor del 20 % del precursor de oro se transforma en núcleos o partículas durante los primeros 60 segundos de síntesis con radios de 2 nm y alta polidispersidad (**Figura 1.1.3 b**). Subsecuentemente, decrece el número de partículas, disminuye la polidispersidad y aumenta el tamaño de partícula, acompañado de un proceso de reducción lento (**Figura 1.1.3 c**), lo que sugiere que la coalescencia o la maduración de Ostwald son el mecanismo de crecimiento principal en esta fase. En la segunda fase (entre 25 y 50 minutos) el tamaño de partícula promedio es de 5 nm, la polidispersidad disminuye hasta 14 % mientras el número de partículas se mantiene casi constante, indicando que sucede un crecimiento por difusión. Como el proceso de reducción es lento, el precursor de oro se convierte en el factor limitante de crecimiento. Finalmente, en la fase 3 (después de 50 minutos) se consumen rápidamente las especies de Au(III) restantes, acompañada de un incremento en el tamaño de partícula (hasta 7.6 nm) y una disminución de la polidispersidad, atribuido a un

proceso de reducción autocatalítico en la superficie de las AuNPs formadas. En el mecanismo propuesto se ilustra en la **Figura 1.1.3 d**.

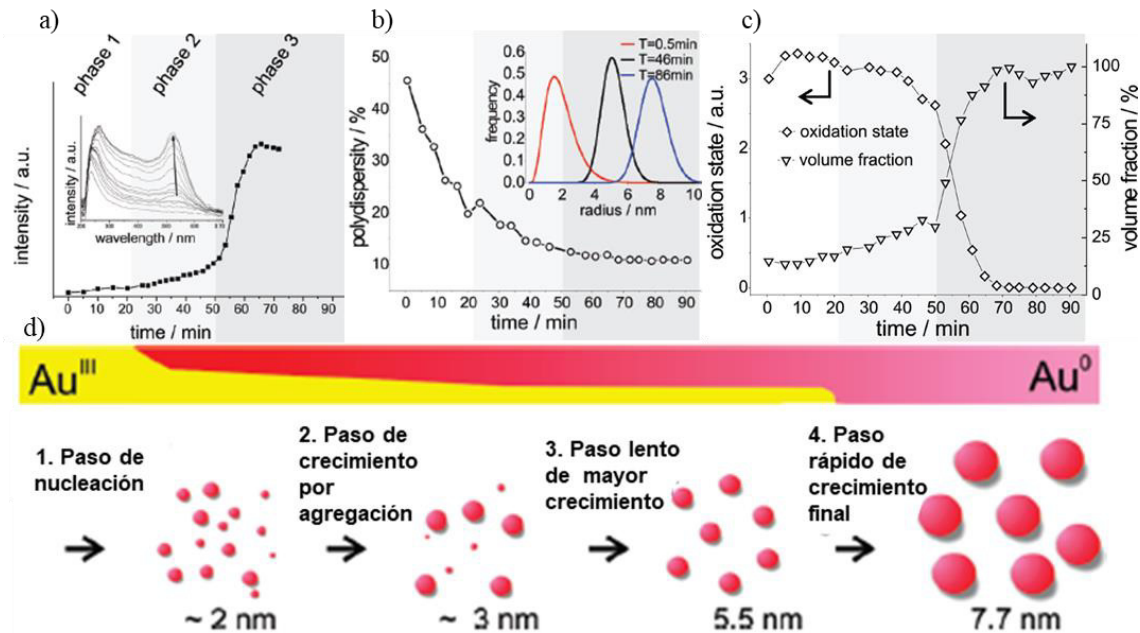


Figura 1.1.3. a) Espectros UV-vis registrados durante la formación de AuNPs (inserción) e intensidad de la banda SPR frente al tiempo. b) Radio de esfera medio y número normalizado de partículas representado frente al tiempo de reacción derivado de SAXS. c) Estado de oxidación formal promedio del oro derivado de espectros XANES normalizados representados frente al tiempo de reacción; fracción de volumen de partículas calculada a partir de datos SAXS. d) Ilustración esquemática del proceso deducido de formación de nanopartículas de oro. Adaptado de [40].

Observando la evolución de las nanopartículas mediante TEM y espectroscopía UV-vis, Ji y col. [41] sugieren que el citrato de sodio (NaCit) tiene un papel importante como mediador de pH, además de fungir como reductor y ligando de protección. Basan su estudio en el mecanismo propuesto por Frens (1973) donde se propone que el mecanismo de nucleación y crecimiento está regulado por la relación de NaCit como estabilizante del sistema, aumentando la velocidad de la reacción con el incremento de la concentración de citrato y, por consecuencia, se esperarían tamaños de partícula menores [42]. Sin embargo, encontraron que la relación de NaCit: H₂AuCl₄ incrementa el pH de la solución, cambiando la reactividad de los reactivos. Cuando el pH aumenta a más de 6.2 la reactividad de los iones de Au(III) disminuye, haciendo más lento el proceso de crecimiento y, por lo tanto, el tamaño final de los productos incrementa. Proponen que dependiendo del pH de la reacción los nanocristales de oro podrían formarse ya sea por una ruta de nucleación-crecimiento o bien, por una ruta de nucleación-agregación-crecimiento (cuando el pH de la solución está por debajo de 6.5) como se ilustra en la **Figura**

1.1.4 D. En la **Figura 1.1.4 A-B** presentan mediante TEM la evolución temporal del tamaño/forma de los nanocristales de oro formados en una reacción con proporción NaCit: HAuCl₄ 7:1 y 2:1. En la relación 7:1, se tiene un incremento de pH hasta 7.2, reflejando la disminución de la reactividad del sistema con el aumento del tiempo de formación, mientras que con la relación menor (2:1), la tasa de formación de los núcleos es considerablemente más rápida y la etapa de suavizado en la forma de los nanocristales se da entre 75 y 120 segundos. Comparando con la **Figura 1.1.4 C**, el sistema tiene una proporción NaCit: HAuCl₄ igual a **B**, pero un pH igual a **A**, aparentemente sigue la misma ruta de nucleación-crecimiento que **A**. Lo que los lleva a concluir que es posible sintetizar nanocristales de oro monodispersos con tamaños entre 20-40 nm variando el pH de la solución.

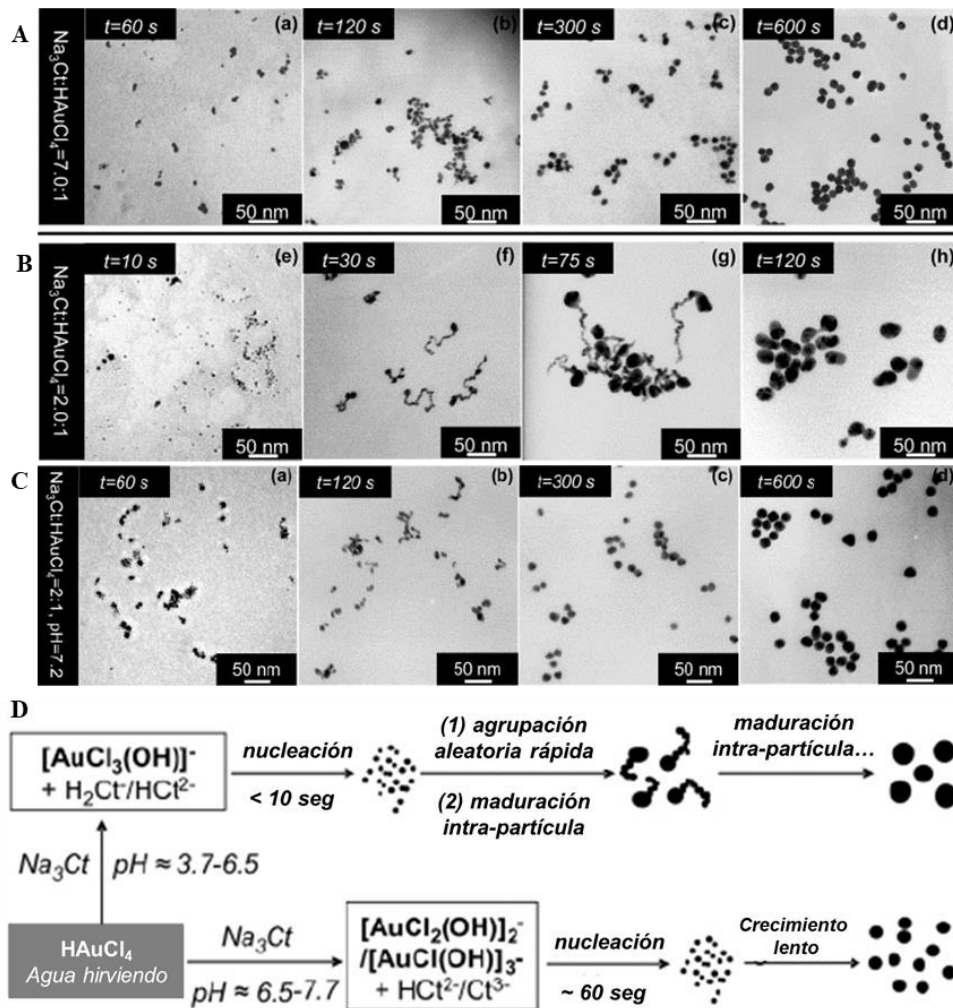


Figura 1.1.4. A-B) Evolución temporal del tamaño/forma de los nanocristales de oro formados en una reacción con proporción NaCit: HAuCl₄ 7:1 y 2:1, respectivamente. C) proporción NaCit: HAuCl₄ 2:1, ajustando el pH a 7.2. D) Ilustración esquemática de dos vías de reacción para la síntesis de nanocristales de oro por reducción de citrato. Adaptado de [41].

1.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Este tema trata algunas de las técnicas empleadas para la caracterización de nanopartículas metálicas, las cuales fueron utilizadas en el presente proyecto para caracterizar las nanopartículas obtenidas. La técnica sobre la que se fundamentó la mayor parte de la caracterización es la espectroscopía UV-vis, complementando las observaciones con dispersión de luz dinámica, potencial zeta y microscopía electrónica de barrido-transmisión. Micro-Raman fue una de las técnicas complementarias.

1.2.1. Resonancia de plasmón de superficie

Un plasmón superficial es un grupo de electrones que oscilan colectivamente cuando la luz incide sobre la superficie del metal, cuando los electrones oscilan a la misma frecuencia que la luz se dice que están en resonancia, y pueden absorber y dispersar la luz de manera que generan los colores característicos de las nanopartículas. El número de modos, así como su frecuencia y ancho, están determinados por la densidad de electrones, la masa efectiva, la forma de las partículas, el tamaño, la función dieléctrica y su entorno [3].

Efecto de la forma y el tamaño de la nanopartícula sobre SPR

En el caso de una esfera pequeña (< 40 nm), el desplazamiento de las cargas se realiza de forma homogénea. Estas cargas dan lugar a una sola resonancia propia, independiente de la dirección de la luz incidente, que está determinada únicamente por la forma y su densidad electrónica. Cuando el tamaño de la partícula aumenta, los efectos de la radiación se vuelven cada vez más importantes. El desplazamiento de la nube electrónica ya no es homogéneo incluso para partículas esféricas y se inducen distribuciones de carga multipolar elevadas [43].

Las nanopartículas metálicas con morfologías elipsoidales poseen tres resonancias de plasmón correspondientes a la oscilación de electrones a lo largo de los tres ejes de la elipse (**Figura 1.2.1**). La longitud de onda de resonancia depende de la orientación del campo eléctrico en relación con la partícula, al estar dispersas en una matriz el espectro de absorción será un promedio que contiene las tres resonancias de plasmones [44]. En el caso de nanopartículas cúbicas, se tienen seis principales bandas de resonancia de plasmones de superficie (SPRB), las primeras se encuentran ubicadas a 506 y 466 nm y corresponden a las distribuciones de carga

dipolar y cuadrupolar, respectivamente, y su amplitud es particularmente alta en las esquinas, los otros cuatro modos están en longitudes de onda más pequeñas y muestran distribuciones de carga multipolar más altas [3, 45]. Las MNPs pueden adquirir diversas formas poliédricas con caras y vértices bien definidos, como icosaedros (ICO), decaedros, cubos truncados (TC), cuboctaedro (CO), a las que se les asigna una relación general entre las SPRB y la morfología de la nanopartícula en cuanto a sus vértices y caras [46, 47]. En la **Figura 1.2.2** se presentan espectros de eficiencias de extinción en función de la longitud de onda para nanopartículas de plata con diferente morfología.

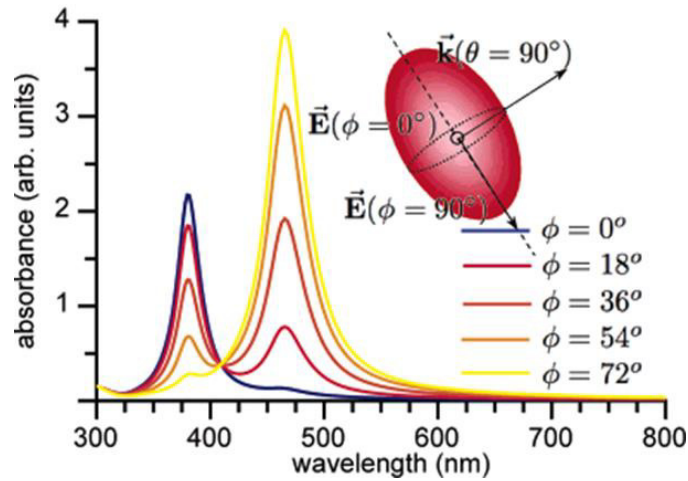


Figura 1.2.1. Espectros de absorción simulados para el campo electromagnético incidente a 90° y diferentes ángulos de polarización. Obtenido de [3].

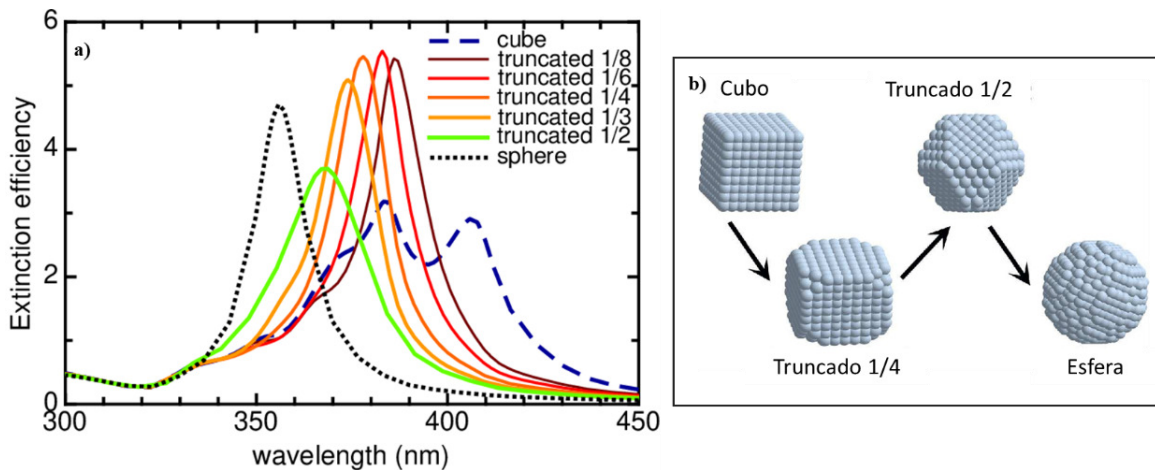


Figura 1.2.2. a) Eficiencias de extinción en función de la longitud de onda de la luz incidente de un cubo de plata, distintos cubos truncados y una nanopartícula esférica. b) Nanopartícula de cubo, y dos cubos truncados diferentes, y la esfera. Adaptados de [47].

SPR de las nanopartículas de oro

Las AuNPs, resuenan a frecuencias dentro del espectro visible de la luz, cuando estas son de tamaños más pequeños absorben y resuenan con longitudes de onda de luz púrpura, azul, verde y amarilla, por lo que el color que emiten es el rojo. En AuNPs esféricas un aumento de tamaño o una disminución de la distancia entre partículas puede inducir un desplazamiento hacia el rojo de la banda de absorción principal de oro y la intensidad de la banda aumenta con el tamaño de partícula, como se muestra en la **Figura 1.2.3**. El cambio en la coloración de las soluciones coloidales también es evidente variando desde rojizo a púrpura azulado (parte inferior de la figura), respecto al incremento en el tamaño de nanopartícula [48].

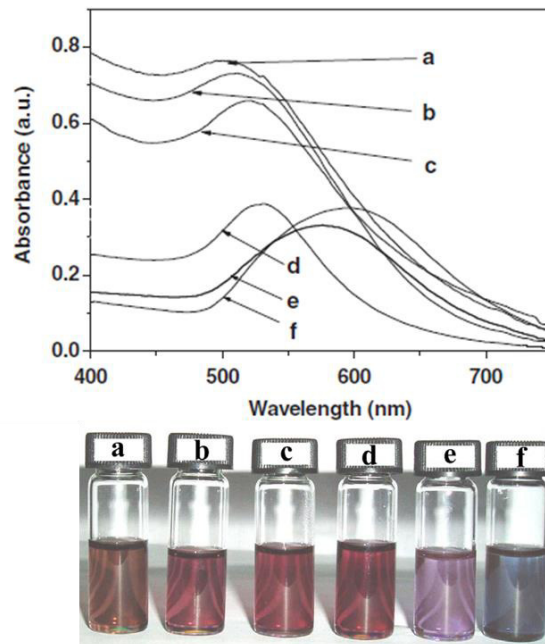


Figura 1.2.3. Espectros UV-vis de AuNPs: (a) 2.1 nm; (b) 4.6 nm; (c) 6nm; (d) 8.8 nm; (e) 11.4 nm; (f) 13.4 nm. Parte inferior, aspecto de las AuNPs. Adaptado de [48].

Otro aspecto importante del que también depende la SPR es la morfología de las AuNPs. Se pueden tener distintas coloraciones, debidas a la interacción de la superficie de las nanopartículas con la luz. Dreaden y col. [49] presentan algunos ejemplos de AuNPs que se aplican comúnmente en biomédica (**Figura 1.2.4**), evidenciando que la intensidad de color de las nanopartículas surge de la excitación colectiva de sus electrones de conducción, absorbiendo los fotones en diferentes longitudes de onda, resultando en los modos de la SPR. En el caso de las nano-varillas de oro (**Figura 1.2.4 a**), la oscilación de electrones puede ocurrir en dos

direcciones dependiendo de la polarización de la luz incidente [50]. La banda transversal, a lo largo del eje corto, se presenta en la región visible similar a las nanoesferas; mientras que la banda longitudinal, eje largo, es una banda mucho más fuerte a longitudes de onda mayores. Esta banda longitudinal se desplaza hacia el rojo desde la región visible hasta el infrarrojo cercano con una relación de aspecto (R) creciente (longitud/anchura). Cuando las nano-varillas se encuentran en solución acuosa, la absorción máxima es linealmente proporcional a R de acuerdo con la siguiente ecuación: $\lambda_{m\acute{a}x} = 95R + 420$.

La respuesta óptica de las nano-capas metálicas (**Figura 1.2.4 b**), determinada por la SPR, se controla de manera sensible por el tamaño relativo del diámetro del núcleo de las nanopartículas y el espesor de la capa [51].



Figura 1.2.4. Apariencia de distintas soluciones coloidales oro con diferente morfología variando a) la relación aspecto de las nano-varillas, b) el espesor de capa de las nano-capas y c) la concentración de oro en nano-jaulas. Adaptado de [49].

Las nano-jaulas de oro, que consisten en nanoestructuras plasmónicas huecas, tienen una resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) altamente sintonizable en las regiones visibles y del infrarrojo cercano. A medida que agregaron solución de HAuCl_4 al matraz de reacción de Ag, se observan una serie de cambios de color transitando por amarillo-rojo-púrpura-azul (**Figura 1.2.4 c**), una ventaja que puede usarse para estimar la posición del pico SPR para las nano-jaulas [52].

1.2.2. Dispersión de luz dinámica

Un análisis rápido y no destructivo para conocer el tamaño aproximado de las muestras es mediante la medida de su radio hidrodinámico (R_H). El radio hidrodinámico se define como el tamaño de una esfera que se mueve con el mismo coeficiente de difusión (D) que el dispersor y se calcula a partir de la relación de Stokes-Einstein [53]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (1.2-1)$$

Donde k_B es la constante de Boltzman ($1.38 \times 10^{-23} m^2 kg s^{-2} K^{-1}$), T es la temperatura en Kelvin y η es la viscosidad del solvente. Esta ecuación considera que las partículas son esféricas, si se tienen diferentes morfologías tiende a generar errores considerables en la medición.

Este coeficiente de difusión implica que las partículas suspendidas en un medio líquido están en constante movimiento debido al movimiento Browniano, que se define como el movimiento de las partículas debidas a las colisiones aleatorias con las moléculas del líquido que rodea la partícula. El proceso de dispersión de luz dinámica o DLS, por sus siglas en inglés (Dynamic Light Scattering), mide este movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas a partir de la **Ecuación** (1.2-1). En principio, cuando las partículas son iluminadas con un láser estas dispersan la luz en todas direcciones. Al estar en constante movimiento, la luz dispersada generará un patrón de manchas negras y blancas que cambiará con el tiempo. El equipo genera una función de correlación, en la que correlacionará las fluctuaciones que existen entre la intensidad de la señal en un punto específico con la misma señal medida en un intervalo muy corto de tiempo después, en el orden de microsegundos [54].

Las partículas más pequeñas logran moverse más rápidamente que las partículas más grandes, esto quiere decir que la fluctuación entre intervalos de tiempo será mayor y la función de autocorrelación decaerá más rápidamente. En el caso de las partículas más grandes con movimiento más lento, la función de correlación llegará a ser igual a cero después de un tiempo mayor. De tal manera que el coeficiente de difusión (D) se medirá a partir de la tasa de decaimiento (Γ) de la función de correlación (g) de la siguiente manera:

$$g(q, \tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad (1.2-2)$$

donde q es el vector de dispersión en el que se ha realizado la medición en un tiempo, τ , después. Teniendo que $\Gamma = Dq^2$.

La técnica presenta algunas limitaciones como la interferencia de partículas más grandes, por lo que las muestras deben estar completamente limpias y libres de pelusas u otros contaminantes. Se tendrán errores en la medición cuando la muestra tenga tendencia a la sedimentación. La muestra no debe absorber luz de la longitud de onda utilizada y se deben evitar soluciones muy coloridas o que presenten fluorescencia [54].

Cuando se desea conocer la distribución de tamaños por volumen o número, se debe conocer exactamente cuánta luz es dispersada por cada partícula. Para lograr predecirlo, la teoría de Mie requiere el índice de refracción (n) y la absorción de la partícula (k). Aunque para nanopartículas con diámetros menores a 100 nm, las propiedades del material no influyen y la distribución de volumen obtenida no cambiará significativamente. El valor de n y k reportados para nanopartículas de oro es de $n=0.2$ y $k=3.32$ para un láser de longitud de onda igual a 632 nm [55].

1.2.3. Potencial Zeta

El potencial electrocinético, mejor conocido como potencial zeta (ζ) es el potencial de una superficie cargada en el plano entre la partícula y la solución circundante a medida que la partícula y la solución se mueven entre sí [56]. Teóricamente, existe una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula compuesta por una región interna, llamada capa de Stern, donde los iones están fuertemente unidos y una región externa, difusa, donde están unidos con menos fuerza. La diferencia de potencial que existe en el enlace formado en el límite de la capa difusa entre los iones y la partícula (slipping plane) es precisamente el potencial ζ (**Figura 1.2.5 a**).

La movilidad electroforética (U_E) se obtiene mediante un experimento de electroforesis en la muestra en el cual se mide la velocidad de las partículas usando la técnica de velocimetría láser Doppler (**Figura 1.2.5 b**). Aplicando la ecuación de Henry (**Ecuación (1.2-3)**) se calcula el potencial ζ . Se deben conocer los parámetros de la constante dieléctrica (ϵ) y viscosidad (η) del medio.

$$U_E = \frac{2\varepsilon \zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (1.2-3)$$

El valor de la función de Henry, $f(\kappa a)$, dependerá del medio en el que se encuentren. Para partículas dispersadas en un medio acuoso se utiliza la aproximación de Smoluchowski con $f(\kappa a) = 1.5$ y para partículas pequeñas en un medio con constante dieléctrica baja o medios no acuosos se utiliza la aproximación de Huckel donde $f(\kappa a)$ es igual a la unidad [54].

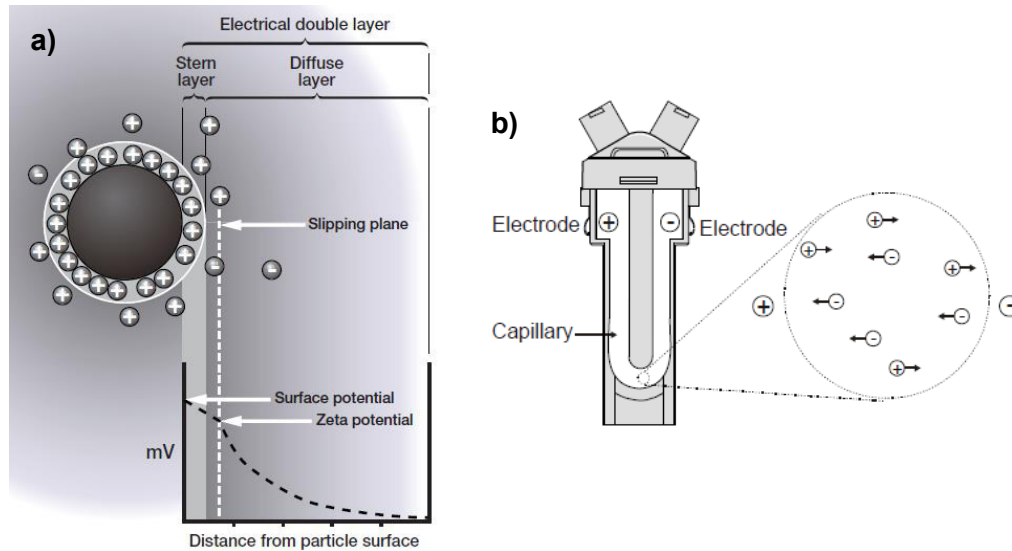


Figura 1.2.5. a) Configuración de la doble capa eléctrica entre una partícula y el fluido que la rodea. b) Principio de la celda utilizada para medir la movilidad electroforética. Adaptado de [54].

El potencial ζ es uno de los parámetros que afectan la estabilidad de las partículas en suspensión y muestras coloidales, su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones [57]. Un alto valor de potencial ζ , ya sea positivo o negativo, debería proporcionar suficiente energía repulsiva a las partículas para mantenerlas separadas y estables previniendo la floculación y agregación. Generalmente, este valor de estabilidad debe ser más positivo que + 30 mV o más negativo que -30 mV.

Para sistemas coloidales de nanopartículas de oro el potencial ζ depende de la carga de los grupos funcionales que se encuentren en la superficie de la nanopartícula [58], para AuNPs funcionalizadas con citrato se encuentra a valores negativos inferiores a -30 mV [59], del grado de agregación de las nanopartículas [60], y otros factores como la concentración de la solución coloidal dependerán más del principio del equipo [61].

1.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Existen diferentes técnicas microscópicas que permiten obtener imágenes de AuNPs que proporcionan información de su superficie, morfología, composición, funcionalización, cristalinidad, etc. Algunos ejemplos de estas técnicas son la microscopía óptica de campo oscuro, la microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica, microscopio de efecto túnel, microscopía óptica de barrido de campo cercano, entre otras. En este trabajo las AuNPs fueron analizadas mediante microscopía electrónica de barrido-transmisión (STEM).

Historia y fundamento

La microscopía electrónica parte de las hipótesis de Louis De Broglie sobre la naturaleza ondulatoria de las partículas, proponiendo que los electrones en movimiento presentan una longitud de onda más pequeña que la luz [62]. Esto hizo suponer que se podría lograr una mejor resolución al utilizar un haz de electrones que con el microscopio de luz, conduciendo a la creación del primer microscopio electrónico de transmisión, TEM (Transmisión Electron Microscope). El microscopio electrónico de barrido o SEM, por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscope) fue inventado en 1938 por Manfred von Ardenne, quien introdujo un sistema de barrido dentro del diseño de un TEM [63].

El principio de esta técnica se basa en la emisión de un haz de electrones desde un filamento y colimados en un haz, este haz se enfoca hacia la superficie de la muestra mediante un conjunto de lentes en la columna de electrones enfocados haciendo un barrido sobre la superficie de una muestra generando la emisión de electrones retrodispersados de alta energía y electrones secundarios de baja energía [64]. Dependiendo de la profundidad y tipo de interacción del haz de electrones con la muestra se producen diferentes tipos de señales que son información útil para procesar la imagen de la muestra [65]. Los electrones secundarios brindan información topológica de la muestra; los Electrones Auger sobre la composición atómica de la superficie; los electrones retrodispersados (SE) sobre el número atómico y diferencias de fase; los rayos-X característicos (EDX) sobre la composición atómica; la catodoluminiscencia, información sobre estados electrónicos. Los electrones transmitidos a través de la muestra brindan información morfológica. La dispersión elástica aporta al análisis estructural y la dispersión inelástica sobre la composición y estados de enlace. Un requisito para esta técnica es que la muestra sea eléctricamente conductora.

STEM

La técnica STEM opera de la misma manera que el SEM, con la diferencia de que las muestras analizadas deben tener un espesor delgado ya que los electrones dispersados serán analizados en modo de transmisión utilizando detectores diferentes que cubren una gran variedad de ángulos [66]. Otros detectores analíticos como EDX pueden ser sumamente útiles. Debido a que se tiene una mayor resolución, permite la caracterización de las nanopartículas en términos de tamaño, forma, defectos, estructuras cristalinas y composición.

1.2.5. Espectroscopía Raman

Cuando la luz interacciona con la materia pueden ocurrir diferentes fenómenos físicos y químicos, dentro de los cuales está la dispersión de la luz en diferentes direcciones. La mayor parte de la luz es dispersada elásticamente, esto quiere decir que conserva la misma longitud de onda después de interactuar con la materia. Sin embargo, una pequeña fracción de la luz es dispersada con una longitud de onda diferente, ya sea mayor (anti-Stokes) o menor (Stokes) que la longitud de onda de la luz incidente, este fenómeno se conoce como dispersión Raman. [67]

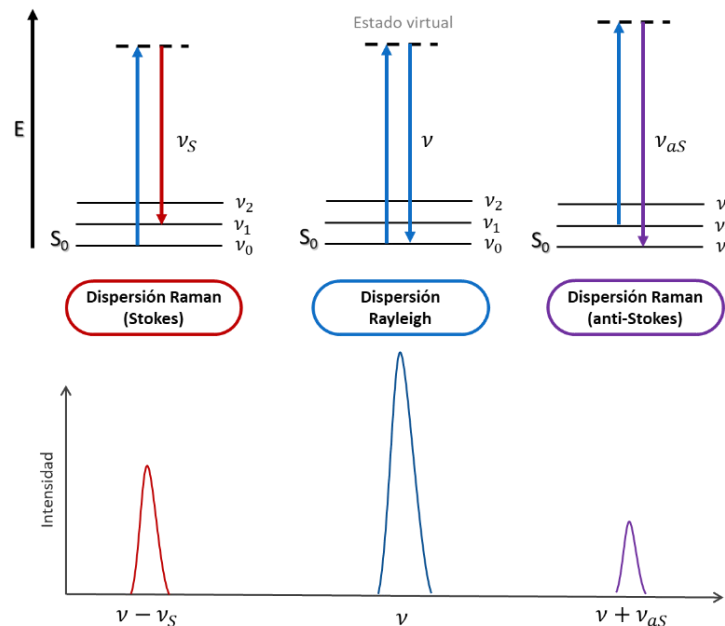


Figura 1.2.6. Comparación entre la dispersión Rayleigh, Raman Stokes y anti-Stokes, y sus desplazamientos.

En la **Figura 1.2.6** se presenta una comparación energética entre la dispersión Rayleigh y las dispersiones Raman. Cuando ocurre una dispersión Raman Stokes ocurre un

desplazamiento en la longitud de onda hacia el rojo, en un espectro el desplazamiento Raman se observaría en valores de número de onda mayores que cero, siendo $\bar{\nu} = 0$ el número de onda del haz de luz incidente. En cambio, en la dispersión Raman anti-Stokes, al tener una menor longitud de onda que el haz incidente, el número de onda sería menor que cero.

La espectroscopía Raman corresponde al tipo vibracional, basada en la interacción de la luz con los enlaces químicos de una sustancia. Proporciona información sobre la composición química de la muestra, su cristalinidad, polimorfismo y dinámica molecular. En las últimas décadas, la técnica se ha ido desarrollando hasta convertirse en una herramienta analítica muy importante debido a la sensibilidad molecular, fácil implementación y por la ventaja que tiene sobre la espectroscopía de absorción infrarroja que la presencia de agua y otros solventes polares impiden su aplicabilidad [68]. Sin embargo, al ser la dispersión Raman una interacción débil, las muestras no deben presentar fluorescencia ya que esta impedirá observar las señales Raman.

Los desplazamientos de las bandas o señales que se adquieren en un espectro Raman son únicos para ciertos grupos funcionales, de manera que se obtiene una huella dactilar para la sustancia a analizar [69].

En principio, un láser de luz monocromática (generalmente con longitud de onda en el rango visible o infrarrojo cercano) incide sobre la muestra y la energía dispersada se filtra de manera que la energía con longitud de onda igual a la energía incidente no pase hacia el detector. La energía filtrada es distribuida en función de longitudes de onda mediante una gradilla para que, al ser detectada cada longitud de onda, su intensidad sea cuantificada [67]. Los detectores comúnmente utilizados son los dispositivos de carga acoplada (CCD) por su alta sensibilidad a la luz [70].

En el caso de los equipos micro-Raman, se combina la microscopía de luz convencional con la espectroscopía Raman para realizar una identificación química única, vinculando la información espectral con la información espacial. Ya que la luz láser que se emplean en espectroscopía Raman están en el rango visible, pueden pasar libremente a través del vidrio de los lentes del microscopio [71]. Las muestras son colocadas en un portaobjetos y enfocadas con un microscopio, generalmente no requieren de preparaciones adicionales.

Es importante conseguir una resolución espectral adecuada para lograr observar con mejor detalle las bandas, de lo contrario estas se sumarían en bandas anchas. La nitidez con la que se observa el objeto influye en qué tan detallada se obtenga la información, esto quiere decir que se tenga una buena resolución espacial [71].

En el intento por incrementar la señal Raman de un experimento, por ejemplo, incrementando la potencia del láser o con objetivos de mayor aumento, suele conducir a consecuencias negativas, como el foto-blanqueo de la muestra. Colocar el analito sobre una superficie metálica rugosa puede proporcionar una mejora de órdenes de magnitud de la señal Raman medida, es decir, SERS [72]. El proceso SERS se puede explicar con dos mecanismos diferentes, uno de ellos solo es aplicable a moléculas específicas y consiste en la mejora química a través de la transferencia de carga entre una superficie metálica y el analito. Por otra parte, el mecanismo de mejora electromagnética es aplicable a todos los analitos y se genera por los plasmones superficiales localizados que concentran el campo eléctrico cerca de la superficie del metal en denominados “puntos calientes” [73]. Las MNPs suelen ser muy aplicables para esta técnica.

1.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Actualmente existen diversos métodos para la obtención de nanopartículas. Para realizar una revisión general de estos métodos, se pueden clasificar en dos grupos principales (**Figura 1.3.1**): métodos top-down y métodos bottom-up [5, 8]. En el primero se agrupan aquellos métodos que parten de partículas de tamaño macroscópico y mediante un tratamiento (generalmente, mediante procesos mecánicos o físicos) estas partículas se reducen hasta formar partículas de tamaño nanométrico. A estos métodos se les conoce como métodos de arriba hacia abajo (top-down). En la **Tabla 1.3-1** se muestran algunos ejemplos de técnicas top-down para la síntesis de nanopartículas metálicas. El segundo grupo, por el contrario, involucra aquellos métodos conocidos como de abajo hacia arriba (bottom-up), que consisten en la formación de nanopartículas a partir de la unión de átomos, moléculas o partículas de menor tamaño.

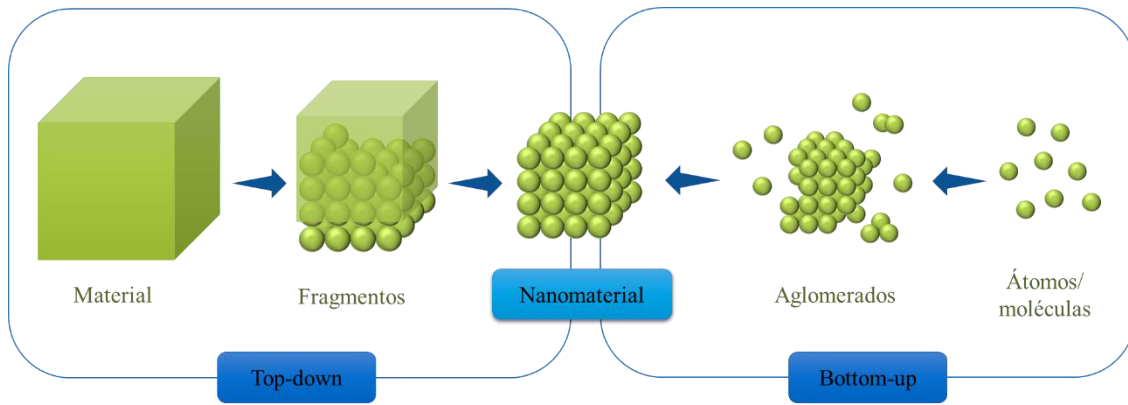


Figura 1.3.1. Esquema ilustrativo de los métodos de síntesis top-down y bottom-up.

Tabla 1.3-1. Métodos top-down para la síntesis de nanopartículas metálicas.

Método	Descripción
Molienda de bolas de alta energía	El material en polvo se introduce en un recipiente con bolas pesadas y mediante la aplicación de energía mecánica se reduce el tamaño de partícula [74].
Pulverización catódica de iones (ion sputtering)	Se induce la vaporización de un sólido mediante pulverización catódica. En el proceso los átomos metálicos pulverizados son bombardeados contra la superficie de un sustrato transmitiendo energía entre los átomos circundantes, lo que produce un calentamiento local cuando el sustrato es aislante. La temperatura elevada en la región confinada puede resultar en la fusión y la mezcla de átomos en el sustrato independientemente de sus propiedades termodinámicas [75].
Ablación láser	Las nanopartículas se forman durante la condensación de una columna de plasma producida por la ablación láser de una placa de metal grueso sumergido en una solución líquida [7]. Factores como el punto focal, la tasa de repetición y el tiempo de irradiación, pueden controlar el tamaño de partícula y la distribución del tamaño [34]. Se puede utilizar una gran variedad de disolventes, sin embargo, requiere alta energía y crecimiento poco controlado.

Los métodos bottom-up abarcan una gran variedad de técnicas desde síntesis química, procesos físicos, así como mecanismos biológicos; pueden realizarse en fase sólida, en fase gas o en medios líquidos. A continuación, se describirán algunos de los métodos de síntesis más comunes para la síntesis de nanopartículas metálicas siguiendo este mecanismo, con enfoque principal en las nanopartículas de oro.

1.3.1. Métodos químicos

La reducción química es un método frecuentemente utilizado para la síntesis de nanopartículas de metales nobles. En este método la sal del metal de interés se reduce mediante agentes químicos en un medio apropiado, suele llevarse a cabo en presencia de tensoactivos para estabilizar las nanopartículas formadas [5, 76]. Permite obtener dispersiones coloidales estables tanto en medio acuoso como en solventes orgánicos. Una adecuada elección del agente reductor puede otorgarle estabilidad y cierto grado de funcionalidad al metal [77].

El borohidruro de sodio (NaBH_4) es uno de los agentes químicos más empleados. Sin embargo, suele reemplazarse por citrato de sodio u otros agentes reductores, debido a la alta reactividad del borohidruro y a su inestabilidad en condiciones ambientales, que a su vez ocasiona problemas de reproducibilidad [78–80]. Dependiendo del agente reductor se pueden obtener tamaños de partículas variados. En el método del citrato, también conocido como el método de Turkevich [37], se obtienen tamaños de partícula entre 10 y 150 nm, sin embargo, suelen tener índices de polidispersidad de hasta 40 %, por ello factores como el pH y la relación de citrato:precursor deben ser controlados adecuadamente para la síntesis [41, 76]. Existen metodologías en las cuales introducen partículas semilla además del precursor metálico para promover el rápido crecimiento de las nanopartículas y de esta manera obtener nanopartículas monodispersas, de menor tamaño y con morfología ajustable [78].

Alternativamente, se ha recurrido empleo de otro tipo de agentes reductores y estabilizantes como ácido cítrico, quitosano o alginato [81–83], con el fin de que los productos sean menos tóxicos y/o biocompatibles para ser aplicados en medicina como biosensores, sistemas de liberación de fármacos, tratamientos entre otros.

1.3.2. Métodos de síntesis inducidos por distintas fuentes de radiación

Con el propósito de eliminar o disminuir la concentración de reductores químicos, se han desarrollado métodos de síntesis inducidos por radiación de alta energía como la radiación gamma o ultravioleta y de baja energía como la activación con luz visible o microondas. Estas fuentes de energía ayudan catalizando la reducción de los iones metálicos

La síntesis de nanopartículas de oro bajo irradiación ultravioleta, generalmente se apoya de surfactantes catiónicos, Shang y col. [84] lograron fotogenerar nanopartículas de tamaños

menores de 10 nm bajo luz visible utilizando NaBH_4 probando la estabilización con diferentes tensoactivos. Siguiendo un método fotoquímico de un solo paso [85] sintetizaron materiales híbridos de nanopartículas metálicas soportadas en óxido de grafeno. Usando radiación gamma, Tue Anh y col. [83] obtuvieron nanopartículas de Au empleando alginato como agente estabilizador. Como se ha revisado, este tipo de métodos utilizan una combinación de técnicas para mejorar los rendimientos de reacción o controlar de mejor manera las morfologías y tamaños de las nanopartículas. Mihaly y col. [86] utilizaron un método de microemulsión asistido por fotorreducción en el cual las microemulsiones actúan como plantillas que permiten controlar el tamaño de partícula, mientras aprovechan una fuente de luz como herramienta eficaz para la reducción de cationes metálicos.

Aunque es menos común que los métodos que emplean alguna fuente de luz, la síntesis asistida por microondas es una técnica rápida, sencilla y energéticamente eficiente, suele preferirse sobre aquellos métodos que requieren calentamiento térmico. En estas técnicas, los reactivos absorben la energía de microondas provocando el movimiento de las moléculas, el cual se traducirá en calor, esto promueve la descomposición de los precursores creando soluciones altamente sobresaturadas donde puede ocurrir el proceso de nucleación y crecimiento de las nanopartículas de interés [87]. En este tipo de metodologías también se requiere el uso de agentes estabilizantes y de algún agente reductor a bajas concentraciones, sin embargo, la ventaja es que se genera un calentamiento interno rápido y uniforme de la solución mejorando la velocidad de reacción [88].

1.3.3. Métodos electroquímicos

El hablar de síntesis de nanopartículas metálicas sugiere que al menos una reacción de óxido-reducción está involucrada en el proceso de síntesis. Por consiguiente, métodos electroquímicos para obtener este tipo de materiales no podrían faltar.

X.Y. Liu y col. [89] sintetizaron nanopartículas de oro de diferentes morfologías siguiendo una ruta electroquímica, encontraron que la forma de las nanopartículas y su tamaño variaban de nanopartículas esféricas a partículas más grandes de tipo placa al usar un catolito y un anolito como agentes reductores. Siguiendo cinéticas más rápidas en la región catódica que en la anódica, se obtuvieron nanopartículas mejor definidas en la solución del catolito y estructuras anisotrópicas en el anolito.

En otros trabajos es común encontrar este tipo de síntesis para la fabricación de nanocompositos, como en el caso de Li y col. [90] donde lograron sintetizar un material compuesto de hojas de grafeno y nanopartículas de oro mediante un proceso de reducción electroquímica obteniendo alta dispersión de oro sobre la superficie de las hojas de grafeno y con diámetros de aproximadamente 40-50 nm.

1.3.4. Métodos de ultrasonido

Las técnicas de síntesis asistida por ultrasonido incluyen dos métodos principales, la síntesis sonoquímica y la pirólisis por pulverización ultrasónica [5], ya que los segundos pertenecen al enfoque top-down se ejemplificará únicamente al primero de ellos.

En el método sonoquímico, también conocido como método ecoquímico, la cavitación acústica es la característica principal de este método. Ultrasonidos de alta intensidad provocan la formación y crecimiento de burbujas, que al colapsarse liberan la energía ultrasónica contenida ocasionando la emisión de luz o sonoluminiscencia actuando como un microrreactor químico de plasma altamente energético. Guo Hai Yang y col. [91] trabajaron en la fabricación de nanocompositos de hojas de nitruro de boro con nanopartículas de oro mediante una ruta sonoquímica simple; inicialmente dispersaron el nitruro de boro en agua desionizada en un sonicador, después se agrega una solución con el precursor de oro y se expuso a irradiación ultrasónica de alta intensidad hasta su reducción sobre las estructuras de nitruro de boro.

1.3.5. Métodos biológicos

La reducción de nanopartículas metálicas también se puede llevar a cabo mediante procesos bioinspirados que siguen las características de la química verde, empleando microorganismos y sus enzimas o plantas como agentes reductores. Estos procesos parten de la ideología de la química verde que se basa en el diseño de estrategias que permitan solucionar parte de las desventajas de la reducción química u otras metodologías que involucran el uso de sustancias tóxicas y la generación de desechos peligrosos, además, que permitan disminuir los costos de fabricación mediante el desarrollo de rutas de producción energéticamente eficientes [6].

Los métodos biológicos ayudan a producir nanomateriales no-tóxicos o de baja toxicidad y a generar biocompatibilidad para poder emplearlos en áreas como la medicina o la biotecnología [7]. La obtención de materiales biogénicos obtenidos por este tipo de

metodologías emplea mediadores como lo son extractos de plantas o sus productos aislados (siendo la fuente más común), algas u otros microorganismos como bacterias, hongos y levaduras [8].

Las técnicas que utilizan bacterias pueden seguir rutas tanto extracelulares como intracelulares. Dependiendo del microorganismo empleado los iones metálicos serán transformados por diferentes agentes presentes en la célula. Un mecanismo propuesto para la síntesis de nanopartículas de oro involucra la liberación extracelular de cofactores como NADH o bien, enzimas reductoras dependientes de NADH, donde un electrón de NADH se transfiere a través de la reductasa dependiente de NADH que funge como un portador de electrones hacia los iones de oro hasta reducirlos a oro elemental [92]. Otro mecanismo propuesto para la obtención de nanopartículas de plata empleando *Pseudomonas aeruginosa* [93] revela la asistencia de nitrato reductasa en el proceso de reducción. Aunque también pueden participar biomoléculas como proteínas en estos mecanismos como agentes reductores. Los mecanismos de síntesis con hongos son similares a los propuestos para las bacterias, donde la reducción de los iones metálicos va acompañada de la oxidación de una enzima o una proteína, con la ventaja de que los hongos tienen una mayor producción de proteínas [94]. Kumar y col. [95] reportaron la síntesis extracelular de nanopartículas de oro con el hongo *Helminthosporium solani*, obteniendo morfologías variadas (de tipo vara, estrella, triángulo y piramidales) en el rango de 2 a 70 nm con alta polidispersidad.

Sin embargo, los métodos que involucran microorganismos involucran ciertos riesgos de seguridad, requiriendo alto control sobre las condiciones de los cultivos y, aunque otorgan la posibilidad de escalar los métodos para la producción de nanopartículas en mayor cantidad, suelen tener bajo control sobre el tamaño de partícula [94].

Por otra parte, se encuentran los métodos que utilizan plantas. Este tipo de síntesis son más seguros para la salud, altamente efectivos y pueden llevarse a cabo requiriendo mínimo de energía, además de tener una basta disponibilidad [7].

1.3.5.1. Síntesis de nanopartículas utilizando extractos naturales

Como se ha revisado previamente los métodos de síntesis que involucran extractos naturales son los métodos más estudiados de los distintos métodos biológicos debido al bajo su costo y que,

a partir de fuentes naturales renovables, se pueden sintetizar nanomateriales en condiciones limpias y en periodos de tiempo reducidos. Además, no es necesario tener un delicado control de los agentes reductores como es el caso de los métodos que involucran microorganismos.

Una gran variedad de plantas se ha probado para sintetizar nanopartículas de metales nobles. Extractos de diferentes partes de la planta (tallo, raíz, hojas o flores), o bien, las plantas vivas en crecimiento pueden ser usados para estos fines ya que poseen una amplia variedad de metabolitos que pueden ayudar en la reducción de los iones metálicos [94]. Los extractos de plantas pueden desempeñar el rol tanto de agentes reductores como estabilizadores en la síntesis de nanopartículas, recubriendo la superficie exterior de las nanopartículas para evitar la aglomeración. Los grupos unidos a la superficie de las NPs también ayudan a dispersarlas en soluciones acuosas, a resistir la adsorción no específica de las moléculas circundantes y proporcionar puntos de conjugación para biomoléculas funcionales [96].

De forma general, el poder reductor que poseen los extractos de las plantas se atribuye a biomoléculas como polifenoles, flavonoides, azúcares reductores, polisacáridos, alcaloides, aminoácidos, vitaminas, cetonas, fenoles y proteínas. Las técnicas de preparación pueden seguir metodologías por vía húmeda o puede llevarse a cabo la preparación *in vivo*, en estos últimos, la planta entera es usada como una fábrica biológica de nanopartículas metálicas [96].

En un trabajo realizado por Md N. Alam y col. [97] emplearon extracto acuoso de hojas de *Murraya koenigii* Spreng, una planta nativa de la India también conocida como árbol del curry, para la obtención de AuNPs. Variaron distintos parámetros en las condiciones de síntesis para estudiar su efecto en la morfología y tamaño de las nanopartículas obtenidas. Encontraron que al disminuir la concentración del extracto, la tasa de formación de las AuNPs se redujo drásticamente; con el aumento en la concentración de iones Au(III), aumentó la tasa de formación hasta una concentración óptima de iones de Au(III) igual a 0.5 mM, jugando también un papel importante en el control de la morfología de las AuNPs sintetizadas; la temperatura afectó principalmente en el control de la forma y el tamaño de las nanopartículas de oro y; finalmente, observaron un notorio cambio en la morfología de las nanopartículas con el cambio en el pH, obteniendo un resultado óptimo a pH 7 y por debajo de pH 5, no lograron sintetizarse AuNPs.

Con la finalidad de aplicar las AuNPs en la administración de doxorrubicina a células cancerosas humanas usando ácido fólico como receptor, Yallappa y col. sintetizaron AuNPs utilizando como biorreductor el extracto de hojas de *Mappia foetida* [98]. La preparación del extracto fue en medio acuoso bajo irradiación de microondas durante unos 180 s para extraer los fitoquímicos presentes en las hojas. Obtuvieron AuNPs esféricas con diámetros entre 20-50 nm, recubiertas por una biocapa del extracto que fungió como un bio-enlazador natural para la posterior conjugación con ácido fólico y doxorrubicina, los cuales se conjugaron de manera efectiva. Sus estudios demostraron que el complejo de AuNP-fármacos presenta baja toxicidad para las células epiteliales normales y alta toxicidad para las células cancerosas humanas.

1.4. CHAYA MAYA

La planta *Cnidoscolus chayamansa*, popularmente conocida como Chaya maya o simplemente Chaya, se ha propuesto como candidata para la reducción de iones de oro debido a que es una planta nativa de México y algunas zonas de Centroamérica, con relevancia histórica en la Península de Yucatán donde hasta ahora forma parte de la dieta tradicional [10]. La Chaya puede crecer en una gran variedad de suelos, en climas cálidos y lluviosos, así como en áreas de sequía ocasional, creciendo más rápidamente a temperaturas más altas [99, 100], por lo que puede considerarse un recurso renovable. Otra razón fundamental para emplear esta planta se debe al alto aporte nutrimental que posee [102], el cual puede ser comparado con el contenido nutrimental de la espinaca (**Tabla 1.4-1**).

Tabla 1.4-1. Comparación de composiciones nutricionales de hojas de chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaughn) y espinacas (*Spinacia oleraceae* L.) por 100 g de peso fresco. Obtenida de [99].

Componente	Chaya	Espinaca
Agua (%)	85.3	90.7
Proteína (%)	5.7	3.2
Lípidos (%)	0.4	0.3
Fibra (%)	1.9	0.9
Calcio (mg/100 g)	199.4	101.3
Fósforo (mg/100g)	39.0	30.0
Potasio (mg/100 g)	217.2	146.5
Hierro (mg/100 g)	11.4	5.7
Ácido ascórbico (mg/100 g)	164.7	48.1

Antes de continuar con la descripción del perfil fitoquímico de la Chaya maya, es conveniente mencionar que del género *Cnidoscolus* se han distinguido cinco diferentes especies, dos de las cuales son cultivadas y que son consideradas como comestibles, *C. chayamansa* y *C.*

aconitifolius. Las otras tres son especies silvestres: *C. multilobus*, *C. souzae* y *C. urens*. La clasificación botánica de la planta de chaya empleada en este trabajo se detalla a continuación.

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Orden: *Malpighiales* Juss. Ex Bercht & J. Presl

Familia: *Euphorbiaceae* Juss

Subfamilia: *Crotonoideae*

Tribu: *Manihoteae*

Género: *Cnidoscolus*

Especie: *Cnidoscolus chayamansa* (Mill.) I.M. Johnst. (1923)

Sinónimo: *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh (1944), *Cnidoscolus chaya* Lundell.

En la **Figura 1.4.1** se presentan cuatro diferentes variedades de chaya comúnmente cultivadas en Yucatán, las llamadas estrella y picuda son variedades de *C. aconitifolius*, las variedades chayamansa y redonda pertenecientes a *C. chayamansa* [103].

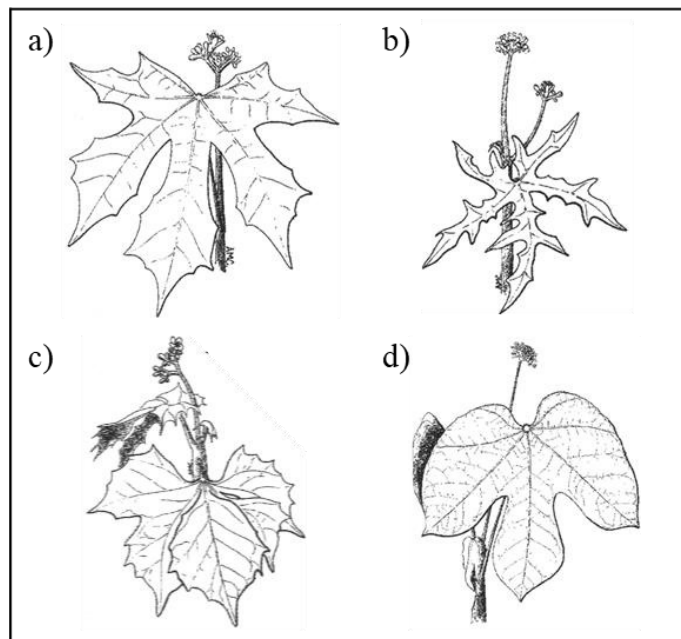


Figura 1.4.1. Variedades de chaya a) estrella, b) picuda, c) chayamansa y d) redonda. Adaptado de [103].

El perfil fitoquímico de la chaya está comprendido principalmente por ácidos fenólicos, flavonoides, algunas saponinas y alcaloides. Según la variedad de chaya y el tipo de solvente usado para la extracción, el perfil fenólico y el poder reductor del extracto cambiará [11, 104]. Algunos de los ácidos fenólicos comúnmente encontrados en extractos acuosos de hojas de *C. chayamansa* son el ácido clorogénico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido 4-hidroxibenzóico, entre otros (**Figura 1.4.2**) [11, 105].

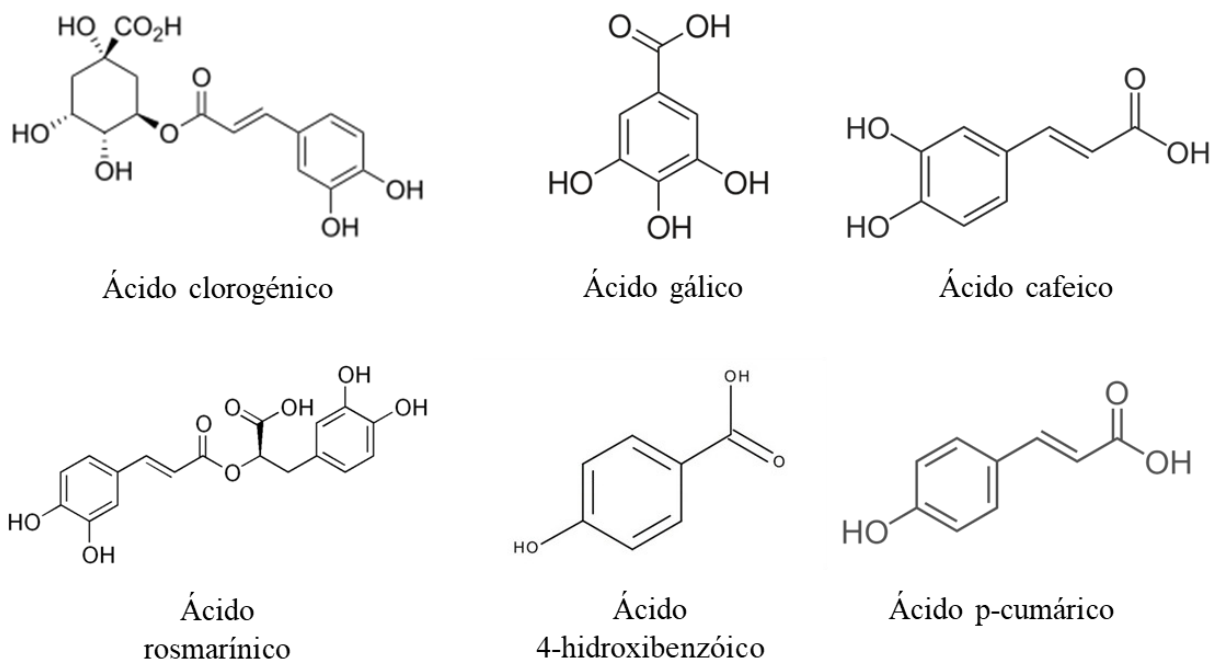


Figura 1.4.2. Estructuras químicas de los ácidos fenólicos comúnmente encontrados en extractos acuosos de hojas de *C. chayamansa*.

Compuestos flavonoides como, catequina, rutina, quercetina, hesperidina, kaemferol, epigallocatequin galato, etc. han sido reportados en extractos acuosos de hojas de Chaya maya (**Figura 1.4.3**). [100, 106, 107]

Se advierte que las hojas de Chaya tienen una cantidad indeterminada de glucósidos cianogénicos. Sin embargo, la cocción y otros tratamientos térmicos ayudan a hidrolizar este tipo de glucósidos, minimizando el riesgo de intoxicación [108].

Estudios preliminares con infusiones de chaya, sugieren que tiene un gran potencial como posible agente dietético preventivo contra algunas enfermedades cancerígenas [12], también se han evaluado diferentes extractos de chaya como agente antitumoral y antimutagénico [104]. El extracto acuoso de hojas de *C. chayamansa* ha revelado efectos

hipoglucémicos y efectos hipolipidémicos en ratas con diabetes inducida [107]. Otros estudios han evaluado la posibilidad de emplear extractos etanólicos de *C. aconitifolius*, en ratas con sobredosis de paracetamol para prevenir el daño hepático causado por este fármaco, observando efectos protectores significativos con dosis iguales a $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [109]. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que extractos de *C. chayamansa* en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ poseen efectos antiinflamatorios significativos y buen efecto hepatoprotector usando modelos crónicos [13].

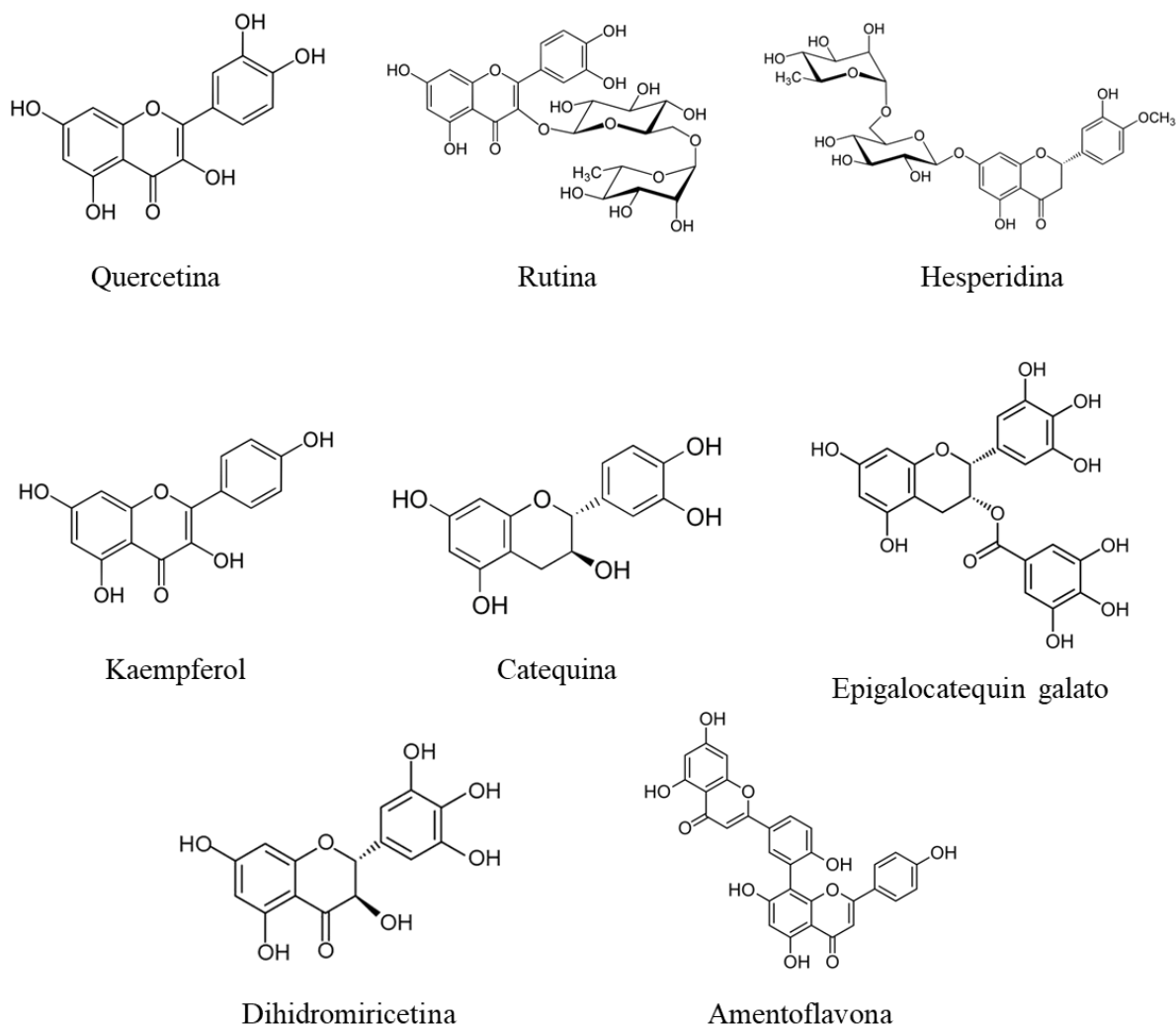


Figura 1.4.3. Estructuras químicas de algunos de los compuestos flavonoides reportados en extractos acuosos de hojas de *C. chayamansa*.

1.5. SISTEMAS MICROEMULSIONADOS Y NANO-EMULSIONADOS COMO NANO-REACTORES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

En este tema se introducirá el concepto de emulsión y sus generalidades, así como la subclasificación de nano-emulsiones, con el propósito de contrastar las características de lo que es una microemulsión y, finalmente, las ventajas que tienen los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados como nano-reactores para la síntesis de nanopartículas.

1.5.1. Emulsiones

Las soluciones, los coloides y las suspensiones son tipos de mezclas que se diferencian principalmente por el tamaño de las moléculas o partículas que los conforman [110]. Una solución verdadera es una mezcla homogénea en la que el soluto se disuelve de tal manera que no logra distinguirse a simple vista ni mediante un microscopio óptico. Las soluciones verdaderas no pueden separarse por métodos de separación simples y las dimensiones del soluto deben ser inferiores a 1 nm. Por el contrario, una suspensión es una mezcla homogénea en la que se pueden distinguir a simple vista los componentes que la conforman, el soluto tiene tamaños mayores a 1000 nm. En este tipo de mezclas, la gravedad puede inducir la sedimentación de las partículas suspendidas.

Los coloides son un tipo de mezclas intermedias entre solución y suspensión, distinguiéndose una fase dispersa y una fase dispersante. Teniendo pequeñas partículas, gotitas o burbujas con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm, se dispersan en una segunda fase [111]. El estado físico de una o ambas fases puede ser sólido, líquido, gaseoso o supercrítico y, de acuerdo con el estado físico en que se presenten sus componentes, las dispersiones coloidales pueden ser clasificadas como se muestra en la **Tabla 1.5-1**. En la vida cotidiana, están presentes a nuestro alrededor productos coloidales naturales y sintéticos, lo que evidencia su importancia en una amplia variedad de disciplinas e industrias.

Las dispersiones coloidales en las que se dispersa un líquido inmisible en una fase líquida continua en forma de gotitas se conocen como emulsiones. Estas gotitas a veces suelen sobrepasar el límite coloidal hasta decenas o cientos de micrómetros. Por la naturaleza de los líquidos se suelen distinguir una fase acuosa (polar) y una fase oleosa o aceite (apolar). Según sea el tipo de líquido que forme la fase continua se pueden tener emulsiones formadas por agua

dispersa en una fase oleosa, W/O (water-in-oil) o gotas de aceite dispersas en fase acuosa, O/W (oil-in-water).

Tabla 1.5-1. Tipos de dispersiones coloidales y ejemplos.

Fase dispersa	Medio dispersante	Nombre	Ejemplos
Líquido	Gas	Aerosol líquido	Niebla, spray en aerosol
Sólido	Gas	Aerosol sólido	Humo, contaminantes del aire
Gas	Líquido	Espuma	Crema batida, agua gasificada
Líquido	Líquido	<i>Emulsión</i>	Leche, mayonesa, cremas
Sólido	Líquido	Sol	Pinturas, tintas, fluidos celulares
Gas	Sólido	Espuma sólida	Piedra pómez, esponjas
Líquido	Sólido	Emulsión sólida, gel	Mantequilla, queso, gelatinas
Sólido	Sólido	Suspensión sólida	Perlas, vidrios coloreados, gemas

Pueden generarse emulsiones dobles, conformadas por gotitas de aceite dispersas en gotitas acuosas que a su vez están dispersas en una fase continua de aceite (O/W/O), o bien, por gotitas de agua en gotitas de aceite que están dispersas en agua (W/O/W). Este tipo de emulsiones dobles suelen tener gotitas con diámetros de decenas de milímetros conteniendo varias decenas de gotitas en la fase más interna. Un ejemplo de su aplicación es como sistemas de extracción y recuperación de contaminantes, también conocidos como membranas líquidas emulsionadas [112].

Existen diversos métodos para la formación de emulsiones, dependiendo de la naturaleza química de los componentes del sistema, así como su proporción y temperatura pueden generarse la emulsificación por inversión de fases o por emulsificación espontánea. La emulsificación física por ruptura de gota depende de la naturaleza mecánica del proceso (por ejemplo, cantidad y forma de aporte de energía), así como de las propiedades reológicas y

químicas de los componentes. En la **Tabla 1.5-2** se presentan algunos métodos mecánicos de emulsificación presentados en [113].

Tabla 1.5-2. Métodos mecánicos de emulsificación.

Método		Energía suministrada			Proceso		Formación de las gotas		
		L	M	H	B	C	T	V	A
Sacudida		✓			✓		✓		
Agitación	Simple	✓			✓	✓	✓	✓	
	Rotor-estator		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	Vibrador	✓			✓	✓	✓	✓	
	Raspador	✓	✓		✓	✓		✓	
Fluj _o	Laminar	✓	✓			✓		✓	
	Turbulento	✓	✓			✓	✓		
Molin _o	Coloide		✓	✓		✓		✓	
	Bolas y rodillos		✓		✓	✓		✓	
Homogeneizador				✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ultrasónico			✓	✓	✓	✓	✓		✓
Inyección		✓			✓	✓	✓	✓	
Eléctrico			✓		✓	✓			
Condensación		✓	✓		✓	✓			
Aerosol a líquido		✓	✓		✓	✓			

L: bajo, M: medio, H: alto, B: batch, C: continuo, T: turbulencia, V: fuerzas viscosas en flujo laminar, A: cavitación

La estabilidad de una emulsión se puede mejorar con la presencia de iones y sales adsorbidos no superficialmente activos (estabilizan débilmente). Mediante la inclusión de soles coloidales que pueden ser mojados por ambas fases de la emulsión ayudan a prevenir la coalescencia formando una barrera mecánica entre las gotas. O con aditivos como moléculas de polímero y/o moléculas de surfactante adsorbidas interfacialmente son los mecanismos más comunes para estabilizar una emulsión. [113]

El mecanismo de formación de una emulsión implica que uno de los dos líquidos se descompone en partículas que se dispersan en el segundo líquido, incrementando así el área interfacial. Al ser inmiscibles entre sí, la tensión interfacial entre ambos líquidos puros siempre es mayor que cero, por lo que se tiene un aumento considerable en la energía libre interfacial del sistema y como consecuencia una gran inestabilidad termodinámica. Por esta razón se

requiere de un agente emulsionante para estabilizar el sistema y pueda ser formada la emulsión, la cual será estable por un determinado tiempo. El emulsionante se orienta de tal manera que forma una película interfacial que ayuda a reducir la tensión interfacial y forma una barrera mecánica, estérica o iónica a su alrededor para evitar la coalescencia. [56]

Como se describió anteriormente, los sistemas emulsionados generalmente poseen una estabilidad mínima, reflejada en el tiempo en el que ocurre la separación de fases. La inestabilidad de las emulsiones puede ser ocasionada por diferentes fenómenos físicos, algunos de los cuales serán descritos brevemente en la **Figura 1.5.1**.

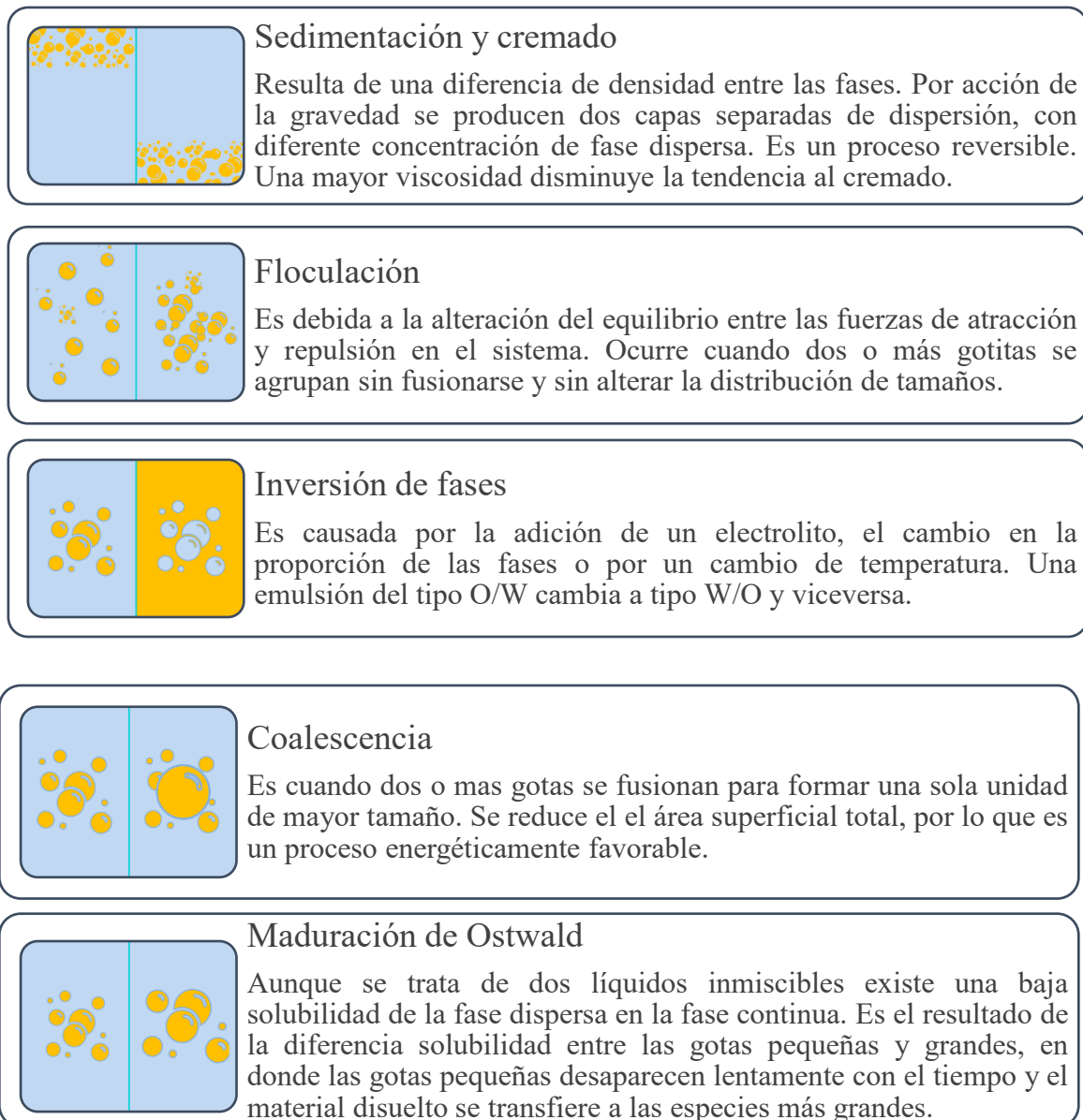


Figura 1.5.1. Fenómenos físicos que desestabilizan una emulsión.

Las aplicaciones de las emulsiones abarcan desde la formulación de productos alimenticios, cosméticos y del cuidado personal, en la industria del petróleo, remediación ambiental, en agricultura, pinturas, métodos de polimerización, hasta sistemas para la liberación de fármacos. [114–117]

1.5.1.1. Nano-emulsiones

Las nano-emulsiones, también conocidas como miniemulsiones o emulsiones ultrafinas, son una clase particular de emulsiones que se caracterizan por tener un tamaño de gota en el rango de los 20 a 200 nm. Las gotitas tan pequeñas le otorgan cierta estabilidad cinética, además de que le confieren una apariencia opalescente, traslúcida o transparente, a diferencia de una emulsión convencional que tiene apariencia opaca [16].

Debido a que las nano-emulsiones son sistemas fuera del equilibrio no pueden ser formadas espontáneamente. Por lo tanto, requieren de algún tipo de energía para ser formadas ya sea energía mecánica o a partir del potencial químico del mismo sistema. Los métodos que suministran energía mecánica al sistema, o métodos de alta energía, forman las gotitas de la nano-emulsión mediante el uso de dispositivos mecánicos que generan intensas fuerzas disruptivas que rompen las fases de aceite y agua. El método de inversión de fase por temperatura (PIT) y el de inversión de fase por composición (PIC) son métodos de baja energía en los cuales ocurre un cambio en la curvatura del surfactante al cambiar la temperatura o la composición del sistema, respectivamente [118]. En el cuadro sinóptico que se presenta a continuación se clasifican y mencionan algunas características de los métodos de formación de nano-emulsión.

La estabilidad de una nano-emulsión ante la sedimentación y el cremado es conferida por el pequeño tamaño de las gotas. Esto es debido a que la velocidad de difusión de las gotitas, de acuerdo con el movimiento Browniano, es mayor que la velocidad de sedimentación o cremado, que son inducidos por la fuerza de gravedad. La presión de Laplace previene que por causas de deformación de las gotas se adhieran unas a otras, aunque el movimiento Browniano podría producir cierta deformación por los choques entre las moléculas. El surfactante adsorbido en la interfase forma una delgada película interfacial que ayuda a prevenir la coalescencia [119].

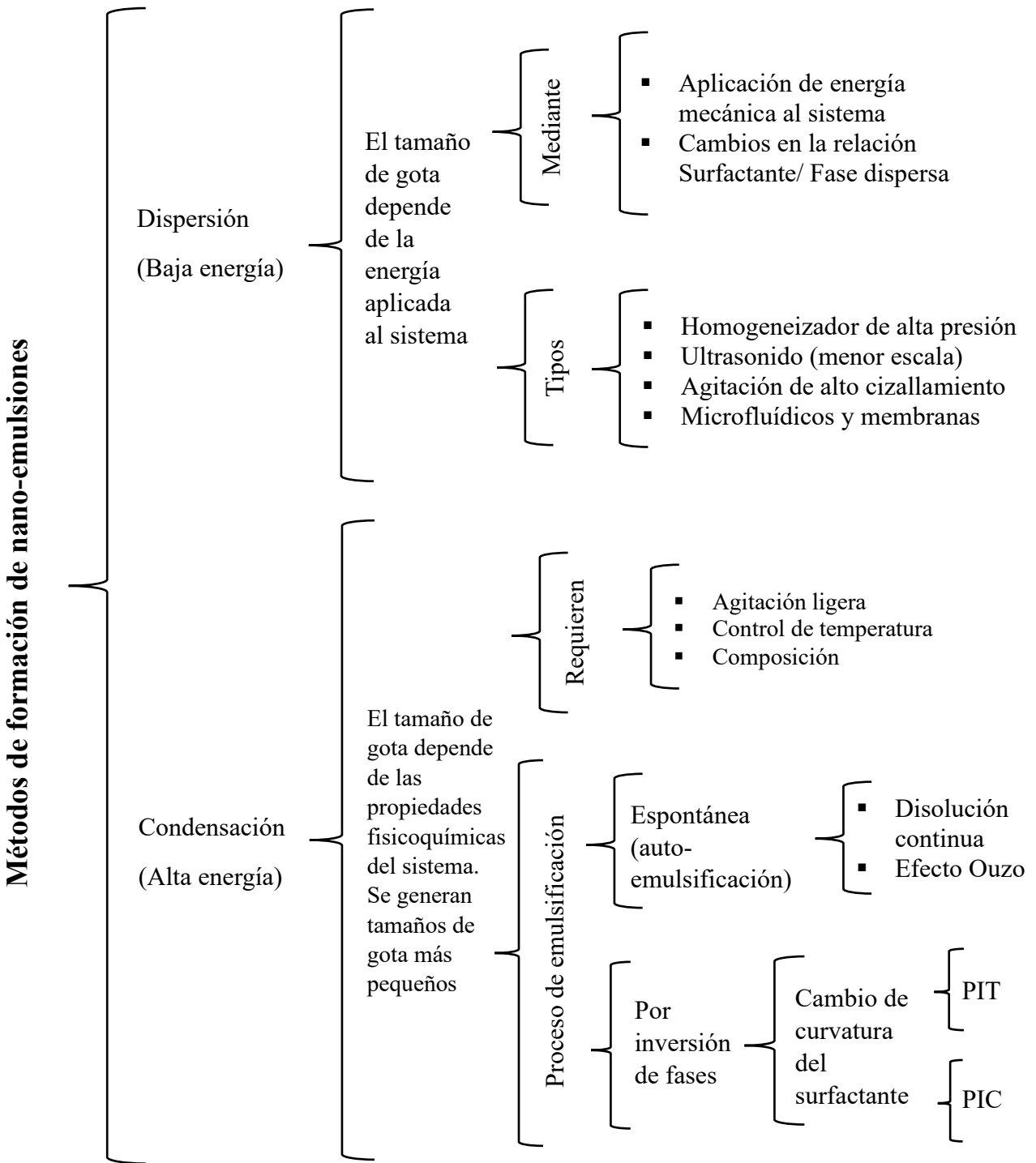


Figura 1.5.2. Métodos de formación de nano-emulsiones.

Generalmente, las gotas en una nano-emulsión no son uniformes y tienen altos índices de polidispersidad, por lo que la maduración de Ostwald es el principal mecanismo de desestabilización de las nano-emulsiones. Cuando se usan surfactantes no-iónicos de tipo

etoxilados, este efecto puede disminuirse adicionando un segundo surfactante con la misma longitud de cadena alquílica pero mayor grado de etoxilación que el primero [16].

Para su formulación, las nano-emulsiones requieren una menor cantidad de surfactante que las microemulsiones, por lo que son de más baja toxicidad. Esta ventaja hace atractivos a los sistemas nano-emulsionados para ser aplicados como vehículos para el suministro directo de fármacos y moléculas activas al organismo [120]. Además de permitir que los sistemas puedan ser ajustados estructuralmente y funcionalizarlos. Las nano-emulsiones han sido aplicadas para el desarrollo de vacunas y plataformas que involucran rutas subcutáneas, intramusculares, intravenosas y mucosas, esto ha llamado recientemente la atención de los investigadores como candidatos potenciales para fungir como plataformas terapéuticas frente a la COVID-19 [121]. Por otra parte, también han sido aplicadas en la síntesis de nanopartículas de metales nobles [122] y actuando como nano-plantillas en la síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos [53].

1.5.1.2. Surfactantes

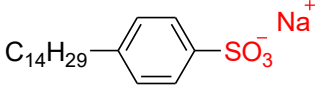
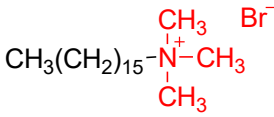
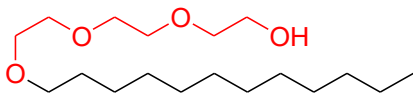
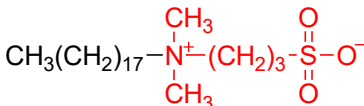
La elección del agente emulsionante es uno de los factores clave al momento de formular una emulsión, ya sea convencional o ultrafina; dependerá del tipo de aceite y fase acuosa a dispersar y la relación entre ambas fases. Nos interesan los surfactantes como agentes emulsionantes, es importante tener en cuenta algunos aspectos que caracterizan a un surfactante.

Un surfactante o tensoactivo es una sustancia que tiene la propiedad de adsorberse en las superficies o interfases del sistema y alterar de forma significativa las energías libres interfaciales de esas superficies (o interfases) [56]. Su palabra en inglés *surfactant* es una contracción del término *surface-active agent*. La estructura anfipática característica de un surfactante consiste en un grupo estructural que tiene muy baja atracción por el solvente, grupo liófilo, y un grupo liófilico que tiene una fuerte atracción por el solvente.

Cuando el solvente es una fase acuosa se usa el término hidrofóbico, para definir baja afinidad por el agua, y el término hidrofílico, con fuerte afinidad por el agua, metales y otros iones. El grupo hidrófobo suele ser un residuo de hidrocarburo de cadena larga, una cadena de hidrocarburo halogenado, como fluorocarbonos, o de siloxano; el grupo de cabeza o grupo hidrófilo puede estar cargado (iónico) o presenta polaridad debido a la inclusión de átomos de oxígeno (no iónico) o similares [123].

Los surfactantes pueden ser clasificados en cuatro grupos principales, de acuerdo con la naturaleza del grupo hidrófilo como se presenta en la **Tabla 1.5-3**.

Tabla 1.5-3. Tipos principales de surfactantes de acuerdo con el grupo hidrofílico.

Clasificación	Características del grupo hidrofílico	Ejemplo
Aniónicos	Termina en un anión como sulfato, fosfato y carboxilato.	
Catiónicos	Es un catión como amonio cuaternario o piridinio	
No-iónicos	No presenta cargas, su solubilidad en agua se deriva de grupos altamente polares como óxidos de etileno o azúcares.	
Zwitteriónico (anfótericos)	Tienen dos especies con carga opuesta dentro, con carga iónica neutra.	

Se ha introducido el concepto de equilibrio hidrofílico-lipofílico, o HLB por sus siglas en inglés (Hydrophilic-Lipophilic Balance), para seleccionar el tensoactivo adecuado para la aplicación deseada. El HLB es la medida del tamaño y la fuerza de los restos hidrofílicos e hidrofóbicos de una molécula de surfactante. En este método semiempírico, a un tensoactivo se le asigna un número HLB (de 0 a 20) de acuerdo con su estructura química [124]. Cada tensoactivo tiene asignado un número HLB que representa las proporciones relativas de los componentes lipófilos e hidrófilos de la molécula. En la **Tabla 1.5-4** se presenta una clasificación de las aplicaciones de los surfactantes de acuerdo con su número HLB.

Tabla 1.5-4. Escala de equilibrio lipofílico hidrofílico (HLB) mostrando la clasificación de las aplicaciones del surfactante. Obtenido de [124].

Compatibilidad con agua/aceite	Aplicaciones	HLB
Soluble en aceite HLB <10	Agentes antiespumantes	1 – 3
	Agentes emulsionantes W/O	3 – 6
	Agentes humectantes y dispersantes	7 – 9
Soluble en agua HLB >10	Agentes emulsionantes O/W	8 – 16
	Detergentes	13 – 15
	Agentes solubilizantes	15 – 18

Por ejemplo, para formar una emulsión del tipo W/O, donde la fase oleosa es la fase continua se necesitan tensoactivos lipófilos, aquellos con bajos valores de HLB. En tanto que, si se desea formular una emulsión en la que la fase acuosa actúe como dispersante, se necesitan tensoactivos hidrófilos, con alto HLB.

1.5.2. Microemulsiones

El término microemulsión fue acuñado por Schulman y col. en 1959, al realizar la titulación de una mezcla de tensoactivo, alcohol y fase oleosa con agua hasta la transparencia controlando el pH [125]. Actualmente, una microemulsión se define como una dispersión multicomponente de dos líquidos inmiscibles que en presencia de un emulsionante o tensoactivo se forma de manera espontánea y la cual es ópticamente transparente, isotrópica, homogénea y termodinámicamente estable [126]. Otros términos que se usan comúnmente para referir a una microemulsión son micelas hinchadas o soluciones micelares.

Las moléculas del surfactante se acomodan en diferentes microestructuras dependiendo del tipo de surfactante, la temperatura, fuerza iónica y la relación aceite/agua en el sistema [53]. Se pueden formar gotitas de aceite dispersas en fase acuosa (O/W) donde el surfactante adquiere una curvatura positiva. O bien, donde la fase oleosa sea la fase dispersante de las gotitas de fase acuosa (W/O), y la parte hidrófila se mantenga al interior de la gotita de agua en una curvatura negativa, también llamadas microemulsiones inversas. Estos sistemas también se pueden estructurar de tal manera que la curvatura neta sea casi cero y ambas fases estén presentes como fase continua, a este tipo de microestructuras se les conoce como microemulsiones bicontinuas. En la **Figura 1.5.3** se ilustran los tipos de microestructuras en una microemulsión.

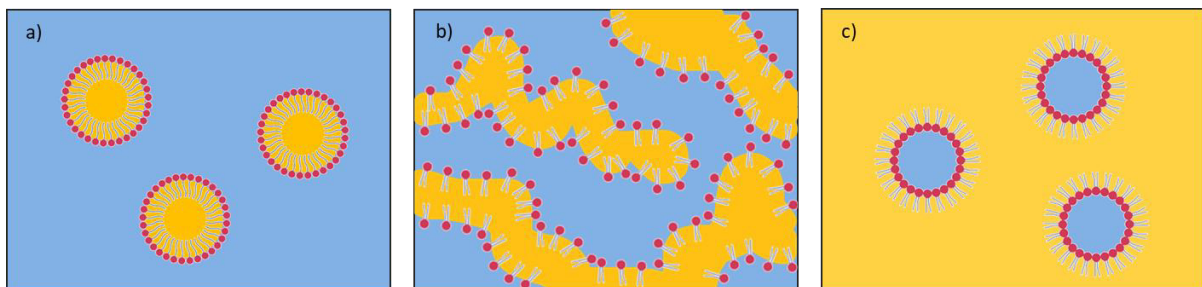


Figura 1.5.3. Tipos de microestructuras comúnmente encontradas en microemulsiones: a) O/W, b) bicontinuas y c) W/O.

Los tamaños de gota están entre 1 a 100 nm con baja polidispersidad. El tamaño de gota es significativamente inferior que la longitud de onda de la luz visible por lo que son ópticamente claras y transparentes.

Otra característica de las microemulsiones es la tensión superficial extremadamente baja (otorgada por la cantidad de surfactante presente en el sistema), muy cercana a 0 (mN/m) [123] y, a diferencia de las nano-emulsiones que requieren baja cantidad de surfactante, pueden ser formadas espontáneamente, requiriendo únicamente una ligera agitación para incorporar sus componentes. Generalmente, las microemulsiones se preparan con más de un surfactante o con una mezcla de un surfactante:co-surfactante (como un alcohol de cadena intermedia) [56].

Estabilidad termodinámica

Como se mencionó anteriormente, algo que distingue a una microemulsión es que son sistemas termodinámicamente estables. Lawrence y Rees [17] presentan una teoría de formación de las microemulsiones basada en la termodinámica interfacial del sistema. Ellos consideran que la energía libre de formación de microemulsión depende de la medida en que el surfactante reduce la tensión superficial de la interfase aceite-agua y el cambio en la entropía del sistema de la siguiente manera:

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (1.5-1)$$

Donde se tiene que

ΔG_f = energía libre de formación,

γ = tensión superficial de la interfase aceite-agua,

ΔA = cambio en el área interfacial en microemulsificación,

ΔS = cambio en la entropía del sistema (entropía de dispersión) y,

T = temperatura.

Al formarse la microemulsión, ΔA incrementa debido al gran número de las pequeñas gotitas que se generan. El valor de γ es positivo y muy pequeño, en el orden de fracciones de mN/m y es compensado por el componente entrópico. La contribución entrópica favorable proviene de la entropía de dispersión, en gran medida, que surge al formar un gran número de pequeñas gotitas y, en menor medida, están las contribuciones entrópicas derivadas de otros procesos dinámicos. Cuando se tiene una disminución de la γ significativa acompañada de una

contribución entrópica favorable, resulta en un ΔG_f negativa y, en consecuencia, un proceso de formación espontáneo con una distribución termodinámicamente estable.

Comportamiento de fases

El comportamiento de fases del sistema puede ser estudiado mediante la construcción diagramas de fases. Los diagramas ternarios de fases suelen ser una herramienta útil para el estudio del comportamiento fásico, el sistema más simple está compuesto por tres componentes agua, aceite y surfactante, donde las esquinas del diagrama corresponden al 100 % de cada componente. En la formulación de microemulsiones suelen usarse aditivos como lo son co-surfactantes, fármacos o precursores, estos sistemas con cuatro componentes se estudian mediante diagramas pseudo-ternarios, donde el co-surfactante se relaciona con el surfactante como una sola fase y los demás aditivos a la fase oleosa o acuosa en la que se encuentren disociados.

El procedimiento más común para construir el diagrama pseudo-ternario de fases es partiendo de mezclas (pseudo) binarias y titularlas con un tercer componente analizando la mezcla después de cada adición. Es necesario evaluar el comportamiento fásico del sistema en el equilibrio manteniendo una temperatura controlada para evitar realizar observaciones incorrectas de fases metaestables [17]. Con un exceso de aceite o agua, fuera de la zona monofásica (donde el sistema es completamente homogéneo y transparente), se pueden presentar múltiples fases en el sistema, las cuales se pueden describir utilizando la clasificación Winsor. Los sistemas de tipo Winsor comúnmente observados indican que las microemulsiones pueden permanecer en equilibrio con exceso de aceite, exceso de agua o ambos.

En esta clasificación una microemulsión corresponde a un sistema Winsor tipo IV, en la que se presenta una única fase transparente e isotrópica a la luz polarizada, son formadas generalmente en la región con mayor cantidad de surfactante. En Winsor tipo I se tiene una emulsión de tipo O/W en la parte inferior en la que solo una porción de aceite se solubiliza y el exceso se mantiene en la parte superior. Por el contrario, el sistema Winsor tipo II solo una porción de agua se solubiliza en la fase superior formando una emulsión W/O. En el sistema Winsor tipo III se distinguen tres fases, una microemulsión de fase media, rica en tensoactivos, que existe en una condición de equilibrio con las fases oleosa en la parte superior y acuosa en

la parte inferior. La fase intermedia tiene una estructura bicontinua formada por una mezcla de microemulsiones de tipo W/O y O/W. [127–129]

Aplicaciones

La alta estabilidad de las microemulsiones y la posibilidad de formularlas con una amplia variedad de componentes, las convierte en una herramienta atractiva para diferentes aplicaciones. En la década de 1970, surgió un gran interés en la investigación de las microemulsiones durante la llamada “crisis del petróleo” debido a su uso potencial en la recuperación de petróleo, aunque estas tecnologías tienen un alto costo [123].

En la fabricación de nanomateriales las microemulsiones ayudan a controlar de diferente manera los productos formados. En la síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos son utilizadas como nano-plantillas. Moon y Lee [130] estudiaron el mecanismo de formación de nanopartículas de sílice mesoporosa en microemulsiones bicontinuas de sistemas Winsor tipo III, obteniendo estructuras jerárquicas con estructuras de arrugas radiales. Proponen el mecanismo de formación presentado en la **Figura 1.5.4** donde el precursor de silicio (TEOS) disuelto en la fase oleosa entra en contacto con el agua en la interfase de la emulsión y las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren; los monómeros y oligómeros de silicato tienen cargas negativas a las que se pueden enlazar los grupos catiónicos de la cabeza del surfactante. Luego las moléculas de surfactante comienzan a adquirir curvatura positiva hasta formar estructuras como esferas o cilindros. La agregación de las micelas conduce a formar repetitivas mesofases actuando como un sitio semilla de nanopartículas y éstas continúan creciendo en la fase acuosa de la microemulsión bicontinua. Se han utilizado los sistemas microemulsionados como nano-plantillas para obtener otros tipo de materiales como nanoestructuras magnéticas de CoNi [131] o magnetita-oro [132].

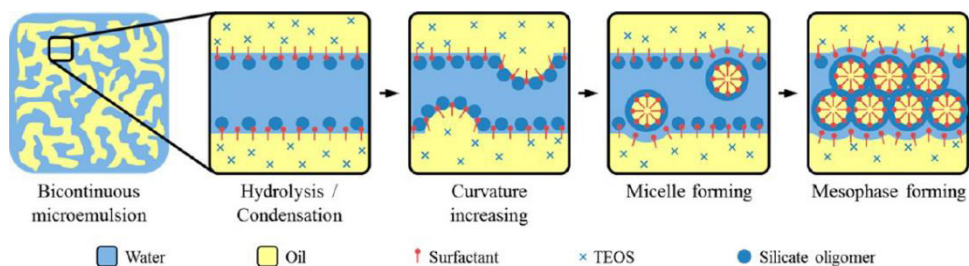


Figura 1.5.4. Ilustración esquemática del mecanismo de formación de la meso-fase a partir de la interfase de la microemulsión. Obtenido de [130].

También han sido ampliamente estudiadas como nano-reactores para la síntesis de nanopartículas bio-poliméricas [133], metálicas y bimetálicas. Se han evaluado diferentes enfoques en la obtención de nanomateriales usando como reactores los sistemas microemulsionados. Por ejemplo, el uso de las estructuras bicontinuas como sistemas confinados para generar estructuras tridimensionales por la interconexión de los canales de agua y aceite [134–136]. Otra manera puede ser el uso de microemulsiones inversas que permitan incorporar sales de metales como precursores en fase acuosa dentro de las gotitas de la microemulsión limitando el crecimiento de las nanopartículas [137, 138], o con microemulsiones del tipo O/W que son más amigables con el medio ambiente ya que la fase oleosa está en menor proporción esto ofrece la posibilidad de ser un método escalable ya que se emplea agua como solvente principal [19, 139, 140]. En la síntesis de nanopartículas bimetálicas, el método de las dos microemulsiones otorga un mejor control en la relación final entre ambos metales a comparación de otros métodos de síntesis [141–143].

Las moléculas de surfactante otorgan una mayor estabilidad a los nanomateriales producidos durante la síntesis, incluso hasta el momento de separar el nanomaterial del sistema. Además, permiten emplear reductores más suaves y agentes de cobertura que en otras metodologías de síntesis no resultan viables. La funcionalización de los nanomateriales para lograr biocompatibilidad es otra de las ventajas que posee este método [86, 144].

Otra de las aplicaciones que tienen las microemulsiones es en sistemas de liberación de fármacos debido a su alta capacidad de solubilización, transparencia, estabilidad termodinámica, facilidad de preparación y altas tasas de difusión y absorción comparadas con las soluciones sin tensoactivo [145]. Es más investigado el uso de microemulsiones en la administración de fármacos lipofílicos a través de microemulsiones de aceite en agua y el empleo de surfactantes no iónicos para administración oral o tópica [146].

En la **Figura 1.5.5** se observa la diferencia en el aspecto entre una microemulsión, una emulsión y una nano-emulsión, en una fotografía presentada por Patel y colaboradores [147] y la **Tabla 1.5-5** presenta de manera muy breve una comparación entre algunas características de las microemulsiones y las nano-emulsiones.



Figura 1.5.5. Apariencia de microemulsión (izquierda), emulsión (centro) y nano-emulsión (derecha). Obtenida de [147].

Tabla 1.5-5. Comparación entre microemulsiones y nano-emulsiones.

Microemulsiones	Característica	Nano-emulsiones
1 a 100 nm	Tamaño de gota	20 a 200 nm
Clara, transparente y homogénea	Apariencia	Traslúcida o transparente, presenta opalescencia
Termodinámica	Estabilidad	Cinética
Monofásica por largos periodos de tiempo y diferentes condiciones	Separación de fases	Eventualmente ocurre la separación de fases y es sensible a los cambios
Espontánea (agitación ligera)	Formación	Métodos de alta energía y baja energía
Altamente estable y mínimo de energía para su formación	Ventajas	Requieren menor cantidad de surfactante: co-surfactante

CAPÍTULO 2

SECCIÓN EXPERIMENTAL



2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

Para todas las soluciones acuosas se utilizó agua desionizada tipo I (Karal, León). Como precursor de oro se empleó una solución estándar de cloruro de oro(III) de 1000 ppm en HCl al 10 % (v/v). Las hojas de Chaya maya se cosecharon de una planta que fue adquirida en un vivero local y se cultivó en las instalaciones de la Sede Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato.

En la formulación de los sistemas fue utilizado el Brij O10 (Éter de polioxietilen(10)oleílico), un surfactante polietoxilado de cadena carbonada lineal. Este surfactante no iónico con un HLB de 12.4, tiene aplicaciones cosméticas y farmacéuticas, siendo utilizado en sistemas acarreadores de fármacos [148]. Como co-surfactante 1,2-hexanodiol, un diol de cadena media. Tiene funciones como solvente, humectante y fragancia, se usa en formulaciones cosméticas, productos de cuidado personal, farmacéuticos, tintas y tóneres, perfumes y fragancias [149]. Tanto el Brij O10 como el 1,2-hexanodiol (98%) se adquirieron de Sigma Aldrich (México).

Para la fase oleosa se utilizó el aceite de ricino, un aceite vegetal que se extrae de las semillas de ricino (*Ricinus communis*). Estructuralmente es un triglicérido de ácidos grasos, encontrándose como ácido graso principal al ácido ricinoleico (87 %), seguido de ácido oleico, linoleico, entre otros. Tiene varias aplicaciones en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica: suele usarse para hacer jabones, cremas y ungüentos, producir diferentes tipos de lubricantes, pinturas a base de aceite, es usado medicinalmente como excipiente y anteriormente como laxante [150, 151]. En la **Figura 2.1.1** se muestran las estructuras de los componentes empleados en los sistemas.

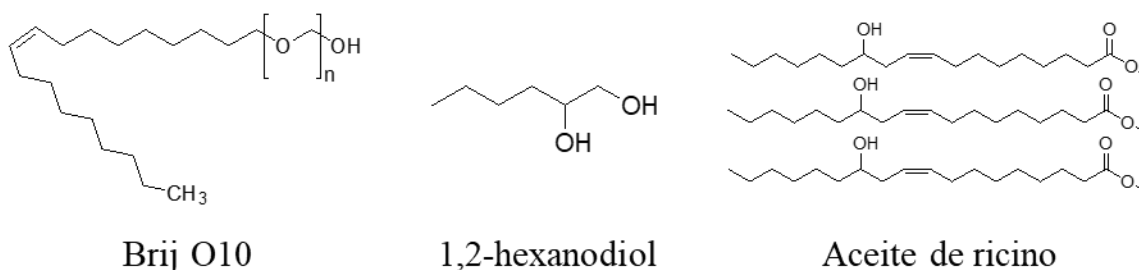


Figura 2.1.1. Estructuras químicas de los componentes utilizados para formular los sistemas micro y nano-emulsionados.

Para la determinación del poder reductor del extracto se utilizó cloruro de cobre(I), ácido ascórbico, acetato de sodio y ácido acético glacial (reactivos grado analítico de Karal, León). acetato de amonio (Industrial KEM, León), neocuproína ≥ 99 % (Aldrich, México), cloruro de hierro(III) (J. T. Baker, Xalostoc) y 2,4,6-Tis(2-pyridyl)-s-triazine ≥ 99 % (Fluka, México).

2.2. MÉTODOS

En esta sección se describen las metodologías llevadas a cabo para la obtención de las nanopartículas de oro, así como las técnicas de caracterización de las mismas y del extracto acuoso de hojas de chaya maya (ECM). Se refiere a cada componente por su inicial de la palabra en inglés, para el tensoactivo se designa la letra S (surfactant), para el co-tensoactivo la C, para el aceite la O (oil) y para la fase acuosa W (water). La cantidad de cada componente empleado se expresa en porcentaje en masa o porcentaje en peso (% m/m o wt. %) a menos que se indique otra cosa.

2.2.1. Obtención del extracto acuoso de hojas de Chaya maya (ECM)

Las hojas frescas de chaya maya se lavaron doblemente con agua desionizada con la finalidad de eliminar la suciedad. Previo a un proceso de secado las hojas limpias se pesan y se dejan en una estufa a 50 °C durante 48 horas. Una vez secas se pesan nuevamente para obtener el peso seco y se trituran en un mortero. Se almacenan en un lugar fresco y seco.

Para la preparación del extracto la cantidad necesaria para obtener una concentración de 4 % (m/V), porcentaje en masa de hojas de chaya maya secas sobre volumen de solución, se pone en contacto con 50 mL de agua hirviendo durante 5 minutos. Después de este tiempo en ebullición, se deja enfriar a temperatura ambiente. El extracto se filtra mediante filtros de papel no. 1 y se pasa por membranas hidrófilas de tipo GPWP de 0.22 μm . El extracto cristalino se afora a 50 mL y se almacena hasta su uso en ausencia de luz a 4 °C.

El extracto hidroetanólico de hojas de Chaya maya se preparó mezclando 25 mL de agua desionizada (a 75 °C) con 25 mL de alcohol etílico absoluto en relación 1:1. Inmediatamente después se agregó 1 g de hojas de chaya secas y trituradas. Se mantuvo en agitación de tipo ping-pong durante 10 min. Finalmente se filtró doblemente con filtros de papel No. 1.

2.2.2. Poder reductor del extracto

Para determinar el poder reductor del ECM se utilizaron dos métodos espectrofotométricos basados en la transferencia de electrones, el método de la capacidad antioxidante reductora cúprica, CUPRAC por sus siglas en inglés (Cupric reducing antioxidant capacity) y el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), poder antioxidante reductor férrico. En ambos casos se empleó una solución estándar fresca de ácido ascórbico (AA) 1 mM y la curva de calibración se obtuvo de (0.01 - 0.1) mM. Los resultados fueron expresados en mmol de AA por gramo de hojas secas de chaya maya ($mmol\ AA/g$). A partir de la curva de calibración se obtiene que:

$$Abs = m \left[\frac{mmol\ AA}{L} \right] \pm b \quad (2.2-1)$$

Con la concentración molar de ácido ascórbico se puede determinar la capacidad antioxidante-poder reductor por gramo de hoja a partir de la siguiente ecuación:

$$Poder\ reductor \left(\frac{mmol\ AA}{g} \right) = \left[\frac{mmol\ AA}{L} \right] \cdot \frac{V_{ECM}(L)}{m_{chaya}(g)} \quad (2.2-2)$$

Donde,

Abs = absorbancia en la longitud de onda dada

m = la pendiente de la curva de calibración

b = la ordenada al origen

V_{ECM} = volumen del extracto preparado (L)

m_{chaya} = masa de las hojas de chaya maya pesadas para el extracto (g)

CUPRAC

El ensayo CUPRAC consiste en la reducción de Cu(II) a Cu(I) que, al formar el quelato con la neocuproína, permite que la reacción sea más rápida aumentando el potencial redox del reactivo. Después de la reacción con los compuestos antioxidantes se forma un cromóforo monovalente que es medible a 450 nm de color amarillo-naranja, los protones son amortiguados por un buffer de acetatos (**Figura 2.2.1**). El método es aplicado a una gran variedad de polifenoles como lo son los ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas, tioles y vitaminas C y E. Los

estándares y las muestras se prepararon añadiendo 1 mL de una solución acuosa de Cu(II) 10 mM, 1 mL de neocuproína 7.5 mM en etanol, 1 mL de solución buffer de acetato de amonio 1 M a pH=7, $x(0.03-1.00)$ mL de extracto o estándar y $(1-x)$ mL de agua desionizada. Después de una hora en reposo, se midió la absorbancia máxima a 450 nm. [152–154]

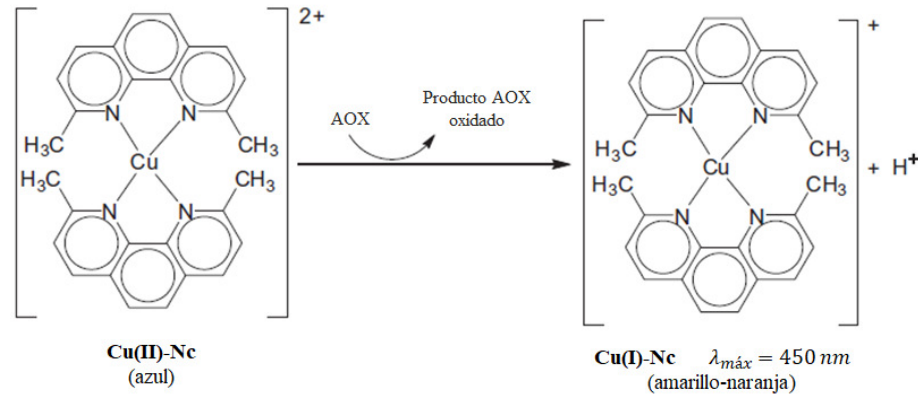


Figura 2.2.1. Reacción CUPRAC. Adaptado de [153].

FRAP

Este método se basa en la reducción del complejo de Fe(III) con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) al quelato Fe(II)-TPTZ por reacción con los antioxidantes presentes en la muestra en medio ácido (**Figura 2.2.2**). El complejo ferroso exhibe una coloración azul intensa con absorción máxima a 593 nm. Para la preparación del reactivo FRAP se mezclan en relación 10:1:1 el buffer de acetato 0.3 M (pH 3.6), el complejo TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y el $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, respectivamente. El reactivo se deja en incubación a 37 °C durante 15 minutos. A $x(0.03-1)$ mL del extracto o estándar, se le adiciona $(1-x)$ mL de agua desionizada y 3 mL del reactivo FRAP. Las muestras permanecen en incubación a 37 °C durante 15 minutos y después se mide la absorbancia entre (593-595) nm.[155, 156]

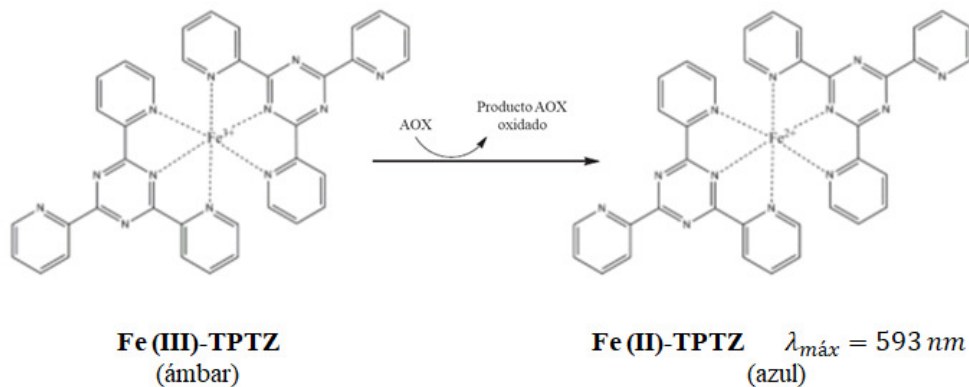


Figura 2.2.2. Reacción FRAP. Adaptado de [156].

2.2.3. Comportamiento fásico

Para evaluar el sistema fase acuosa/ Brij O10: 1,2-hexanodiol (1:1) / aceite de ricino con el extracto acuoso de hojas de chaya maya al 4 % como fase acuosa, se realizó un barrido rápido del comportamiento fásico del sistema utilizando el método de valoración, donde distintas relaciones iniciales peso/peso de aceite y surfactante se valoran con la fase acuosa, siguiendo las líneas de dilución de la **Figura 2.2.3**. Las mezclas obtenidas por cada adición de extracto acuoso se inspeccionan visualmente observando la formación de una o más fases y mediante polarizadores cruzados para descartar la presencia de cristales líquidos.

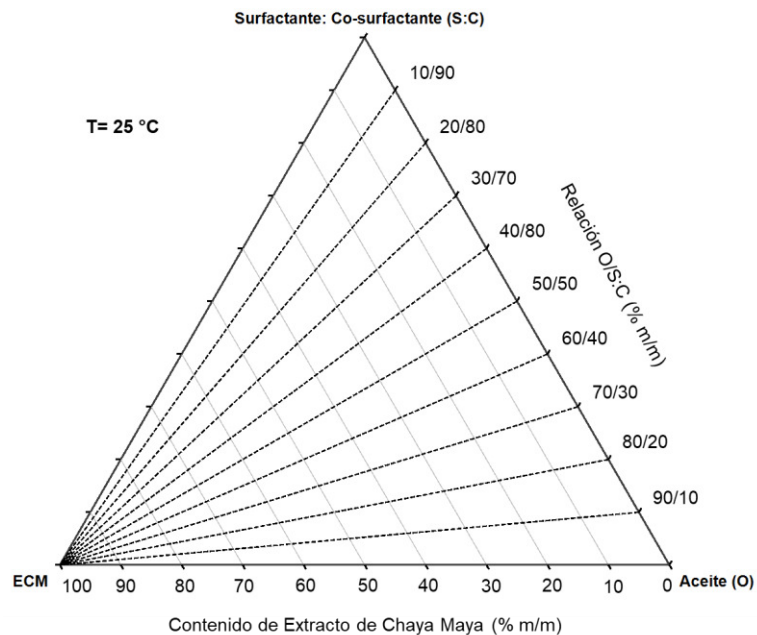


Figura 2.2.3. Diagrama ternario de fases utilizado para realizar un barrido rápido del comportamiento de fase, a partir de la dilución con extracto de chaya maya (ECM) de mezclas aceite/ surfactante: co-surfactante (O/S:C) a temperatura constante.

Con el estudio anterior se delimitó rápidamente la zona multifásica y para complementar el estudio fásico se siguió el método de pesado directo que consiste en pesar cada una de las composiciones en un vial de vidrio sellado y el cual se mantiene en un baño a temperatura constante durante 30 minutos. Después de alcanzar el equilibrio se realizan inspecciones visuales y con polarizadores cruzados, diferenciando aquellas en las que ocurre separación de fases. Para demostrar que las muestras con aspecto monofásico son microemulsiones se someten a un proceso de separación de fases mediante centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos, seguido por una etapa de congelación de al menos 12 horas. Finalmente, se dejan en un baño a temperatura controlada. Esto para distinguir las composiciones estables de las metaestables, es

decir, la zona de nano-emulsión, en las cuales ocurre una separación de fases, de la zona de microemulsión (aquellas mezclas que se mantuvieron completamente transparentes, fluidas y homogéneas).

2.2.4. Conductividad

Se llevó a cabo un estudio de conductividad para identificar las diferentes microestructuras, del tipo W/O, bicontinua o O/W, de acuerdo con el contenido de agua en el sistema. Los cambios significativos en los valores de conductividad se relacionan con un cambio en la microestructura. Se parte de la mezcla de aceite/ surfactante: co-surfactante, siguiendo la línea de dilución 30/70 (O/S:C), se tituló con la fase acuosa a utilizar en adiciones de 5 %. El experimento se realizó a una temperatura de 25 °C, registrándose entre cada adición el valor de conductividad.

Se utilizó un conductímetro 712 de Metrohm con una constante de celda de 0.8 cm^{-1} y coeficiente de variación de conductividad igual a $2.11 \text{ } \%/^{\circ}\text{C}$, la calibración del equipo se realizó con una solución estándar de conductividad de $1413 \text{ } \mu\text{S}/\text{cm}$.

2.2.5. Síntesis directa de nanopartículas de oro

Al volumen necesario de solución estándar de oro se le adiciona lentamente el ECM hasta completar un volumen de 10 mL para obtener una concentración final de 0.75 mM. Se varió la concentración de ECM de 0.5%, 1 %, 2 %, 3 % y 4 % (porcentaje en masa de hojas de chaya maya sobre volumen de solución). Inmediatamente después de entrar en contacto el precursor con el extracto, se analizó mediante espectroscopía UV-vis. De manera similar, se probaron diferentes concentraciones de oro manteniendo fija la concentración del extracto en 4 %.

La caracterización del poder reductor del extracto y la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPRB) de las AuNPs se realizó con un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis de Agilent Technologies usando una celda de vidrio. En el caso de la síntesis directa el ECM se utilizó como referencia.

2.2.6. Síntesis de nanopartículas de oro en microemulsiones y nano-emulsiones

Para la síntesis de AuNPs en los sistemas se pesaron las cantidades necesarias de cada componente de acuerdo con la formulación deseada, mezclándolos en el siguiente orden: surfactante, co-surfactante y aceite. Una vez homogeneizado, se adiciona el precursor de oro y, bajo agitación intensa constante, se complete la cantidad de fase acuosa con el ECM. El precursor y el ECM están relacionados con la cantidad de fase acuosa en el sistema, manteniendo siempre fija la concentración de oro en 0.75 mM. Un cambio en la coloración del sistema de amarillo a rosa o morado indica que la reacción de reducción tuvo lugar. El sistema de reacción permanece en un baño a temperatura controlada (25 °C) durante más de 12 horas para asegurarse de que la reacción se haya completado. Transcurrido este tiempo, las AuNPs obtenidas se separan mediante centrifugación a 12000 rpm durante 25 minutos y se lavan con ciclos de acetona y etanol. Finalmente, las nanopartículas limpias se re-suspenden en agua desionizada para su posterior caracterización. Las nano-emulsiones se prepararon por dilución partiendo de una relación inicial determinada de O/S:C, diluyendo con la cantidad necesaria de fase acuosa. En la **Figura 2.2.4** se muestra el diagrama de flujo del proceso de síntesis.

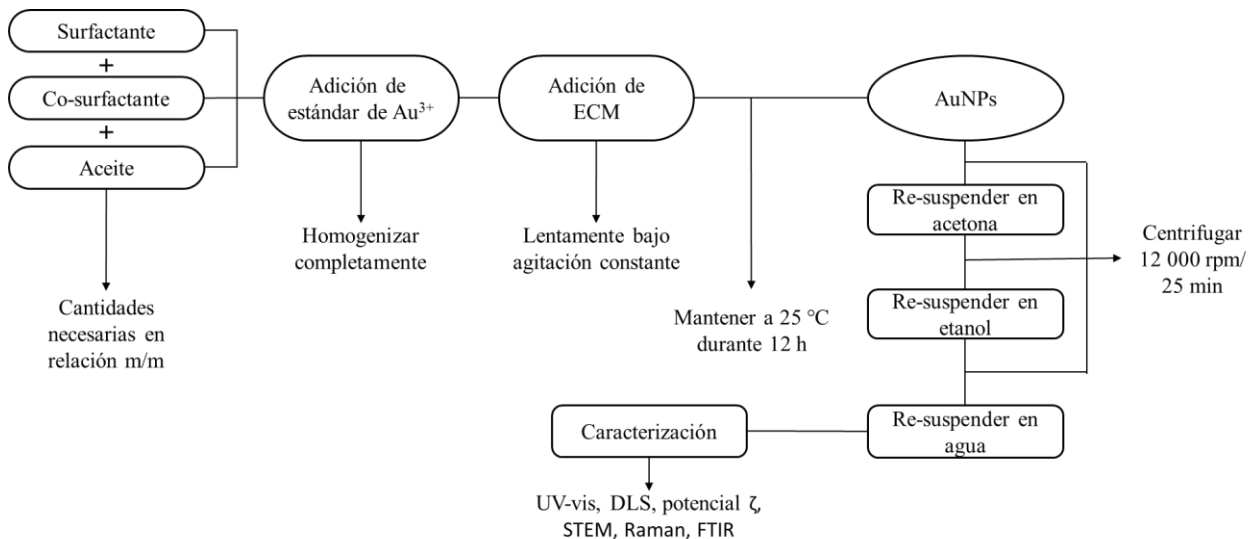


Figura 2.2.4. Diagrama de flujo del proceso de síntesis de AuNPs en microemulsiones y nano-emulsiones.

Las formulaciones probadas para la síntesis de AuNPs en los sistemas se presentan en la **Tabla 2.2-1**. Cabe recordar que la concentración de Au³⁺ está relacionada con la cantidad de fase acuosa presente en el sistema.

Tabla 2.2-1. Composiciones evaluadas para la síntesis de AuNPs.

Muestra	Fase oleosa	Surfactante: co-surfactante	Fase acuosa*
A	10	60	30
B	10	55	35
C	10	50	40
D	10	45	45
E	10	40	50
F	10	35	55
G	10	30	60
B2	15	55	30
C2	15	50	35
D2	15	45	40
G2	15	25	60
C3	20	50	30
N	05	45	50

*Conformada por el ECM y el precursor de oro.

2.2.7. Caracterización de las nanopartículas de oro

A continuación, se describen las metodologías realizadas para la caracterización de las AuNPs obtenidas mediante síntesis directa y un análisis más completo para las obtenidas utilizando los nano-reactores.

Espectroscopía UV-vis

La síntesis directa de AuNPs se verificó mediante espectroscopía UV-vis siguiendo la banda alrededor de 523 nm, el análisis se realizó inmediatamente después de poner en contacto el precursor y el reductor, utilizando como blanco el ECM y en diferentes intervalos de tiempo.

En el caso de las AuNPs obtenidas utilizando los nano-reactores, el cambio en la coloración del sistema de amarillo paja a rosa claro indicó el inicio de la reacción, por lo general, las nanopartículas alcanzaron una coloración característica después de aproximadamente dos horas de reacción. Las AuNPs limpias y re-suspendidas en agua desionizada se caracterizaron mediante espectroscopía UV-vis siguiendo la SPRB entre (520-550) nm.

Radio hidrodinámico y potencial zeta

A las AuNPs re-suspendidas en agua se les determinó el radio hidrodinámico (R_H) mediante la técnica de DLS. Las muestras se midieron por triplicado a una temperatura de 25 °C, el R_H se calculó a partir del ajuste manual del primer parámetro del método de los cumulantes, con un

índice de refracción de 0.2. La misma técnica se utilizó para medir el diámetro de las gotas de las nano-emulsiones. El potencial ζ se determinó midiendo la movilidad electroforética en agua como medio de dispersión a partir de la aproximación de Smoluchowski.

Las medidas de R_H y potencial ζ se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS90 de Marlvern Instruments. Utilizando una cubeta de vidrio cuadrada de 12 mm y una celda capilar plegada de plástico, respectivamente.

Espectroscopía Raman

Sobre una cinta de aluminio se depositaron dos gotas o 20 μ L de las AuNPs suspendidas en agua, el agua se dejó evaporar y se realizaron las mediciones mediante micro-Raman. En el caso del ECM, se depositaron varias gotas de la muestra sobre una laminilla de oro dejando evaporar para concentrar el extracto y obtener una mejor señal Raman. En el experimento SERS, sobre una cinta de aluminio se depositaron 20 μ L de las AuNPs y se dejó evaporar el agua; encima de la marca de la gota se depositaron varias gotas del ECM al 10 %, una vez secas las gotitas se analizaron por micro-Raman.

Los espectros de dispersión Raman fueron obtenidos con un DRX 3 Raman Microscope de Thermo Fisher. Empleando un láser de 780 nm para la obtención del espectro del ECM, 633 nm para el espectro de las AuNPS y 532 nm para evaluar el efecto SERS de las AuNPS sobre el ECM.

Microscopía electrónica de barrido-transmisión

Para el análisis de las muestras mediante STEM, las AuNPs se sometieron a otro ciclo de lavado con acetona y etanol, para asegurar que se haya eliminado la mayor cantidad de materia orgánica que pudiera interferir con las observaciones. Después del segundo lavado se re-suspendieron nuevamente en agua desionizada. Para su análisis, no se les aplicó recubrimiento de ningún tipo debido a su naturaleza metálica, únicamente se depositó sobre una rejilla de Cu una gota de la muestra y se dejó evaporar en un desecador.

Las micrografías se obtuvieron con un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Modelo Nova NanoSEM 200 Marca FEI con detector para STEM. El programa de procesamiento digital utilizado para la medición del diámetro de nanopartícula a partir de las micrografías STEM fue ImageJ.

CAPÍTULO 3

Síntesis directa de nanopartículas de oro utilizando el extracto acuoso de hojas de chaya maya como agente reductor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3.1. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA

En esta primera parte se presenta la caracterización del extracto acuoso de hojas de *Cnidocolus chayamansa* el cual fue utilizado como agente reductor durante la síntesis de nanopartículas, así como algunas observaciones y comparaciones realizadas.

3.1.1. Características generales del extracto acuoso

Para los experimentos se utilizaron hojas frescas de *C. chayamansa* a las cuales se les determinó el porcentaje de humedad por pérdida de peso, haciendo una relación entre la masa de las hojas recién colectadas y la masa de las hojas después del proceso de secado. Se obtuvo que las hojas de Chaya maya contienen una cantidad de agua mayor a tres cuartas partes de su peso (**Figura 3.1.1.1**), en promedio de 79.46 ± 1.95 %. De acuerdo con la bibliografía [99], la chaya contiene alrededor de un 85 % de agua. El porcentaje de humedad en las hojas de chaya calculado por Cauich Díaz [157] es muy parecido al de este estudio (78.4 %).

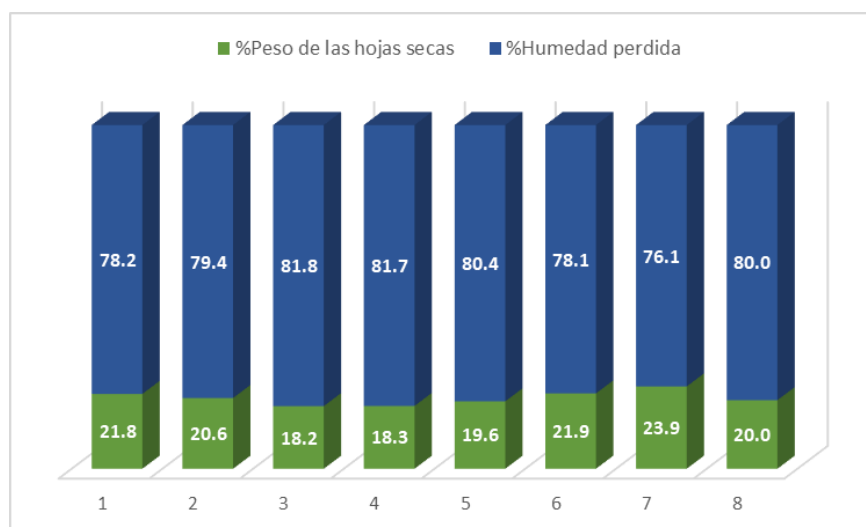


Figura 3.1.1.1. Porcentaje de humedad perdida en las hojas de chaya maya después del proceso de secado.

La apariencia del extracto acuoso de hojas de chaya maya (ECM), después de la filtración con las membranas, es cristalina con una coloración ámbar que es más intensa conforme el extracto es más concentrado. En la **Figura 3.1.1.2** se observan los espectros UV-vis del ECM a diferentes concentraciones. La banda a 675 nm disminuye en absorbancia conforme la concentración del extracto disminuye, lo que se puede atribuir a compuestos

relacionados con la pigmentación. También observado Cauich Díaz [157]. Con el extracto al 0.5 % en la región ultravioleta entre 300 y 350 nm se alcanzan a observar algunas bandas correspondientes a los componentes orgánicos. A concentraciones superiores el extracto se sobresatura en esta región por la cantidad de componentes orgánicos presentes.

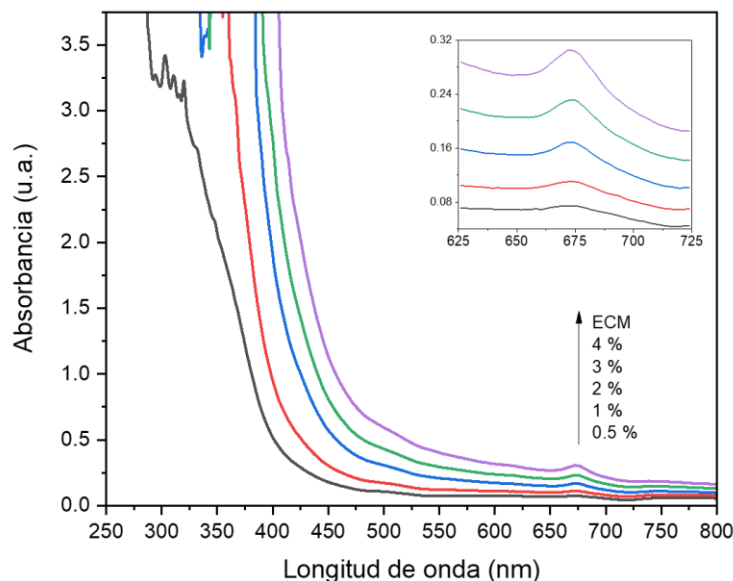


Figura 3.1.1.2. Espectros UV-vis de extractos acuosos de hojas de Chaya maya a diferentes concentraciones. Recuadro: ampliación de la región entre 625-725 nm.

En la **Figura 3.1.1.3** se muestran los espectros UV-vis para hacer una comparativa entre el extracto acuoso y el extracto hidroetanólico de las hojas de Chaya maya. En la zona visible, se puede observar una clara diferencia entre ambos. Mientras que para el ECM al 4% (2) solamente se observa la banda alrededor de 675 nm descrita anteriormente, el extracto con EtOH:H₂O (1) muestra diferentes bandas a 667 nm, 611 nm y 539 nm, asociadas a compuestos aromáticos conjugados que lograron extraerse con el etanol, estas bandas coinciden con las bandas del espectro de absorción de la clorofila “a” [158, 159]. La apariencia del extracto hidroetanólico de color verde muy intenso hace evidente que se logran extraer compuestos relacionados con la pigmentación como la clorofila (recuadro de la **Figura 3.1.1.3**).

Este extracto EtOH:H₂O se probó para la síntesis directa de AuNPs sin lograr obtener resultados satisfactorios, por lo que se optó por continuar con el extracto acuoso.

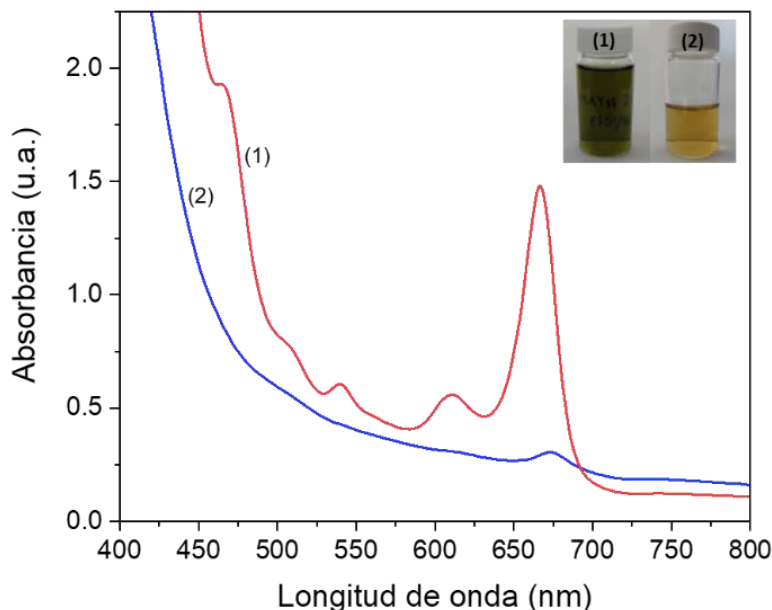


Figura 3.1.1.3. Espectro UV-vis del extracto acuoso (1) hidroetanólico y (2) acuoso de hojas de Chaya maya. Recuadro: aspecto de los extractos.

3.1.2. Análisis del extracto de Chaya maya mediante micro-Raman

Con la finalidad de comprobar la funcionalización de las AuNPs obtenidas, se realizó un análisis del ECM al 10 % mediante micro-Raman. En la **Figura 3.1.2.1** se presenta el espectro de dispersión Raman del ECM al 10 % depositado sobre una laminilla de oro. Debido a la amplia variedad de compuestos orgánicos presentes en el extracto, el espectro se observa altamente saturado. Las bandas más intensas de compuestos polifenólicos son bastante cercanas, por lo que la complejidad del extracto dificulta la diferenciación entre cada componente. En la **Tabla 3.1.2-1** se muestra la asignación de algunas de las señales observadas en el espectro Raman.

Las bandas relacionadas con la vibración de alargamiento O-H de la mayoría de los compuestos flavonoides se encuentran entre 3670 y 2890 cm^{-1} . Las señales más intensas entre $1620 - 1580\text{ cm}^{-1}$ son características de las vibraciones de alargamiento del grupo carbonilo de anillos aromáticos. De acuerdo con el desplazamiento de las señales de mayor intensidad encontradas en 1606 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} indican la presencia de flavonoles como quercetina y rutina en gran proporción. Señales desplazadas a números de onda mayores ($1692 - 1683\text{ cm}^{-1}$) se relacionan al grupo éster, por lo que compuestos como epigallocatequin galato podrían estar presentes en menor cantidad debido a que las señales en esa zona se presentan muy débiles. Las bandas que se encuentran entre $1455 - 1357\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la vibración de flexión de enlaces O-H, así

como a vibración de alargamiento C=C de fenoles. La banda encontrada a 1183 cm^{-1} se asocian con vibración de flexión en el plano de enlaces C-H. Las bandas 841 , 593 y 347 cm^{-1} se pueden relacionar con flexión fuera del plano de O-H. La vibración de flexión del grupo carbonilo se observa en 684 y 643 cm^{-1} [69, 160–163].

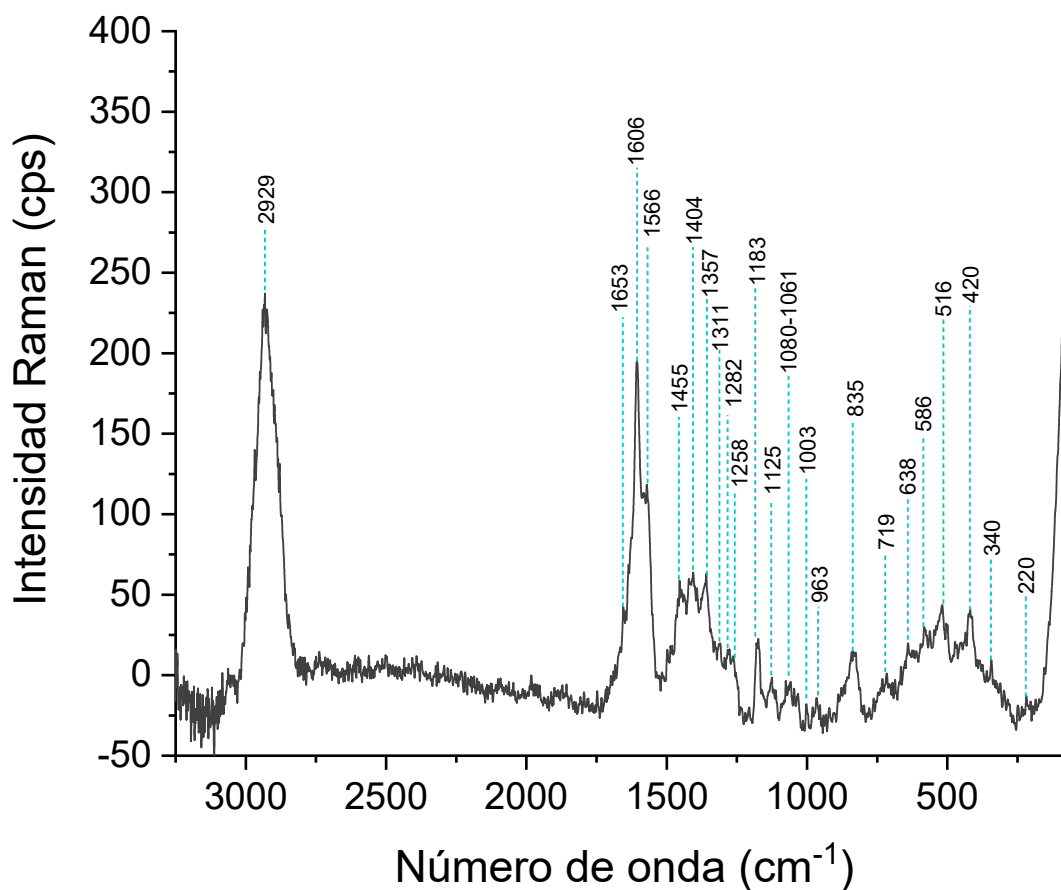
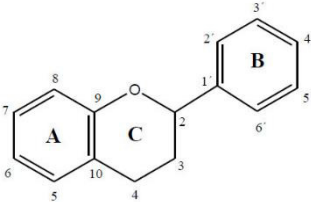


Figura 3.1.2.1. Espectro de dispersión Raman del ECM al 10 %. Adquirido con láser de 780 nm , potencia de 24 mW , 64 exposiciones por 1 segundo, lente de $50\times$ y apertura con orificio de $25\text{ }\mu\text{m}$.

Tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides presentan una región espectral muy intensa por debajo de 200 cm^{-1} debida a la vibración de esqueleto [161], esto se puede observar en el espectro como señales ascendentes que están desplazadas a números de onda más bajos.

Tabla 3.1.2-1. Asignación de las señales Raman que corresponden a compuestos flavonoides en el espectro del extracto de *chaya maya* al 10 %.



Banda en el espectro (cm ⁻¹)	Desplazamiento (cm ⁻¹)	Asignación
2929 _{vs}	3110-2890	v (C–H)
1653 _s	1680-1590	v (Ar–C=O)
1606 _{vs}	1620-1600	v (C=O), v (C=C)
1566 _{vs}	1570-1540	v (C=O), δ (O–H), v (C=C)
1455 _s	1515-1485	v (C=C) anillo A, δ (C–H)
	1500-1480	δ (H–C–C) anillo C
1404 _s	1460-1445	δ (H–C–C) anillo C
1357 _s	1370-1350	δ (O–H), v (C=C) anillo A
1311, 1283, 1258 _m	1320-1275	v (C=C) anillo A y B, δ (O–H)
	1300-1240	v (C=C)
1183 _m	1190-1180	v (C–O–H), δ (C–H) anillo B
1125 _w	1140-1115	δ (C–H) anillo A
1003 _{vw}	1010-990	τ (H–C–C) anillo C
963 _{vw}	1010-995	v (C–C) anillo A, B y C
	900-880	v (O–H), δ (C–C) anillo A, B y C
835 _m	850-825	v (C–C) anillo A, B y C
719 _w	780-770	τ (H–C–C) anillo A
638 _w	640-620	v (C–C) anillo B
586 _w	600-575	v (C–C) anillo A, B y C
516 _w	525-510	v (C–C) anillo A, B y C
	545-510	v (C=C)

(vs) muy intensa, (s) intensa, (m) media, (w) débil, (vw) muy débil, (v) vibración de alargamiento, (δ) vibración de flexión, (τ) vibración de torsión

3.1.3. Capacidad antioxidante- poder reductor

Se llevó a cabo un experimento mediante la técnica CUPRAC para evaluar la capacidad antioxidante del ECM al 1 % respecto a los días que se mantuvo en refrigeración a una temperatura de 4 °C y en ausencia de luz. Como se observa en la **Figura 3.1.3.1** durante los primeros dos días ocurre una disminución lineal en el poder reductor seguida por un aumento irregular del mismo, el mayor poder reductor se observa el día de preparación con $0.12 \pm 2.20 \times 10^{-3}$ mmol AA/g de hojas. Esto sugiere que posiblemente ocurre una descomposición

de los componentes de interés para llevar a cabo la síntesis, acompañada de la generación de subproductos que no son de utilidad para la reducción de los iones de Au(III) a Au(0).

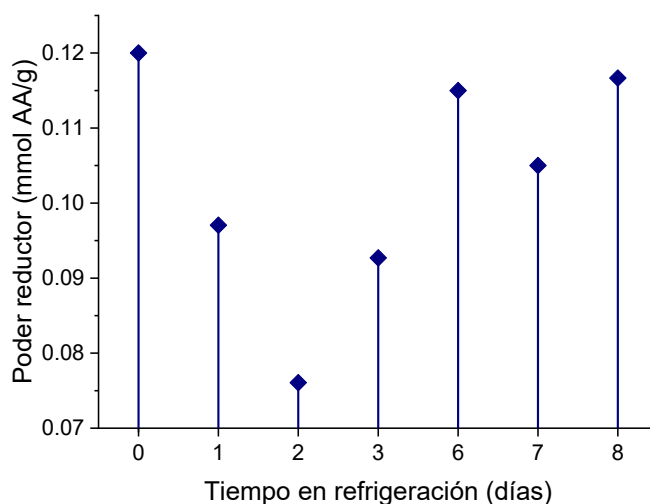


Figura 3.1.3.1. Análisis del poder reductor del ECM al 1 % respecto a los días en almacenamiento a 4 °C, mediante CUPRAC.

Además de que la reducción del oro(III) a oro elemental tiene un potencial estándar de reducción mayor que la reducción del hierro(III) a hierro(II), lo que quiere decir que aunque la reactividad de los compuestos del extracto cambien con el tiempo, son capaces de reducir los iones de Fe(III) pero no necesariamente efectivos para reducir Au(III). A continuación se presentan las semi-reacciones de reducción con su correspondiente potencial estándar de reducción en relación a un electrodo estándar de hidrógeno y condiciones estándar de presión y temperatura [164]:



Otro experimento se realizó con el ECM al 1 % mediante la técnica FRAP, obteniéndose que el extracto fresco presenta un poder reductor de $0.04 \pm 6.04 \times 10^{-4}$ mmol AA/g de hojas.

3.1.4. Conclusiones Parciales

- Es importante considerar la humedad presente en las hojas de Chaya maya al momento de preparar el extracto, ya que las hojas secas tienden a absorben una considerable cantidad de agua el momento de la preparación del mismo.

- La elección del solvente a utilizar para la obtención del extracto es esencial pues de ello depende el tipo de componentes que se logren extraer. Para los fines de este trabajo, el empleo de un sistema simple realizando la extracción en medio acuoso fue más favorable.
- La complejidad del extracto dificulta la identificación de sus componentes principales. Sin embargo, las señales características de compuestos polifenólicos lograron distinguirse por sus desplazamientos mediante Raman.
- La capacidad antioxidante del extracto es buena, aunque no necesariamente está directamente relacionada con su capacidad de reducir los iones de nuestro interés.
- La implementación de hojas frescas para la preparación del extracto trae consigo algunas desventajas como la relativamente rápida descomposición del extracto y el riesgo de la variación estacional del contenido de fenoles totales y flavonoides, obteniendo diferentes resultados dependiendo la época del año en la que sean cosechadas las hojas.

3.2. SÍNTESIS DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO USANDO EL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA COMO AGENTE REDUCTOR

Como un estudio preliminar, se llevó a cabo la síntesis de AuNPs únicamente en presencia del extracto acuoso, esto con la finalidad de evaluar la capacidad del extracto para reducir los iones de Au^{3+} a Au^0 . Se variaron la concentración del extracto y del precursor para conocer las condiciones de síntesis más adecuadas, manteniendo en todo momento las condiciones de presión y temperatura ambiente.

Las reacciones se siguieron mediante espectroscopía UV-vis y DLS. Las mediciones mediante DLS se realizaron por triplicado y son expresados como el promedio de la distribución por intensidad.

3.2.1. Influencia de la concentración del precursor de oro

Manteniendo constante la concentración del extracto acuoso de hojas de chaya maya (ECM) al 2 %, se probaron diferentes concentraciones de Au(III), desde 0.25 mM hasta 1.52 mM. En la **Figura 3.2.1 a**, se presenta el gráfico de la Absorbancia máxima de la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPRB) a 523 nm respecto al tiempo para las nanopartículas obtenidas con el ECM al 2 % desde el inicio hasta los 90 minutos de reacción. Como se puede observar, en la mayoría de los casos ocurre una pérdida considerable en la absorbancia de la banda durante los primeros 20 min debida a que el extracto, aunque es capaz de reducir rápidamente el precursor de oro, no tiene un control sobre el crecimiento de la nanopartícula formada.

Relacionando la absorbancia máxima con la concentración de AuNPs producidas, al inicio de la reacción se obtiene una menor cantidad de AuNPs con la menor concentración de precursor (0.25 mM). Sin embargo, esta se mantiene relativamente constante por un periodo de tiempo mayor. Esto se debe a que al tener una menor concentración de iones Au^{3+} en el medio, estos son consumidos casi por completo inmediatamente después del inicio de la reacción, quedando limitado su crecimiento por la difusión y aglomeración entre las partículas formadas, las cuales son estabilizadas parcialmente por el extracto. Eventualmente ocurre la desestabilización de las partículas.

Seguindo la SPRB (**Figura 3.2.1 b**) respecto al tiempo en reacción, se puede deducir que el mecanismo de formación de las partículas de oro inicia antes del primer minuto de reacción convirtiendo los iones de oro(III) a oro coloidal. Estudios teóricos y experimentales [165, 166] muestran que, además del desplazamiento hacia el rojo que viene acompañado con el crecimiento de nanopartículas esféricas, ocurre una disminución en la absorbancia máxima de la SPRB cuando su tamaño tiende a ser mayor que 80 nm. La significativa disminución de la SPRB podría deberse al crecimiento descontrolado e irreversible de las partículas coloidales de oro, probablemente debido a la maduración de Ostwald, el cual se ve limitado por la concentración de precursor. Esto quiere decir que, los componentes del extracto no ayudan a estabilizar la carga superficial de las nanopartículas formadas inicialmente, resultando en un crecimiento descontrolado hasta tener tamaños de partícula macroscópicos.

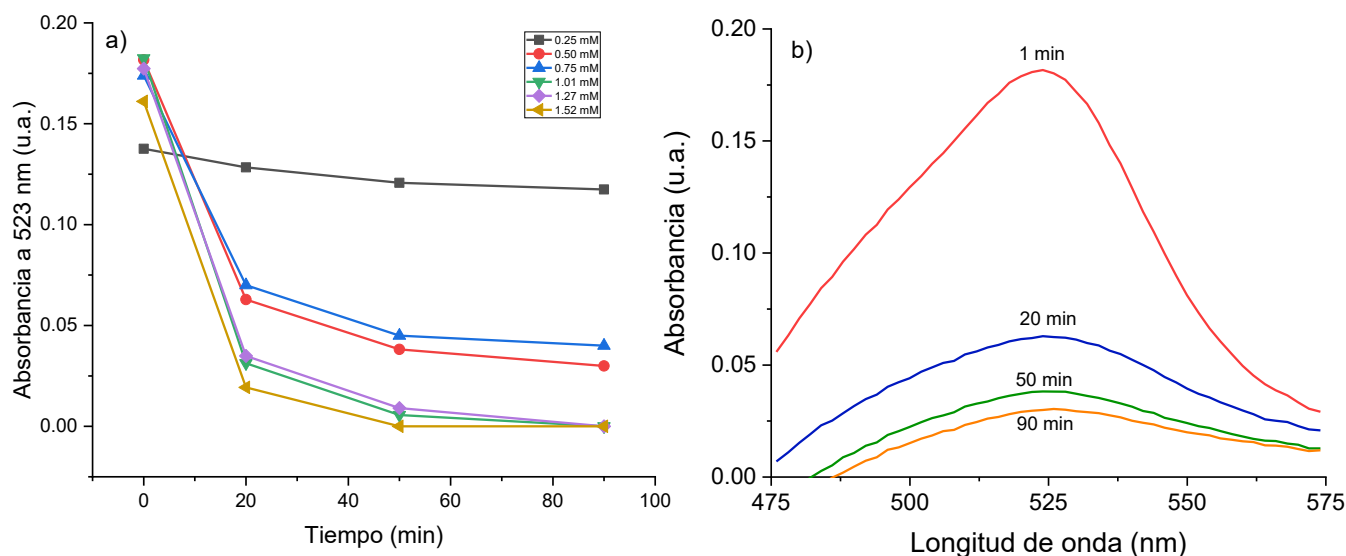


Figura 3.2.1. a) Gráfica de la absorbancia de la SPRB a 523 nm respecto al tiempo de reacción de las nanopartículas obtenidas con el ECM al 2% con diferentes concentraciones de precursor de oro. b) espectros UV-Vis de la SPRB de las AuNPs sintetizadas con 0.50 mM y el ECM al 2 % a diferentes tiempos de reacción.

Mediante DLS se logró observar un incremento en el radio hidrodinámico de las partículas respecto al tiempo de reacción. En la **Figura 3.2.2** se observa el gráfico de distribución de tamaños por intensidad para 5 y 90 minutos de reacción. Las AuNPs cuando la $[Au^{3+}] = 0.25$ mM (a) tienen inicialmente un tamaño promedio igual a 213.4 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.147, creciendo hasta 348.5 nm después de 90 min de reacción y aumentando también el PDI a 0.236. Partiendo de $[Au^{3+}] = 0.50$ mM (b), el tamaño promedio al principio de la reacción es de 171.2 nm, después crecieron hasta 238.48 nm. Tendencias similares se observaron para las muestras de mayor concentración de oro.

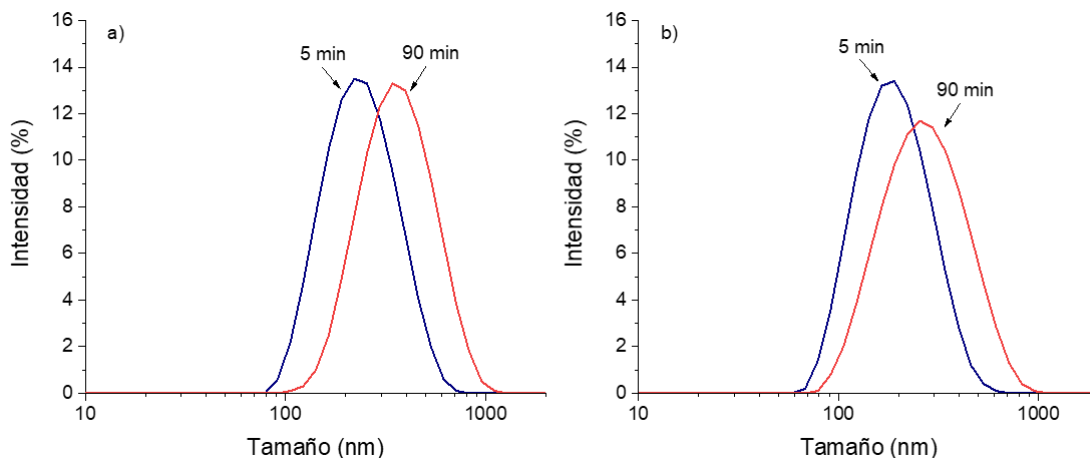


Figura 3.2.2. Gráficos de distribución de tamaños por intensidad después de 5 y 90 minutos de reacción con una concentración de Au³⁺ de a) 0.25 mM y b) 0.50 mM, manteniendo la concentración del ECM al 2 %.

En la **Figura 3.2.3** se muestra un gráfico del tamaño promedio de partícula después de 90 min de reacción para cada una de las muestras. Como se puede observar, las AuNPs alcanzan un tamaño de partícula menor cuando se tiene una mayor concentración de oro en el sistema. Esto puede deberse a que, al tener más núcleos formados después de la inmediata reducción, alcanzan más rápidamente el tamaño de partícula promedio y como consecuencia las partículas son de menor tamaño.

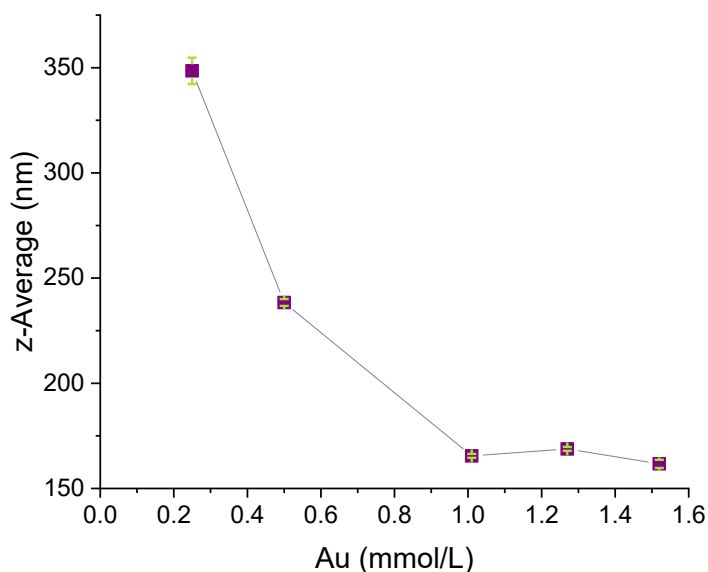


Figura 3.2.3. Tendencia del tamaño de partícula promedio de las AuNPs sintetizadas con ECM al 2 % y diferentes concentraciones de Au después de 90 min. Mediante DLS.

Siguiendo con intervalos de tiempo más cortos el tamaño de partícula mediante DLS se puede observar que existe un constante crecimiento respecto al tiempo de reacción (**Figura 3.2.4**). Entre 1 y 10 min en reacción se tiene el crecimiento de tamaño más notorio. También se logra observar que a partir de 30 min comienzan a aparecer dos distribuciones de tamaño, un pico alrededor de los 300 nm y el segundo pico en el orden de los micrómetros, sugiriendo que la maduración de Ostwald podría estar ocurriendo después de 20 min en reacción. En la **Tabla 3.2-1** se muestran los datos del tamaño registrado en el pico medio y el área de pico por intensidad. La formación de partículas micrométricas después de 20 min puede relacionarse con la disminución de la SPRB observada en el espectro UV-vis.

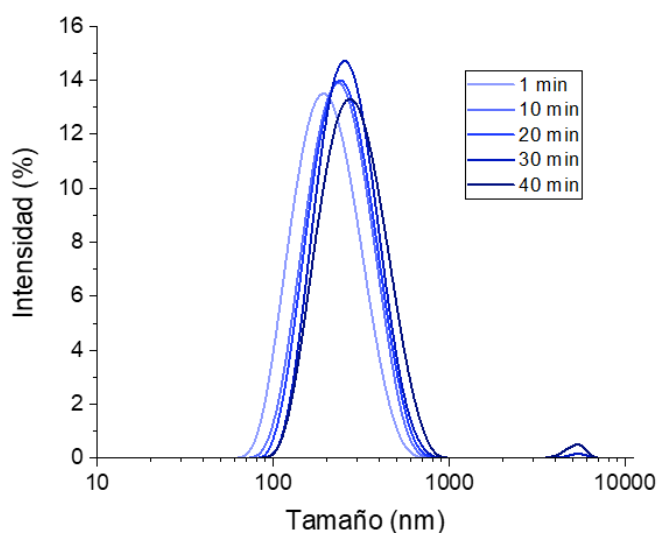


Figura 3.2.4. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad obtenidos mediante DLS de las AuNPs sintetizadas con ECM 2 % y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.

Tabla 3.2-1. Distribución del tamaño medio y porcentaje de intensidad de las AuNPs sintetizadas con ECM 2 % y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.

Tiempo (min)	Tamaño (nm)	Área de pico (%)
1	214.5	100.0
10	251.7	100.0
20	263.0	100.0
30	278.7	99.6
40	1 691	0.4
	5 086	1.1

Para el resto de la experimentación se decidió trabajar con una concentración de oro de 0.75 mM ya que, de las muestras más concentradas, es la que presenta una menor pérdida en la banda SPR.

3.2.2. Influencia de la concentración del extracto

Se probaron cinco diferentes concentraciones del ECM para la síntesis de las AuNPs, 0.5, 1, 2, 3 y 4 % (m/V) manteniendo fija la concentración de oro igual a 0.75 mM. En la **Figura 3.2.5** se presentan los espectros UV-vis de las AuNPs, utilizando como blanco el extracto de chaya maya con la concentración correspondiente.

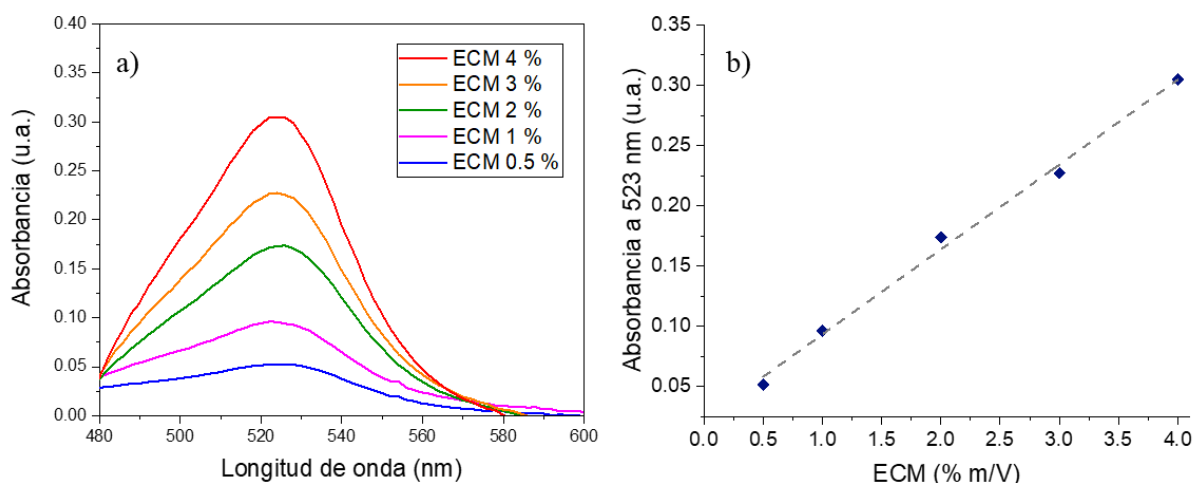


Figura 3.2.5. Resultados de las AuNPs sintetizadas con el ECM a diferentes concentraciones manteniendo la concentración del precursor a 0.75 mM a) SPRB observada mediante espectroscopía UV-vis. b) Gráfica de la tendencia de la Absorbancia a 523 nm respecto a la concentración del ECM.

Al medir la absorbancia de la SPRB un minuto después de entrar en contacto el precursor con el reductor se obtiene una tendencia directamente proporcional a la concentración del extracto con $R^2 = 0.99498$ (Figura 3.2.5 b). Obteniendo que, a mayor concentración del extracto, se tiene una mayor cantidad de AuNPs. Esto quiere decir que la producción de las nanopartículas está limitada por la concentración de agente reductor en el medio de reacción. Al tener una concentración baja del extracto, se tiene una menor cantidad de los componentes

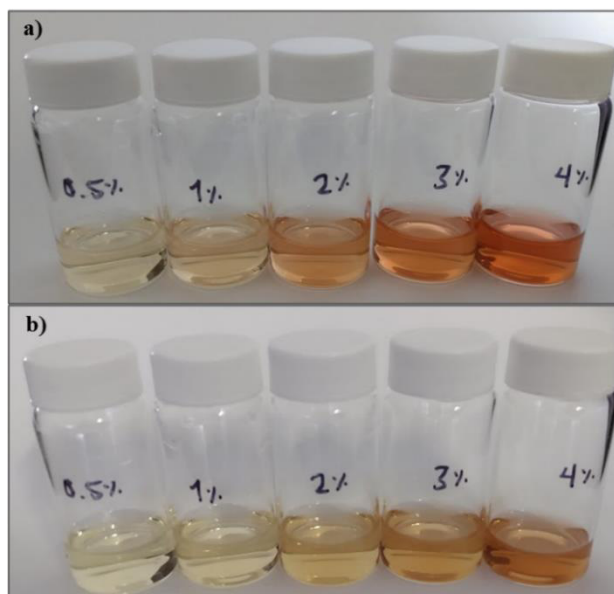


Figura 3.2.6. Aspecto de las AuNPs sintetizadas con diferentes concentraciones de ECM después de a) un minuto de reacción y b) 25 minutos de reacción.

involucrados en la reacción de reducción, por lo tanto, se formarán menos núcleos de Au(0) quedando fracciones de Au(III) sin reducir.

Visualmente se puede distinguir una clara diferencia en las tonalidades de cada coloide, teniendo inicialmente suspensiones de oro coloidal que van de amarillo-naranja hasta naranja-rojizo, para la solución con el extracto más concentrado. Como se puede observar en la **Figura 3.2.6**, ocurre un cambio en la coloración de las soluciones después de 25 minutos de reacción. Mediante espectroscopía UV-vis se observa el decaimiento de la SPRB (**Figura 3.2.7**), esta disminución respecto al tiempo de reacción coincide con lo observado en el experimento anterior, reflejando la desventaja del uso de extractos naturales sin algún otro tipo de estabilizador. Una observación adicional es que después de 24 horas en el medio de reacción se distingue la presencia de partículas suspendidas que reflejan la luz. Todas estas observaciones sugieren que el extracto no logra controlar el crecimiento de las partículas y que, posiblemente, las partículas formadas inicialmente sirvan como superficies activas para la adsorción y autorreducción de más iones de Au(III) sobre la superficie, favoreciendo el crecimiento de la partícula.

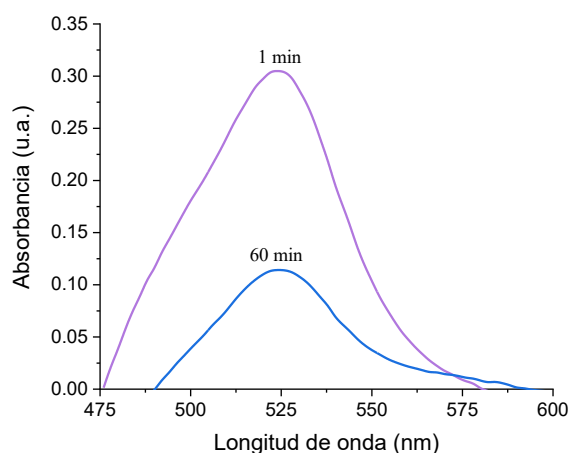


Figura 3.2.7. Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas directamente con el ECM al 4 % después de diferentes tiempos en reacción.

Las mediciones por DLS de las nanopartículas obtenidas en el presente experimento no son confiables, ya que las muestras presentan una alta polidispersidad (PDI de hasta 0.6). Las partículas más grandes encontradas en estos sistemas dispersan en mayor medida la luz comparada con las pequeñas y, por lo tanto, la medición del tamaño mediante esta técnica tendría alta dispersión. Al tener una reacción en constante evolución la función de correlación tiende a errores significativos, además de que podría estar ocurriendo un proceso de

aglomeración. Como se presenta en la **Figura 3.2.8**, las tres corridas realizadas sobre una misma muestra varían considerablemente entre cada medición, presentando de dos a tres distribuciones de tamaño diferentes (**Tabla 3.2-2**). Se observó un comportamiento parecido en las otras muestras.

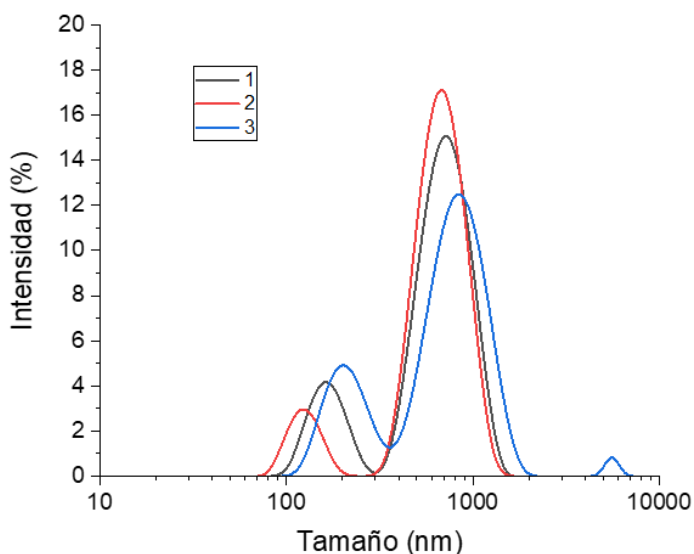


Figura 3.2.8. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad obtenidos mediante DLS de las AuNPs sintetizadas con ECM 4% y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.

Tabla 3.2-2. Distribución del tamaño medio y porcentaje de intensidad de las AuNPs sintetizadas con ECM 4 % y $[Au^{3+}]$ 0.75 mM.

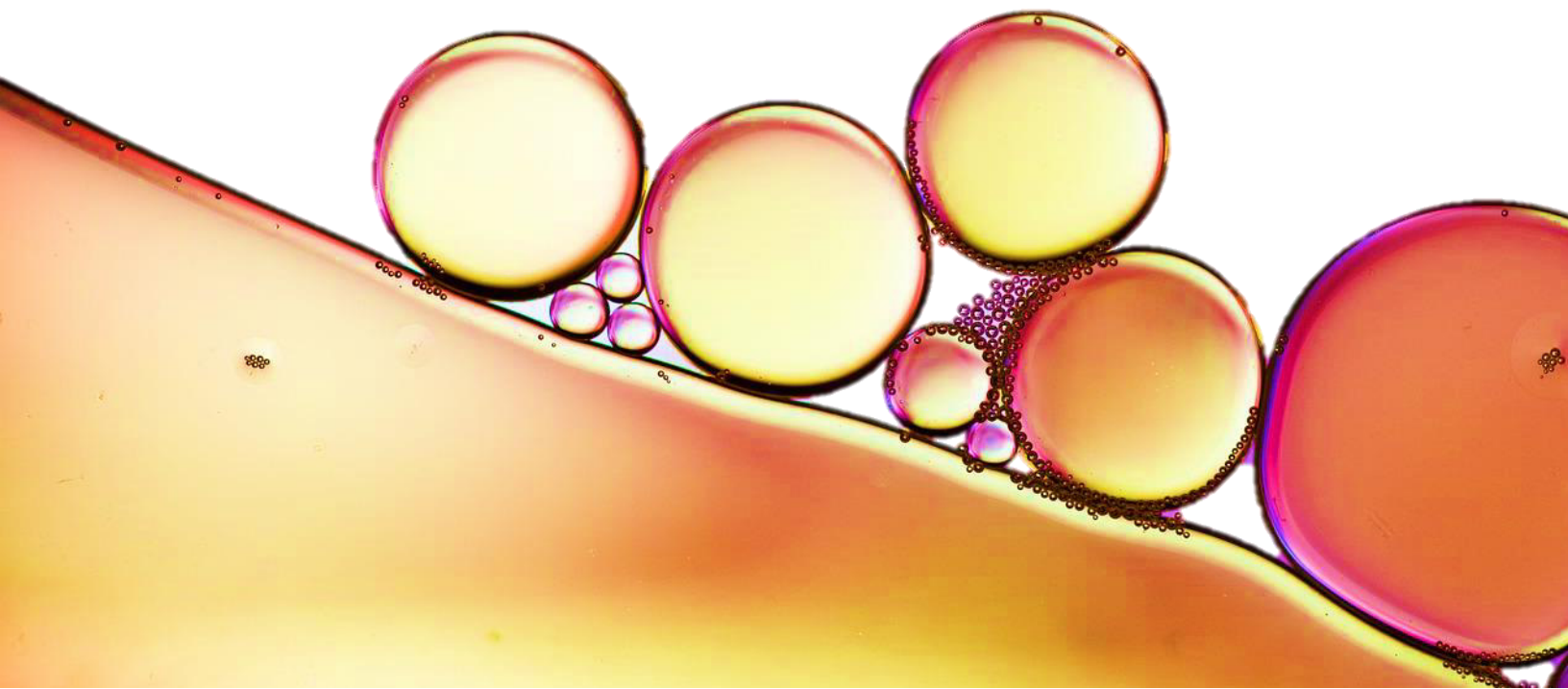
Corrida	Tamaño $\pm \sigma$ (nm)	Área (%)
1	735.3 \pm 208.1	82.9
	167.8 \pm 35.04	17.1
2	697.6 \pm 126.7	89.2
	126.7 \pm 23.09	10.8
3	860.4 \pm 281.1	75.6
	213.8 \pm 53.51	23.1
	5 560 \pm 0.000	1.20

3.2.3. Conclusiones Parciales

- El extracto acuoso de hojas de *C. chayamansa*, tiene la capacidad de reducir los iones de oro (III) a oro elemental. Presentando una reacción de reducción rápida.
- No es posible controlar el crecimiento de las nanopartículas formadas inicialmente. Los componentes del extracto no logran estabilizar las superficies de los núcleos formados para evitar el crecimiento por aglomeración.
- La concentración de precursor tiene influencia sobre el tamaño que alcanzan las partículas dentro de las primeras horas de reacción.
- La concentración del extracto tiene una dependencia lineal con la cantidad de nanopartículas producidas al inicio de la reacción.

CAPÍTULO 4

Sistemas microemulsionados y nano-emulsionados como nano-reactores para la síntesis de nanopartículas de oro utilizando extracto acuoso de hojas de chaya maya como reductor
RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. SISTEMAS MICROEMULSIONADOS Y NANO-EMULSIONADOS COMO NANO-REACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO UTILIZANDO EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE CHAYA MAYA COMO REDUCTOR

Este cuarto capítulo comprende el estudio del comportamiento fásico y la reactividad que tienen los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados formulados con los componentes ya descritos, empleando el extracto acuoso de hojas de chaya maya (ECM) y una solución estándar de oro(III) como fase acuosa. Principalmente se discuten los resultados de la caracterización de las AuNPs obtenidas usando los sistemas como nano-reactores, y su influencia sobre la formación de las nanopartículas. Y finalmente, se presentan los resultados del estudio realizado de la influencia del pH en la formación de las AuNPs.

4.1.1. Comportamiento fásico de los sistemas

El estudio del comportamiento fásico de los sistemas con el método de titulación, siguiendo las líneas de dilución de la **Figura 2.2.3**, permitió delimitar la zona multifásica, en la cual las mezclas se apreciaban opacas y turbias, y eventualmente ocurría la separación de fases. En la **Figura 4.1.1.1** se presentan los sistemas con una relación inicial O/S:C (indicada en cada tubo) y tituladas con 100 % de fase acuosa. Como se puede observar, las relaciones 90/10 y 80/20 se mantienen monofásicas en el equilibrio, Winsor tipo IV, cuando se tiene hasta el 100 % de fase acuosa. Entre 70/30 y 40/60 se tienen sistemas Winsor tipo III donde las fases oleosa y acuosa sin solubilizar coexisten con una fase intermedia de emulsión. A partir de 30/70 el exceso de fase acuosa se mantiene en la parte inferior (Winsor tipo II). En ningún momento se observó la presencia de cristales líquidos.

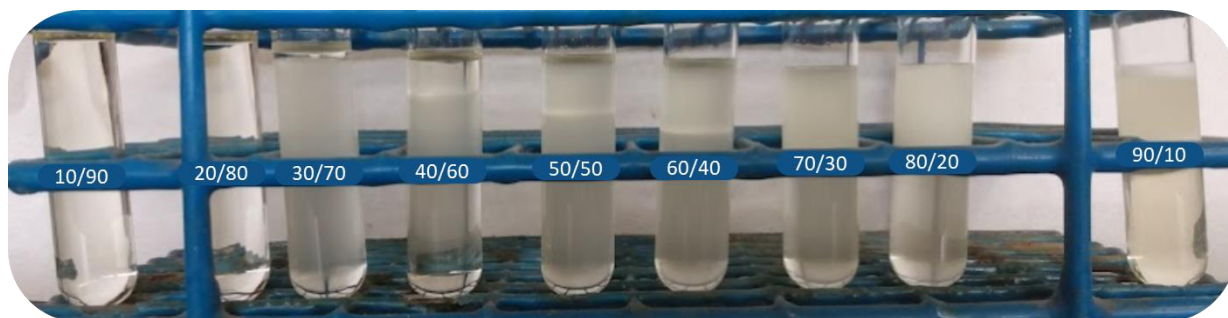


Figura 4.1.1.1. Mezclas con relación inicial O/S:C tituladas con 100 % de fase acuosa.

Realizando un mapeo en la zona monofásica con el método de pesaje directo, se reveló una zona amplia de nano-emulsión que pertenece a la zona multifásica ya que al someterlas a las condiciones descritas en la metodología se inducía la separación de fases. En cambio, las microemulsiones se mantuvieron monofásicas y transparentes en todo momento. Para la formulación de microemulsiones, generalmente se requirió más de 45 % de surfactante. En la **Figura 4.1.1.2** se presenta el diagrama pseudo-ternario de fases del sistema O/ S:C (1:1) /ECM obtenido a 25 °C, donde se indican las zonas de microemulsión (μE), nano-emulsión (nE) y multifásica (2Φ).

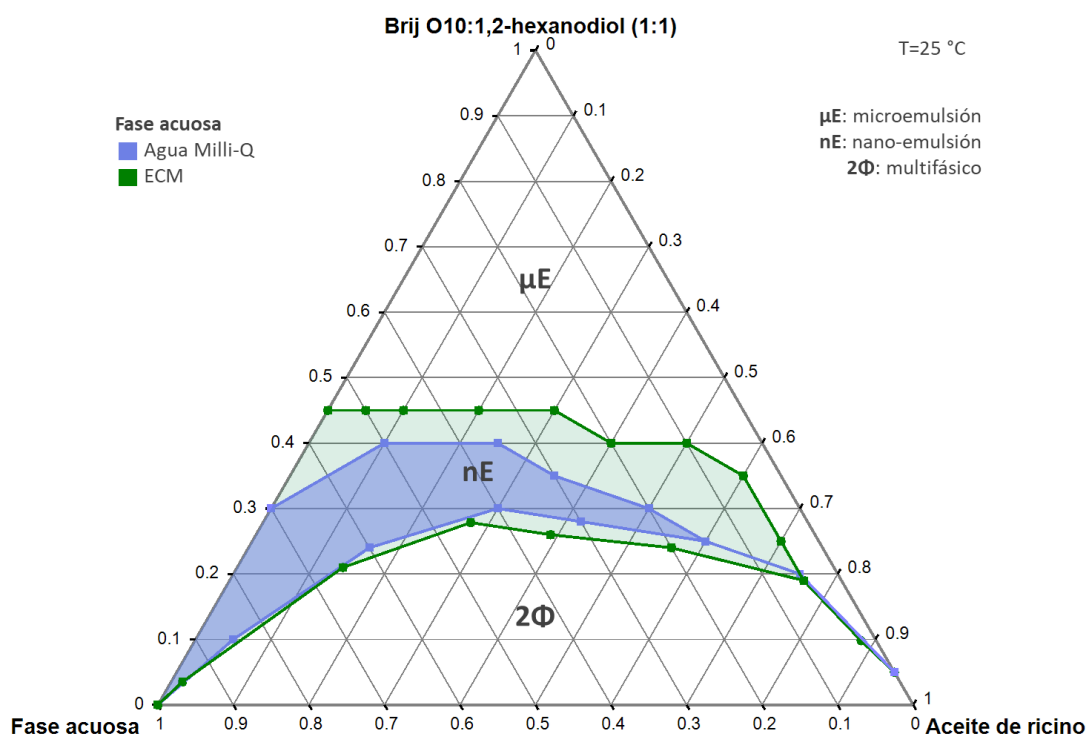


Figura 4.1.1.2. Diagrama de fases pseudo-ternario que muestra las distintas zonas del sistema fase acuosa/Brij O10:1,2-hexanodiol (1:1) /Aceite ricino. Obtenido a 25 °C. Comparando las zonas de nE cuando se tiene como fase acuosa agua Milli-Q o el ECM.

El diagrama pseudo-ternario de fases obtenido con el ECM como fase acuosa presenta una zona 2Φ muy similar a la encontrada por Rivera-Rangel [167] para los mismos sistemas utilizando agua Milli-Q como fase acuosa (**Figura 4.1.1.2**). Sin embargo, al cambiar la fase acuosa por ECM la zona de μE se observa reducida significativamente, sobre todo cuando se tiene más de 30 % de aceite en el sistema y, en general, se requiere más surfactante para mantener el sistema monofásico. Esto puede deberse a la complejidad del ECM, que presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos que, por su polaridad, pueden estar

interaccionando con los grupos etoxilo e hidroxilo del surfactante y co-surfactante, generando una insuficiente adsorción en la interfase agua/aceite.

Conductividad

El estudio de conductividad realizado sobre la línea de dilución 30/70 (O/S:C) muestra cuatro tendencias lineales, lo que sugiere que conforme se adiciona más cantidad fase acuosa ocurren cambios en las microestructuras del sistema. Las tendencias son las mismas cuando se adiciona al sistema el ECM (**Figura 4.1.1.3 a**) y la solución estándar de oro (**Figura 4.1.1.3 b**) como fase acuosa. Se asignaron microestructuras del tipo W/O cuando se tiene menos del 25 % de fase acuosa en el sistema. Entre 25 y 50 % ocurre un cambio en la tendencia, asignándolo a estructuras bicontinuas. Cuando se tiene más de 50 % de fase acuosa la conductividad incrementa en mayor medida conforme se adiciona más fase acuosa, teniendo microestructuras del tipo O/W.

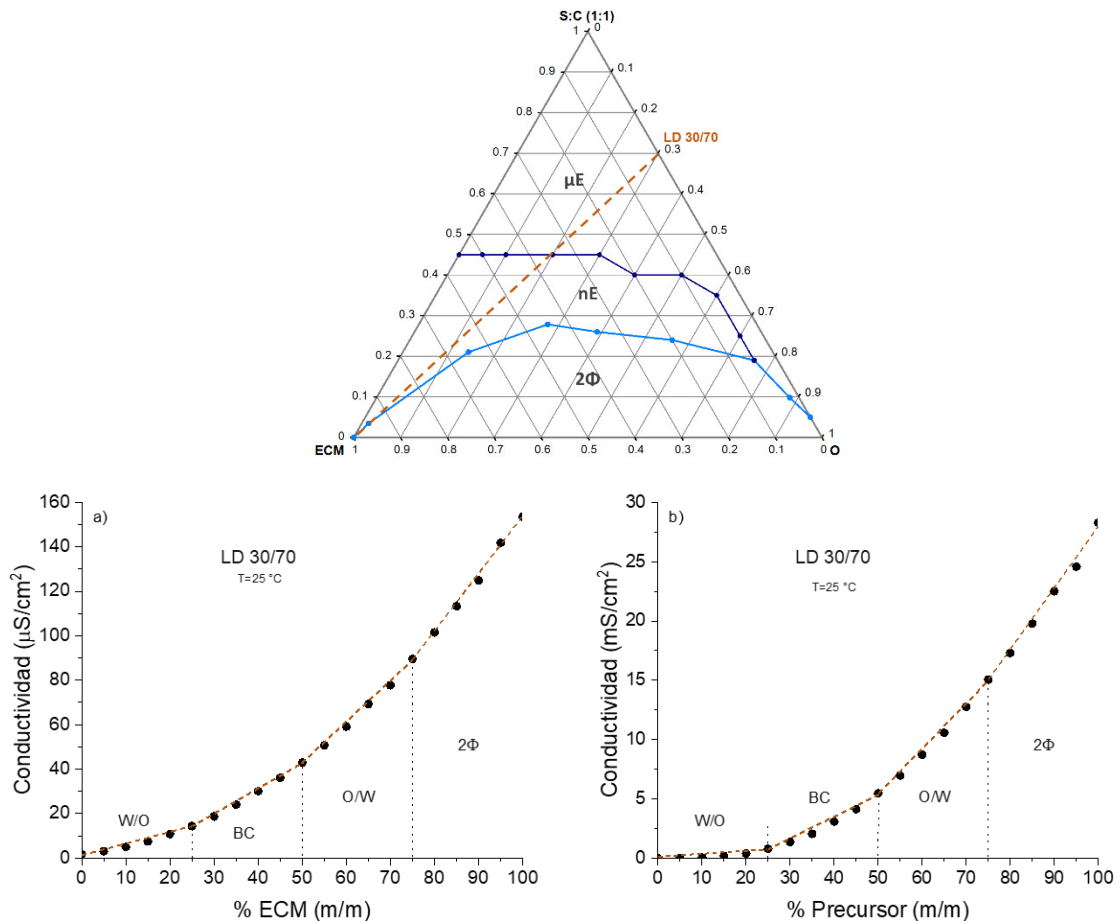


Figura 4.1.1.3. Curvas de conductividad siguiendo la línea de dilución 30/70 (diagrama) adicionando a) ECM y b) solución estándar de oro como fase acuosa.

A partir de 75 % de fase acuosa ocurre la separación de fases, este cambio en el límite multifásico puede deberse a un efecto de salting-out debido al exceso de la sal y del ácido inorgánico ocasionando la pérdida de solubilidad [168]. Cuando se adiciona el precursor como fase acuosa, nótese que las unidades cambian de $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ a mS/cm^2 , este gran incremento en la conductividad se debe a que los iones hidronio en el medio pueden estar protonando los grupos etoxilo del surfactante adsorbido en la interfase promoviendo el movimiento de cargas [169], además de la presencia de los iones Au^{3+} y Cl^- disociados en el medio.

4.1.2. Caracterización de las AuNPs

Se probaron una serie de composiciones para la obtención de AuNPs en los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados. Las composiciones de cada punto probado se presentan en la **Tabla 2.2-1**. Un ligero cambio en la coloración del sistema indicó el inicio de la reacción, la coloración final que adquirió el sistema coloidal se alcanzó después de 100 minutos de reacción.

Banda de resonancia de plasmón de superficie (SPRB)

En la **Figura 4.1.2.1** se presentan los espectros de las nanopartículas obtenidas en las diferentes composiciones. En la **Figura 4.1.2.1 a** se presentan los espectros de las muestras A, B2 y C3 que contienen la menor cantidad de fase acuosa evaluada (30 %), como se puede observar, presentan la SPRB más anchas y con menor absorbancia, características de AuNPs de tamaños muy pequeños [43]. La coloración en A y B2 es rosa claro. En C3 esta coloración rosada es apenas perceptible, con una absorbancia mínima de 0.099 a $\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$, aunque la cantidad de fase acuosa es la misma, la cantidad de surfactante para ayudar a estabilizar la interfase en C3 es menor.

Al incrementar un 5 % la cantidad de fase acuosa en el sistema (**Figura 4.1.2.1 b**) se aprecia inmediatamente una coloración magenta de las AuNPs, la SPRB aumenta su intensidad y se muestra mucho más definida, lo que sugiere que ocurre un incremento de tamaño por la forma de la banda. Además de obtener una mayor cantidad de AuNPs sintetizadas, debido al incremento de la fase acuosa que está relacionada con la concentración de precursor y reductor en el medio. También se observa que la SPRB de la muestra B está ligeramente desplazada hacia el rojo, esto puede relacionarse con una diferencia en el tamaño de nanopartículas obtenidas en

ambas muestras, siendo las de la muestra B de mayor tamaño. El contenido de surfactante para C2 es 5 % mayor que para B, lo que podría ayudar a controlar el crecimiento de estas.

Las muestras C y D (Figura 4.1.2.1 c), con una cantidad de fase acuosa igual a 40 %, presentan una coloración muy distinta y los espectros UV-vis correspondientes también se observan distintos. El espectro de la muestra D presenta un alargamiento de la banda y un desplazamiento de la $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 536 nm, su composición se encuentra en el límite entre μ E y nE, por lo que el cambio en la estabilidad del sistema en ese límite podría estar influyendo en el tamaño o en la polidispersidad de las AuNPs formadas.

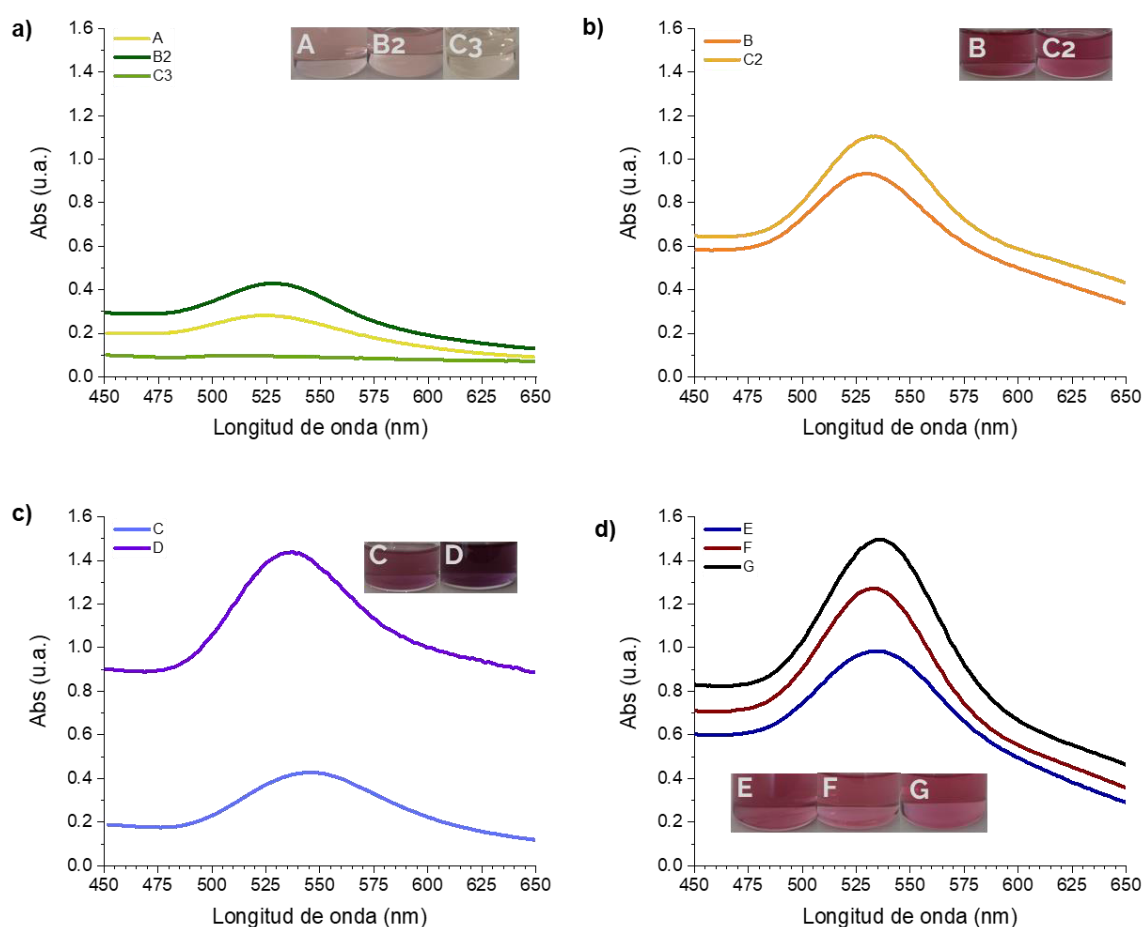


Figura 4.1.2.1. Espectro UV-vis las AuNPs obtenidas en las composiciones a) A, B2 y C3; b) B y C2; c) C y D y; d) E, F y G. En los recuadros se presenta el aspecto físico de los sistemas coloidales después de 100 minutos de reacción en los sistemas de microemulsión y nano-emulsión.

Los puntos E, F y G con 50, 55 y 60 % de fase acuosa, respectivamente, fueron sintetizadas en nano-emulsiones del tipo O/W. Las tres muestras presentan una coloración muy similar y una $\lambda_{m\acute{a}x}$ alrededor de a 533 nm. El ancho de la SPRB disminuye a mayor cantidad de

fase acuosa (**Figura 4.1.2.1 d**), por lo que las muestras con bandas más anchas podrían tratarse de AuNPs de menor tamaño. Además de que se observa un desplazamiento hacia el rojo de la $\lambda_{m\acute{a}x}$ en el orden siguiente E, F y G, esto también se relaciona con un incremento en el tamaño de las nanopartículas. La intensidad de las bandas corresponde a la cantidad de fase acuosa en el sistema, lo que se podría relacionar con la concentración de AuNPs obtenidas. En la **Tabla 4.1.2-1** se presentan las longitudes de onda máxima de la SPRB de cada una de las AuNPs.

Tabla 4.1.2-1. Longitud de onda máxima de las AuNPs sintetizadas en los sistemas micro y nano-emulsionados con diferentes composiciones O/S:C/W.

Muestra	Composición (O/S:C/W)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
A	(10/60/30)	527.6
B2	(15/55/30)	525.9
C3	(20/50/30)	521.5
B	(10/55/35)	529.1
C2	(15/50/35)	532.4
C	(10/50/40)	544.9
D	(10/45/45)	536.4
E	(10/40/50)	532.7
F	(10/35/55)	532.8
G	(10/30/60)	536.0

Se probó una composición (N) a menor cantidad de fase oleosa (5 %). Sin embargo, no se observó reacción aparente, el sistema se mantuvo sin cambios de coloración y tras la centrifugación no se separó material sólido. Esto indica que la fase oleosa está involucrada con la reactividad de los sistemas.

Tamaño de nanopartícula

Para determinar el tamaño de nanopartícula se midió el R_H de las AuNPs obtenidas en cada composición, resuspendidas en agua. Los gráficos de distribuciones de tamaño por intensidad indican que se tratan de muestras de alta polidispersidad, presentando de una a tres distribuciones de tamaño diferentes. En la **Figura 4.1.2.2** se presenta el gráfico de distribución de tamaños por intensidad de las muestras E, F y G. Como se puede observar, las nanopartículas E presentan tres distribuciones de tamaño, las más pequeñas alrededor de 30 nm, otras en 200 nm y una pequeña distribución de partículas de gran tamaño alrededor de 5010 nm. Las AuNPs F incrementan las distribuciones de tamaños hasta 90 nm, 430 nm y 5280 nm. En el caso de la

muestra G, solo presenta dos distribuciones que también se observan desplazadas a mayor tamaño, 92 nm y 560 nm, respectivamente. Esto puede estar relacionado con la anisotropía de las muestras, esto quiere decir, que las AuNPs obtenidas no presenten morfologías esféricas.

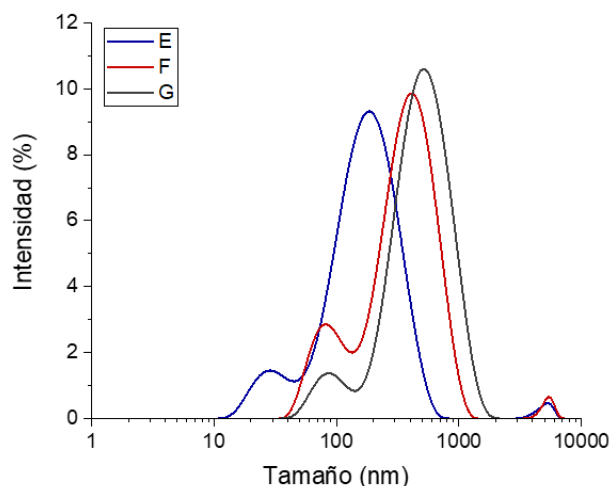


Figura 4.1.2.2. Gráfica de la distribución del tamaño de partícula obtenido mediante DLS por intensidad de las muestras E, F y G.

Debido a la polidispersidad que presentan las muestras el tamaño promedio (z-Average) por intensidad medido con DLS no es una herramienta determinante para conocer el tamaño promedio de las muestras. Para complementar las observaciones obtenidas por DLS se midió el diámetro de partícula a partir de las micrografías STEM. En la **Figura 4.1.2.3 a y b** se presentan los gráficos del tamaño de partícula promedio obtenidos mediante DLS y STEM, respectivamente. Cabe destacar que los tamaños de partícula promedio obtenidos mediante DLS son mucho mayores que los observados por STEM ya que se está midiendo el R_H de la nanopartícula, la materia orgánica que se encuentre recubriendo las nanopartículas se verá reflejada en las mediciones, además de la aglomeración y anisotropía que presenten las muestras.

Realizando una comparación entre los resultados de ambas técnicas, se observa que los tamaños las nanopartículas tienen un comportamiento similar, que se puede relacionar con el comportamiento fásico del sistema. Las muestras B2, C2 y D que tienen la misma cantidad de aceite (15 %) fueron sintetizadas en μ E bicontinuas y al adicionar más cantidad de fase acuosa (de 30 a 40 %) estas incrementan su tamaño. Lo mismo se observa en STEM para las muestras B2 (19.8 ± 6.5 nm) y C2 (24.9 ± 6.5 nm). En estas composiciones tanto la fase acuosa como la fase oleosa se encuentran como fases dispersas y el crecimiento de las AuNPs estará delimitado

por el tamaño de los canales de fase acuosa de la microestructura bicontinua, por lo que al incrementar la fase acuosa se esperan tamaños de nanopartícula mayores.

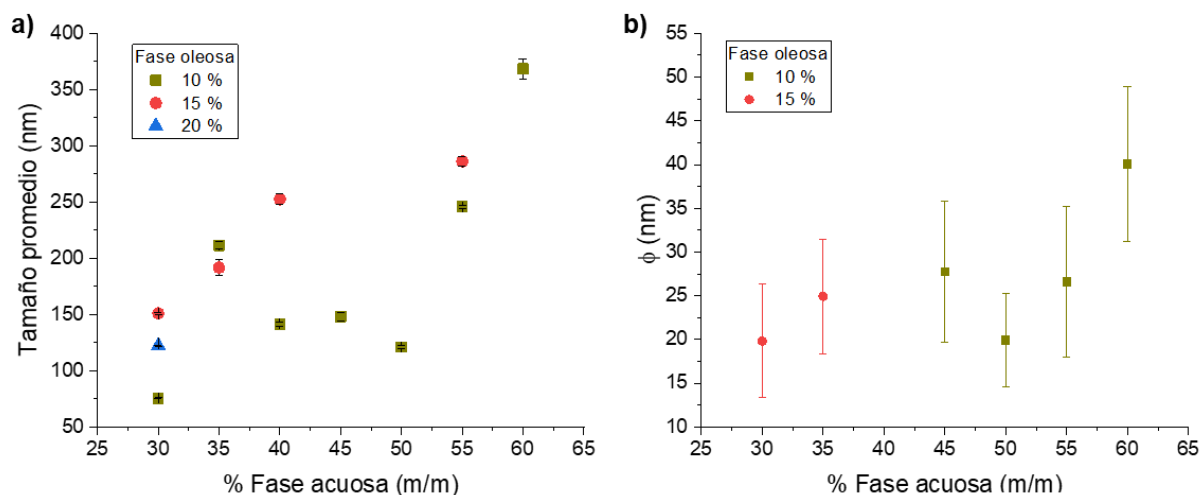


Figura 4.1.2.3. Distribución de tamaño de partícula promedio de las AuNPs sintetizadas en diferentes composiciones, obtenido mediante a) DLS y b) STEM.

Las muestras E, F y G se sintetizaron en nE del tipo O/W con 10 % de fase oleosa y parecen seguir una tendencia lineal conforme se adiciona mayor cantidad de fase acuosa (de 50 a 60 %). Los tamaños de partícula promedio fueron de 19.9 ± 5.3 nm, 26.6 ± 8.6 nm y 40.1 ± 8.8 nm, respectivamente, teniendo el mayor tamaño de nanopartícula cuando se tiene mayor cantidad de fase acuosa (muestra G). Aunado a esto, la cantidad de surfactante en el sistema disminuye conforme se tiene más fase acuosa, por lo que al surfactante se le puede atribuir el control sobre el crecimiento de las nanopartículas. En D (27.7 ± 8.1 nm) ocurre la transición de μ E a nE, por esta razón es que con ambas técnicas se observa que la tendencia en el crecimiento del tamaño de partícula cambia.

Observando las micrografías STEM presentadas en la **Figura 4.1.2.4**, se pueden distinguir que las AuNPs adquieren morfologías esféricas y, cuando las nanopartículas son notablemente más grandes, se alcanzan a distinguir morfologías poliédricas, lo cual se puede relacionar con las dispersiones observadas mediante DLS. Las AuNPs que presentan menor tamaño son las muestras B2 y E (**Figura 4.1.2.4 a y e**) y se puede apreciar que alcanzaron un mayor tamaño las AuNPs de la muestra G (**Figura 4.1.2.4 f**). Las AuNPs D (**Figura 4.1.2.4 c**) presentan un mayor grado de aglomeración y en el histograma se tiene una mayor distribución de tamaños, lo que refleja la inestabilidad del sistema en ese punto.

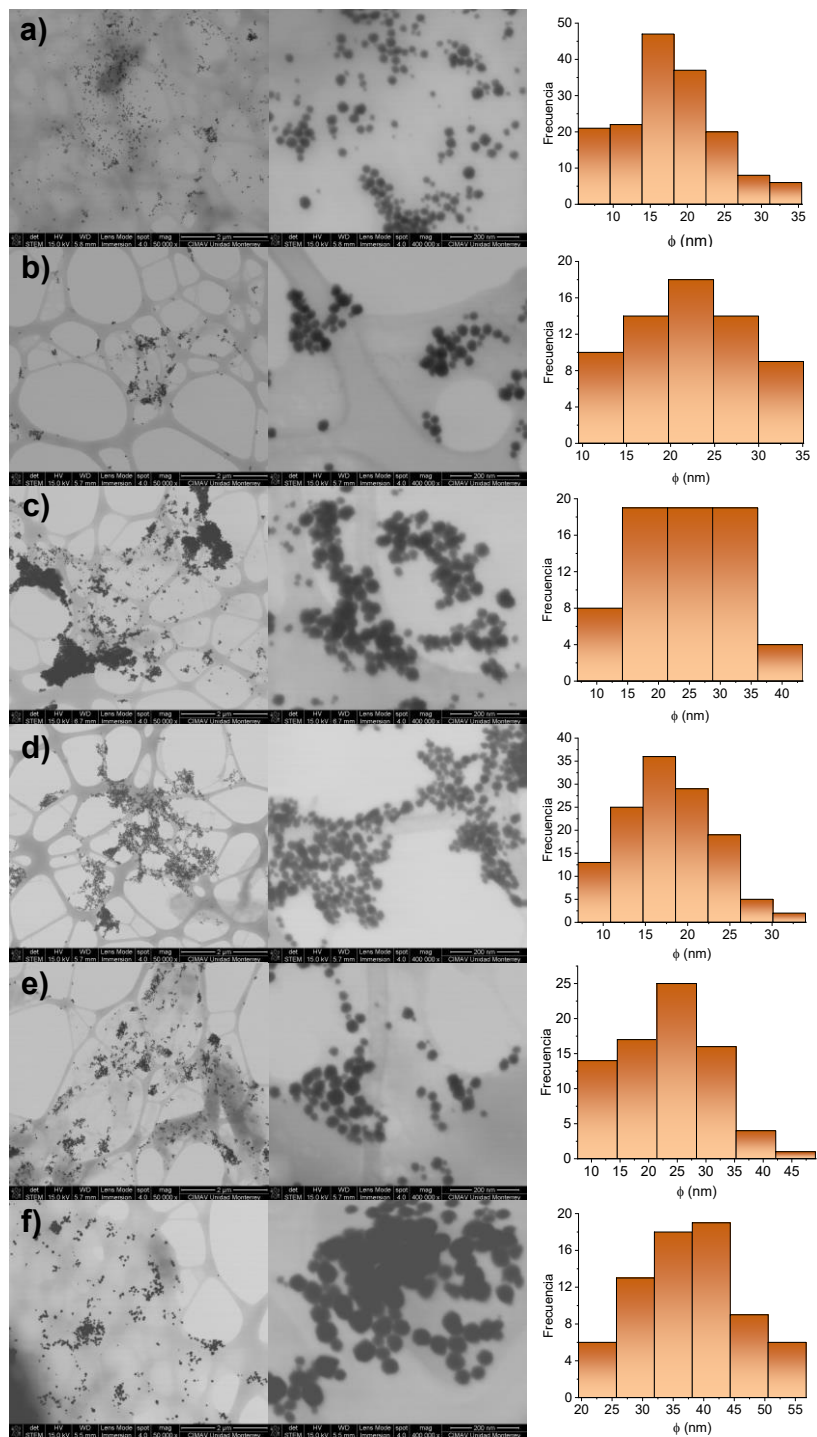


Figura 4.1.2.4. Micrografías STEM de las AuNPs a una escala de 2 μ m y 200 nm, acompañadas del histograma de distribución del diámetro de nanopartícula de las muestras a) B2, b) C2, c) D, d) E, e) F y f) G.

El potencial ζ de las AuNPs sintetizadas se encuentra entre -21.2 y -28.3 mV, lo que quiere decir que la superficie de las nanopartículas está cargada negativamente por grupos electrodonadores y que, aunque pueden permanecer suspendidas en medio acuoso por periodos

de tiempo considerables, el sistema coloidal no presenta la suficiente estabilidad ante la aglomeración. Esto último puede relacionarse con la polidispersidad de las nanopartículas que se observó por DLS. En la **Figura 4.1.2.5** se presentan los valores del potencial ζ medido para las diferentes muestras.

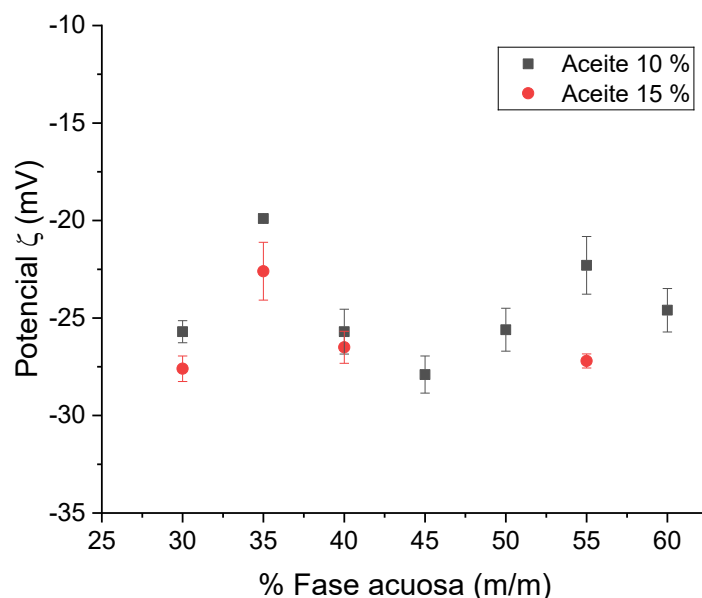


Figura 4.1.2.5. Potencial Z de las AuNPs sintetizadas con diferentes composiciones en los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados.

4.1.3. Estudio de la influencia del pH en los sistemas

Al probar la síntesis en el punto de nano-emulsión G modificando el pH de la solución estándar de oro, empleada como precursor, desde 0 a 0.5, 1 y 1.5 no se observaron cambios en la coloración que indiquen que la reacción tuvo lugar hasta después de 24 horas. Un mecanismo de reacción lento suele conducir a la obtención de nanopartículas de gran tamaño. Después de cinco días el color azul en los sistemas se hace más visible, la SPRB de las AuNPs es una banda muy ancha que abarca desde los 550 nm hasta 720 nm y tiene una absorbancia mínima como se puede observar en la **Figura 4.1.3.1**. En algunos trabajos se ha reportado que las nano-estrellas de oro presentan una banda de absorción muy amplia que se extiende desde la región visible hasta el infrarrojo cercano, de 600 a 900 nm, y una banda de absorción más débil por debajo de los 500 nm, la banda de absorción en la región del infrarrojo cercano depende del número de puntas ramificadas en el núcleo de oro [170, 171]. La imagen STEM de las AuNPs azules

obtenidas cuando el pH del precursor es 1.5 se presenta en la **Figura 4.1.3.2**, donde se observa que las AuNPs adquirieron una morfología esférica rodeada de picos con tamaño promedio de 82.3 ± 30.8 nm. Esto corrobora la presencia de otros modos de resonancia observados mediante UV-vis.

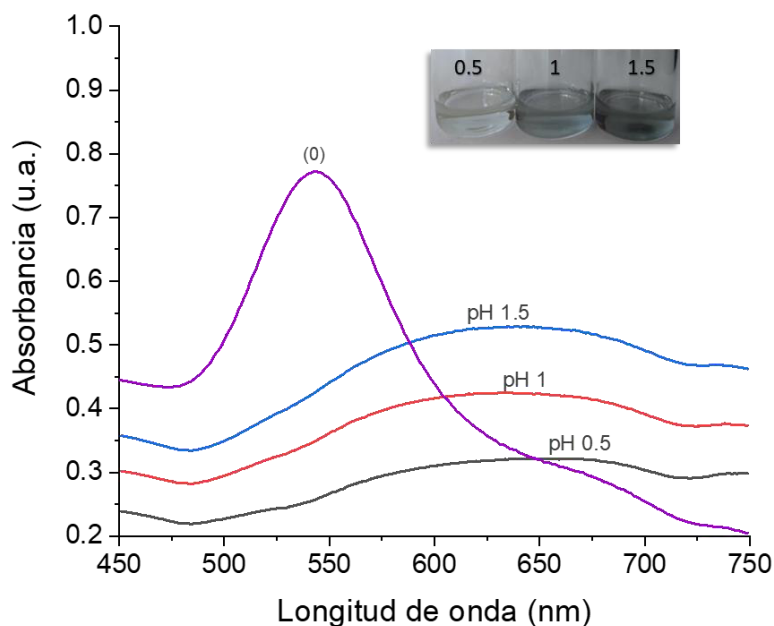


Figura 4.1.3.1. Espectros UV-vis de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G sin modificar (0) y modificando el pH del precursor de 0.5 a 1.5. En el recuadro se presenta la apariencia física de las AuNPs variando el pH del precursor.

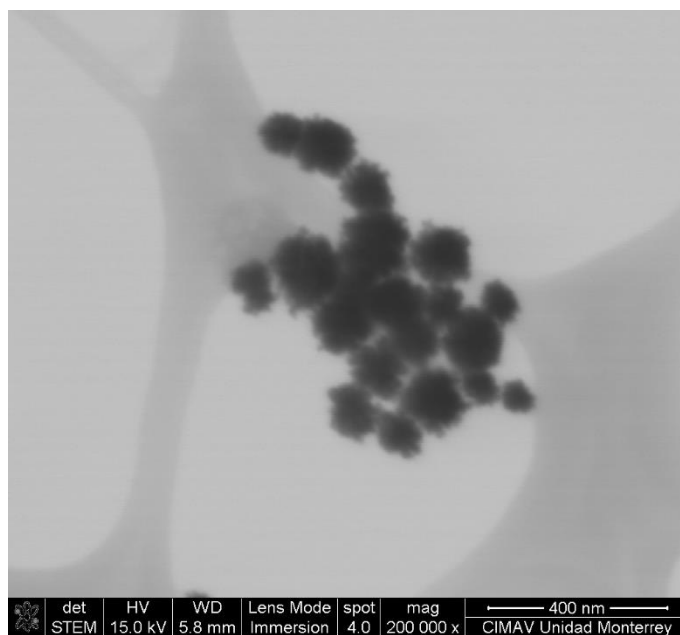


Figura 4.1.3.2. Micrografía STEM de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G modificando el pH del precursor a 1.5.

Al modificar el pH del precursor la reactividad del sistema se ve afectada significativamente [41], lo que se refleja en una reacción muy lenta puesto que la reducción no se ve favorecida. Además, se distingue una coloración más azulada en la muestra con mayor pH y con una banda de mayor intensidad. A pH menos ácido se puede tener la presencia de complejos de oro como $\text{AuCl}_3(\text{OH})^-$ [172], que dificulta la reducción del Au^{3+} . El potencial ζ , de las AuNPs a las que se les modificó el pH del precursor aumenta conforme se incrementa el pH, esto sugiere que los grupos sobre la superficie de las AuNPs también se ven ionizados incrementando la carga negativa en la superficie.

Tabla 4.1.3-1. Resultados de la síntesis de AuNPs modificando y sin modificar el pH del precursor.

pH precursor	pH nE después de la síntesis	Potencial ζ (mV)
0 (sin modificar)	1	-27.4
0.5	4	-23.3
1	5	-26.4
1.5	5	-28.9

En la **Tabla 4.1.3-1** se presenta el cambio en el pH del sistema de nE después de la reacción para la muestra cero (sin modificaciones de ningún tipo) y las muestras con diferente pH, así como el potencial ζ de las AuNPs. El pH de la nE con únicamente el ECM al 4 % en fase acuosa es igual a 6.

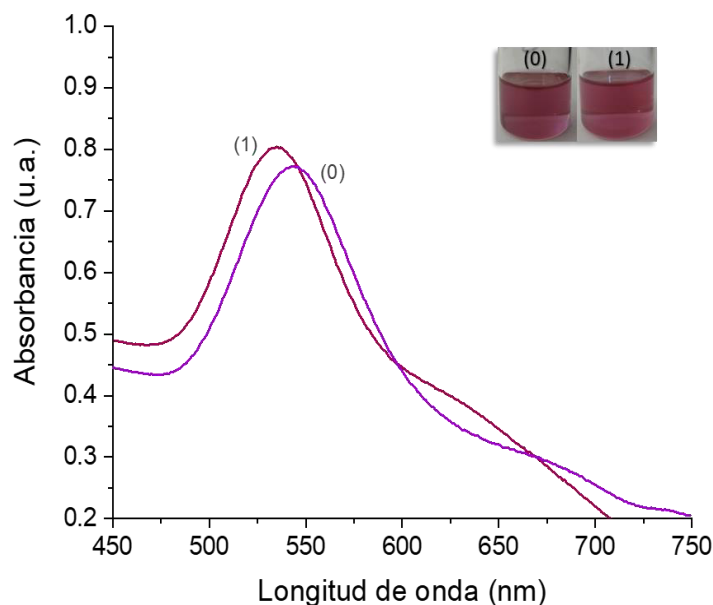


Figura 4.1.3.3. Espectro UV-vis de las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión G disminuyendo el pH del ECM (1) y sin modificación alguna (0). Recuadro: aspecto de las AuNPs.

Por otra parte, se realizó un experimento disminuyendo el pH del ECM al 4 % desde 6.2 a 1.1, en el mismo punto de nE (G) manteniendo el precursor sin modificar. El aspecto de las AuNPs es similar (recuadro de la **Figura 4.1.3.3**), la SPRB de la muestra a pH más bajo (muestra 1) presenta un efecto hipsocrómico y una nueva banda por encima de 600 nm, esto es debido a la protonación de los compuestos presentes en el ECM en condiciones ácidas. El cambio más evidente se obtuvo en la velocidad de la reacción. En condiciones normales el cambio en la coloración sucedió a los 105 minutos de reacción (muestra 0) y llevando a cabo la síntesis en pH más ácido el color magenta se presentó antes de los 45 minutos, viéndose favorecida la cinética de la reacción. La protonación de los grupos etóxilo del surfactante podría favorecer la interacción del ion metálico con los componentes antioxidantes del ECM a ese pH.

4.1.4. Funcionalización de las AuNPs y propiedades SERS

Con la finalidad de observar si la superficie de las nanopartículas de oro conservó cierta funcionalización por parte del extracto, varias muestras fueron analizadas con la técnica de micro-Raman. Para evaluar la capacidad de las AuNPs sintetizadas por este método para mejorar la señal Raman del extracto, se realizó un experimento con las AuNPs sintetizadas en la nano-emulsión F y el ECM al 10 %.

Como se puede observar en la **Figura 4.1.4.1** los espectros de las diferentes muestras de AuNPs muestran bandas con intensidades Raman considerables y comparten señales en común. La banda de mayor intensidad observada a 1585 cm^{-1} puede relacionarse con la banda característica de la vibración de alargamiento $\text{Ar}-\text{C}=\text{O}$ de compuestos flavonoides. Las bandas anchas que se encuentran entre 2931 y 2849 cm^{-1} se deben a señales de alargamiento del grupo CH_2 de compuestos poli-etoxilados [173]. La señal a 1362 cm^{-1} indica señales de flexión en el plano de enlaces $\text{O}-\text{H}$, en esa región también se encuentran señales de alargamiento de enlaces $\text{C}=\text{C}$ de fenoles. Esto sugiere que la superficie de las nanopartículas está recubierta, principalmente, por grupos funcionales hidroxilados de tipo aromáticos, así como fracciones del surfactante empleado. Las señales de intensidad débil que se encuentran en 2449 y 2237 cm^{-1} no son apreciables en el espectro Raman del ECM al 10 % presentado en la **Figura 3.1.2.1**, las cuales no son características de compuestos fenólicos. Las vibraciones $\text{Au}-\text{O}$ se esperan encontrar alrededor de 580 cm^{-1} [174, 175]. Vibraciones de alargamiento de enlaces $\text{Au}-\text{S}$, se

pueden encontrar entre $270\text{-}240\text{ cm}^{-1}$ [176]. Las señales encontradas por debajo de 200 cm^{-1} son parte de la huella dactilar de las muestras.

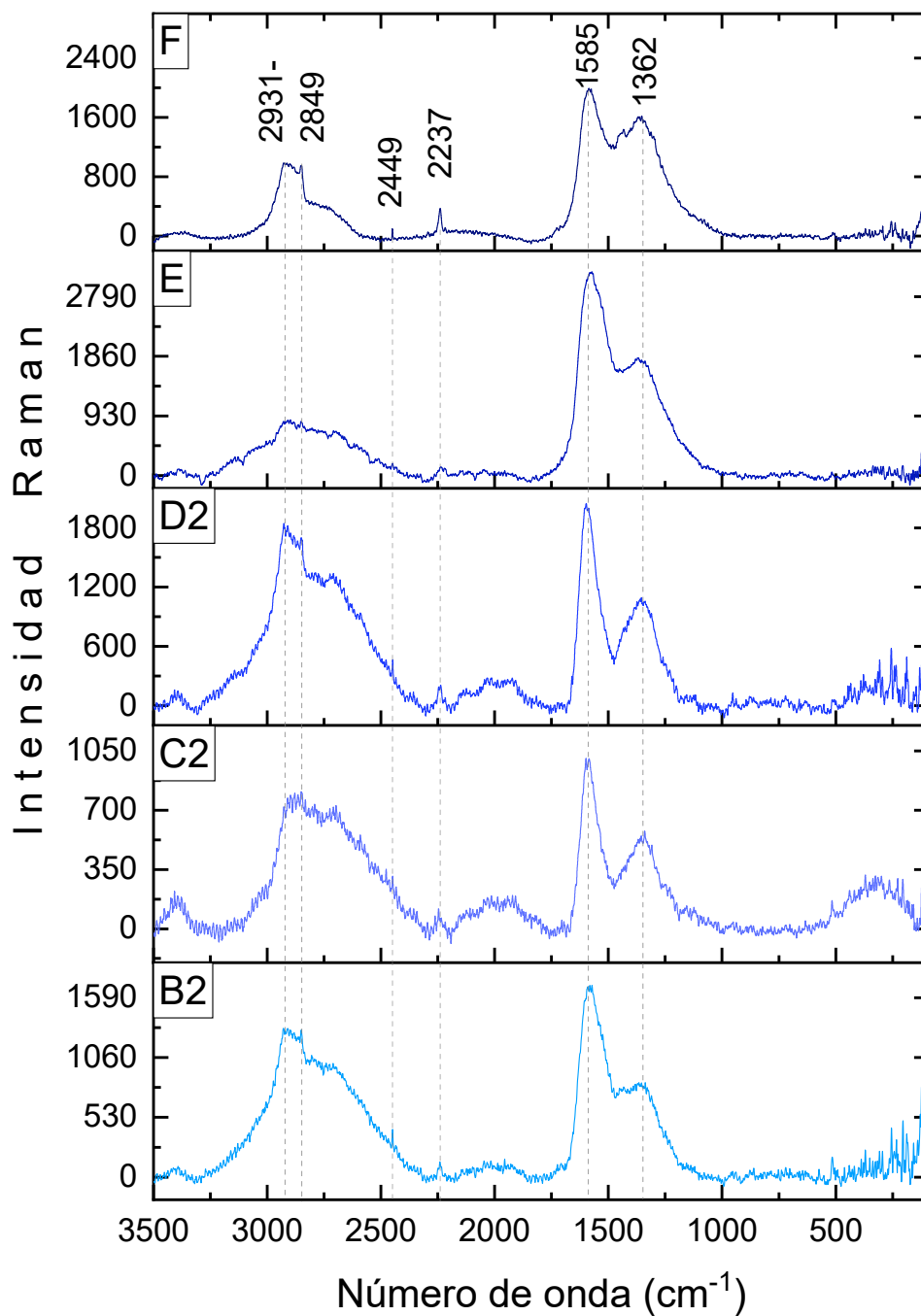


Figura 4.1.4.1. Espectros de dispersión Raman de las AuNPs F, E, D2, C2 y B2. Adquirido con láser de 532 nm, 64 exposiciones por 1 segundo, lente de 50 X, potencia de 7 mW, aperturas con ranura $50\text{ }\mu\text{m}$ (B2 y E) y orificio de $50\text{ }\mu\text{m}$ (D2, C2 y F).

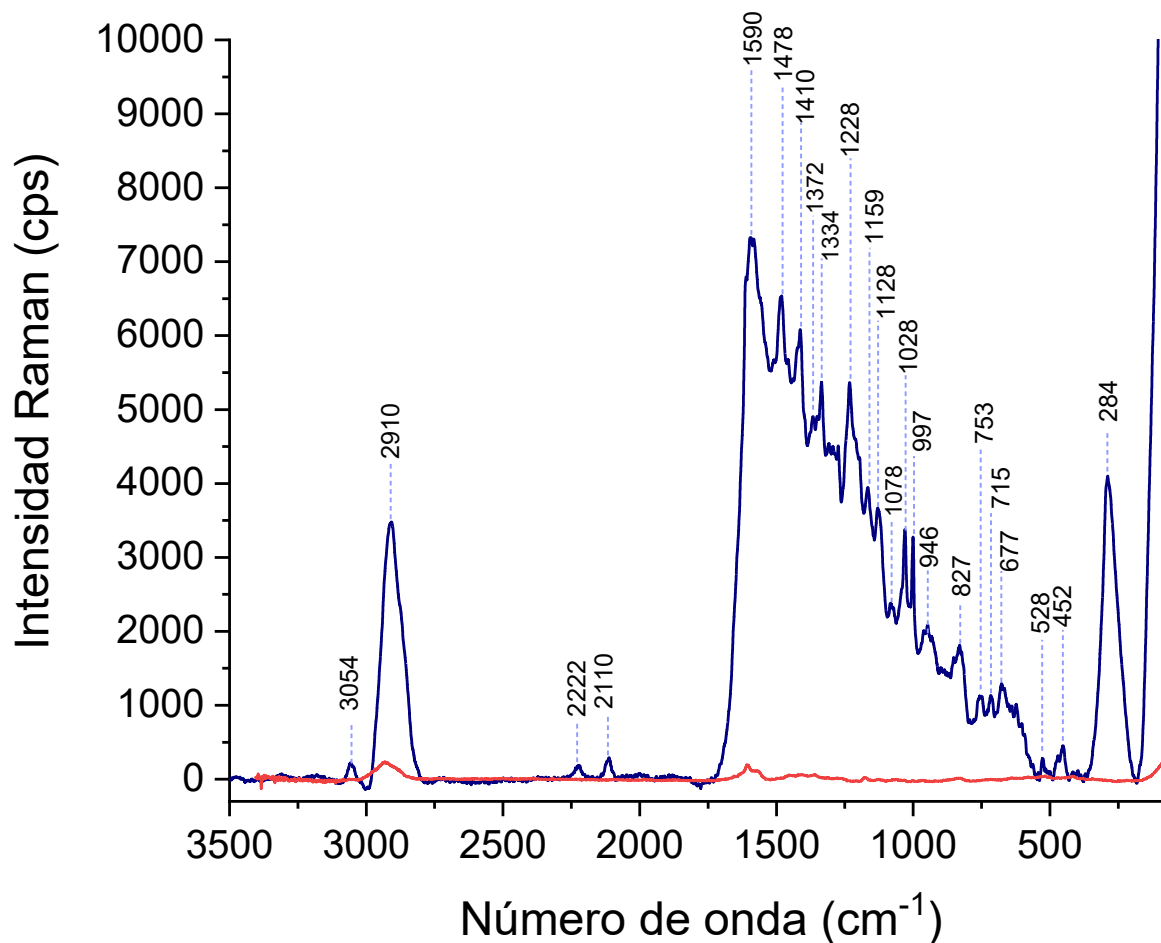


Figura 4.1.4.2. Espectro SERS del ECM al 10 % con AuNPs sintetizadas (línea azul). Adquirido con un láser de 633 nm, potencia de 8 mW, objetivo de 50 X, 64 exposiciones por un segundo y una apertura con orificio de 25 μm . Comparado con el espectro del ECM al 10 % (línea roja), presentado en la Figura 3.1.2.1.

En la **Figura 4.1.4.2** se presenta el espectro SERS que, comparado con el espectro del ECM (línea roja), muestra la evidente amplificación de las señales Raman del ECM, incrementando su intensidad máxima hasta 7000 unidades. Al intentar adquirir el espectro del ECM bajo las mismas condiciones que el espectro SERS, no se lograron observar señales Raman. En la región entre 1600 – 600 cm^{-1} , se observa un efecto de fotoblanqueo, aunque logran distinguirse claramente las señales Raman. La asignación de las señales de este espectro es similar a la realizada en la **Tabla 3.1.2-1**, algunas señales se encuentran desplazadas (2910, 1590, 1478, 1334, 1228, 1159, 946, 677 y 528 cm^{-1}), mientras que otras se mantienen en el mismo número de onda. En el espectro SERS logran distinguirse nuevas señales de intensidad muy débil: la señal a 3054 cm^{-1} corresponde a vibraciones de alargamiento C–H de compuestos aromáticos. La señal a 1028 cm^{-1} de intensidad media involucra interacciones de anillo, en la

catequina se presenta una señal media a 1024 cm^{-1} [161]. La señal a 753 cm^{-1} implica vibraciones de torsión de enlaces H–C–C de anillo. El efecto SERS permite observar señales a 2222 y 2110 cm^{-1} que no suelen asignarse a compuestos fenólicos, la presencia de heteroátomos podría relacionarse con estas bandas.

4.1.5. Conclusiones Parciales

- En el diagrama pseudo-ternario de fases del sistema aceite de ricino/ Brij O10: 1,2-hexanodiol/ extracto acuoso de hojas de chaya maya, se distingue una zona multifásica, una zona intermedia de nano-emulsión que deben ser preparadas por titulación para conseguir su estabilidad y; una zona monofásica de microemulsiones.
- Los sistemas de microemulsiones y nano-emulsiones compuestos por aceite de ricino/ Brij O10: 1,2-hexanodiol/ fase acuosa, permitieron obtener AuNPs empleando un agente reductor verde como lo fue el extracto acuoso de hojas de Chaya maya.
- Una de las ventajas del sistema es que al emplear el precursor inorgánico y el reductor en la misma fase acuosa, se lograron obtener tamaños de nanopartícula controlados siguiendo una metodología simple en comparación del método de las dos microemulsiones. Además de que no requirió de aporte energético adicional y se llevó a cabo en condiciones suaves.
- El comportamiento fásico del sistema y la cantidad de fase acuosa influyeron la formación de las nanopartículas de oro, otorgando además una alta estabilidad. Teniendo que al incrementar la cantidad de fase acuosa en el sistema se obtiene una mayor concentración de AuNPs. Cuando se tienen microestructuras bicontinuas, el tamaño de las AuNPs está delimitado por los canalitos de fase acuosa en las estructuras de tipo esponja. Cuando se tienen nano-emulsiones del tipo aceite en agua, la formación de las nanopartículas se lleva a cabo en la fase continua, y el tamaño de las AuNPs es controlado por la cantidad de surfactante en el sistema.
- El pH influye en la reactividad de las especies presentes en el sistema y, como consecuencia el mecanismo de formación de las AuNPs se ve afectado.
- La superficie de las AuNPs se encuentra recubierta por compuestos orgánicos provenientes posiblemente del extracto de chaya maya. Además, las AuNPs presentaron un efecto SERS bastante bueno para la amplificación de las señales del extracto.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de hojas de Chaya maya está constituido principalmente por compuestos polifenólicos y presenta una buena capacidad antioxidante. El empleo de hojas frescas para la preparación del extracto trae consigo algunas desventajas que recaen en variaciones de los resultados obtenidos.

El extracto acuoso de hojas de *C. chayamansa*, tiene la capacidad de reducir los iones de Au^{3+} a oro elemental. Sin embargo, no es posible controlar el crecimiento de las nanopartículas formadas inicialmente, creciendo hasta tamaños de partícula fuera del rango nanométrico. En la síntesis directa, la concentración de precursor tiene influencia sobre el tamaño que alcanzan las partículas al inicio de la reacción. Respecto a la concentración del extracto, se puede decir que se tiene una relación lineal con la cantidad de nanopartículas producidas al inicio de la reacción.

Los sistemas microemulsionados y nano-emulsionados, compuestos por aceite de ricino/ Brij O10: 1,2-hexanodiol/ fase acuosa, ayudaron a controlar la formación de las nanopartículas de oro otorgándoles, además, una alta estabilidad. El comportamiento físico del sistema, la cantidad de fase acuosa y surfactante influyeron en el tamaño de nanopartícula. El crecimiento de las nanopartículas depende de la microestructura presente en el sistema, esto se puede controlar variando la composición del sistema. El pH afecta la reactividad de las especies presentes en el sistema, a pH ácido el mecanismo de formación de las nanopartículas de oro se favorece cinéticamente. Las nanopartículas de oro sintetizadas mostraron muy buenos resultados para su aplicación en SERS.

Las ventajas del método de síntesis aquí propuesto son que permite incorporar el reductor verde y el precursor inorgánico en la misma fase acuosa, obteniendo tamaños de nanopartícula controlados siguiendo una metodología simple. Y que no requiere aporte energético adicional, llevándose a cabo en condiciones suaves.

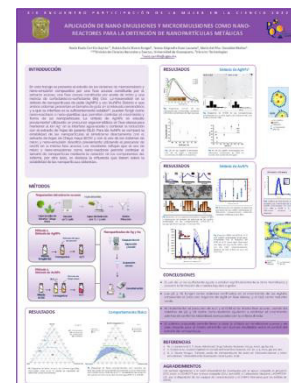
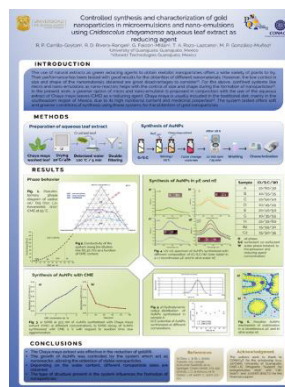
PERSPECTIVAS

El extracto acuoso de hojas de Chaya maya demostró ser un potencial candidato como agente reductor en la obtención de nanopartículas metálicas, es necesario estandarizar la obtención del extracto para mejorar la calidad de los resultados.

El método de síntesis propuesto en esta tesis con el uso de sistemas microemulsionados y nano-emulsionados como nano-reactores abre la puerta a profundizar en el estudio de los sistemas variando las relaciones entre los componentes involucrados y/o bajo nuevas condiciones experimentales, como el empleo de otro tipo de precursores. Otro aspecto sumamente interesante es que las velocidades de reacción por esta vía permiten estudiar y proponer mecanismos de formación de las nanopartículas.

PARTICIPACIONES

Parte del presente proyecto de investigación de dio a conocer en la *11th International Colloids Conference*, llevada a cabo en Lisboa, Portugal. Y en el *XIX encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*, Realizado en León, Guanajuato.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. A. Saleh, “Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities,” *Environ. Technol. Innov.*, vol. 20, p. 101067, 2020, doi: 10.1016/j.eti.2020.101067.
- [2] J. C. Durán-Álvarez, R. Zanella, and S. Oros-Ruíz, “Superficial modification of semiconductors with gold nanoparticles for photocatalytic applications,” *RSC Catal. Ser.*, vol. 2014-January, no. 18, pp. 155–228, 2014, doi: 10.1039/9781782621645-00155.
- [3] C. Noguez, “Surface plasmons on metal nanoparticles: The influence of shape and physical environment,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 10, pp. 3606–3619, 2007, doi: 10.1021/jp066539m.
- [4] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, “Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity,” *Small*, vol. 1, no. 3, pp. 325–327, Mar. 2005, doi: 10.1002/sml.200400093.
- [5] P. G. Jamkhane, N. W. Ghule, A. H. Bamer, and M. G. Kalaskar, “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 53, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101174.
- [6] T. J. Collins, “Introducing Green Chemistry in Teaching and Research,” *J. Chem. Educ.*, vol. 72, no. 11, pp. 965–966, 1995, doi: <https://doi.org/10.1021/ed072p965>.
- [7] D. Nath and P. Banerjee, “Green nanotechnology - A new hope for medical biology,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 36, no. 3, pp. 997–1014, 2013, doi: 10.1016/j.etap.2013.09.002.
- [8] A. Rana, K. Yadav, and S. Jagadevan, “A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity,” *Journal of Cleaner Production*, vol. 272, 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122880.
- [9] S. Naraginti and A. Sivakumar, “Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalyzed reduction of 4-nitrophenol,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 128, pp. 357–362, 2014, doi: 10.1016/j.saa.2014.02.083.
- [10] J. Díaz Bolio, “La Chaya Una planta maravillosa Alimenticia y Medicinal,” Quintana Roo, 1974. Accessed: Oct. 18, 2022. [Online]. Available: <https://www.culinaryartschool.edu.mx/cocinasdemexico/Biblioteca/unidad-3/bloque9/la-chaya-una-planta-maravillosa-alimenticia-y-medicinal-la-chaya.pdf>.
- [11] A. Kuri-García, J. L. Chávez-Servín, and S. H. Guzmán-Maldonado, “Phenolic profile and antioxidant capacity of *Cnidoscopus chayamansa* and *Cnidoscopus aconitifolius*: A review,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 11, no. 45, pp. 713–723, 2017, doi: 10.5897/jmpr2017.6512.

- [12] A. Kuri-García *et al.*, “Preventive Effect of an Infusion of the Aqueous Extract of Chaya Leaves (*Cnidoscolus aconitifolius*) in an Aberrant Crypt Foci Rat Model Induced by Azoxymethane and Dextran Sulfate Sodium,” *J. Med. Food*, vol. 22, no. 8, pp. 851–860, 2019, doi: 10.1089/jmf.2019.0031.
- [13] M. Z. Pérez-González, A. G. Siordia-Reyes, P. Damián-Nava, S. Hernández-Ortega, M. L. Macías-Rubalcava, and M. A. Jiménez-Arellanes, “Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Activities of the *Cnidoscolus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2018, p. 3896517, 2018, doi: 10.1155/2018/3896517.
- [14] Y. J. Borges Meneces, “Cultivo de chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) en traspatio,” Universidad de Quintana Roo, 2012.
- [15] C. Stubenrauch, T. Wielpütz, T. Sottmann, C. Roychowdhury, and F. J. DiSalvo, “Microemulsions as templates for the synthesis of metallic nanoparticles,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 317, no. 1–3, pp. 328–338, 2008, doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.10.031.
- [16] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma, “Nano-emulsions,” *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 10, no. 3–4, pp. 102–110, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.cocis.2005.06.004.
- [17] M. J. Lawrence and G. D. Rees, “Microemulsion-based media as novel drug delivery systems,” 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00103-4).
- [18] M. S. Dzul-Erosa, M. M. Cauich-Díaz, T. A. Razo-Lazcano, M. Avila-Rodriguez, J. A. Reyes-Aguilera, and M. P. González-Muñoz, “Aqueous leaf extracts of *Cnidoscolus chayamansa* (Mayan chaya) cultivated in Yucatán México. Part II: Uses for the phytomediated synthesis of silver nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 91, pp. 838–852, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.06.007.
- [19] R. D. Rivera-Rangel, M. P. González-Muñoz, M. Avila-Rodriguez, T. A. Razo-Lazcano, and C. Solans, “Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 536, pp. 60–67, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.051.
- [20] T. Pradeep, *NANO: The Essentials: Understanding Nanoscience and Nanotechnology*, First edit. New York: McGraw-Hill Education, 2007.
- [21] S. Lindsay, *Introduction to nanoscience*, First. New York: Oxford University Press, 2010.
- [22] V. V. Pokropivny and V. V. Skorokhod, “Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 27, no. 5-8 SPEC. ISS., pp. 990–993, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.msec.2006.09.023.
- [23] M. Rafique, M. B. Tahir, M. S. Rafique, and M. Hamza, “History and fundamentals of nanoscience and nanotechnology,” in *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications*, Elsevier, 2020, pp. 1–25.

- [24] I. Capek, *Noble Metal Nanoparticles*. Tokyo: Springer Japan, 2017.
- [25] G. N. R. Tripathi, “p-Benzosemiquinone radical anion on silver nanoparticles in water,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 5, pp. 1178–1179, 2003, doi: <https://doi.org/10.1021/ja029049q>.
- [26] M. S. Frost, M. J. Dempsey, and D. E. Whitehead, “Highly sensitive SERS detection of Pb²⁺ ions in aqueous media using citrate functionalised gold nanoparticles,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 221, pp. 1003–1008, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2015.07.001.
- [27] H. Kumar, N. Venkatesh, H. Bhowmik, and A. Kuila, “Metallic Nanoparticle: A Review,” *Biomed. J. Sci. & Tech. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 3765–3775, 2018, doi: 10.26717/BJSTR.2018.04.001011.
- [28] M. S. Verma, J. L. Rogowski, L. Jones, and F. X. Gu, “Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles,” *Biotechnology Advances*, vol. 33, no. 6. Elsevier Inc., pp. 666–680, Nov. 01, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.003.
- [29] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello, “Gold nanoparticles in chemical and biological sensing,” *Chemical Reviews*, vol. 112, no. 5. pp. 2739–2779, May 09, 2012, doi: 10.1021/cr2001178.
- [30] P. Nath, R. K. Arun, and N. Chanda, “A paper based microfluidic device for the detection of arsenic using a gold nanosensor,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 103, pp. 59558–59561, 2014, doi: 10.1039/c4ra12946f.
- [31] E. Oliveira *et al.*, “Revisiting the use of gold and silver functionalised nanoparticles as colorimetric and fluorometric chemosensors for metal ions,” *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 212. Elsevier, pp. 297–328, 2015, doi: 10.1016/j.snb.2015.02.026.
- [32] V. Mody, R. Siwale, A. Singh, and H. Mody, “Introduction to metallic nanoparticles,” *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 2, no. 4, p. 282, 2010, doi: 10.4103/0975-7406.72127.
- [33] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, and C. A. Mirkin, “Gold Nanoparticles for Biology and Medicine,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 49, no. 19, pp. 3280–3294, Apr. 2010, doi: 10.1002/anie.200904359.
- [34] X. Y. Liu, J. Q. Wang, C. R. Ashby, L. Zeng, Y. F. Fan, and Z. S. Chen, “Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer,” *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 2021, doi: 10.1016/j.drudis.2021.01.030.
- [35] A. Sani, C. Cao, and D. Cui, “Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review,” *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 26. Elsevier B.V., Jul. 01, 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100991.
- [36] M. Wu *et al.*, “Bio-distribution and bio-availability of silver and gold in rat tissues with silver/gold nanorod administration,” *RSC Adv.*, vol. 8, no. 22, pp. 12260–12268, 2018, doi: 10.1039/C8RA00044A.
- [37] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold,” *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no. 0, pp. 55–75, 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.

- [38] M. Wuithschick *et al.*, “Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 7052–7071, Jul. 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b01579.
- [39] E. Agunloye, L. Panariello, A. Gavriilidis, and L. Mazzei, “A model for the formation of gold nanoparticles in the citrate synthesis method,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 191, pp. 318–331, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.06.046>.
- [40] J. Polte *et al.*, “Mechanism of Gold Nanoparticle Formation Citrate Synthesis,” no. 9, pp. 1296–1301, 2010.
- [41] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, and X. Peng, “Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: The third role of citrate,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 45, pp. 13939–13948, Nov. 2007, doi: 10.1021/ja074447k.
- [42] G. Frens, “Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions,” *Nat. Phys. Sci.*, vol. 22, pp. 190–191, 1973, doi: <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>.
- [43] M. A. Garcia, “Corrigendum: Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 389501, pp. 1–20, 2012, doi: 10.1088/0022-3727/45/38/389501.
- [44] A. Oliver *et al.*, “Controlled anisotropic deformation of Ag nanoparticles by Si ion irradiation,” *Phys. Rev. B*, vol. 74, no. 24, p. 245425, 2006, doi: 10.1103/PhysRevB.74.245425.
- [45] R. Fuchs, “Theory of the optical properties of ionic crystal cubes,” *Phys. Rev. B*, vol. 11, no. 4, pp. 1732–1740, Feb. 1975, doi: 10.1103/PhysRevB.11.1732.
- [46] A. L. González, C. Noguez, and A. S. Barnard, “Map of the Structural and Optical Properties of Gold Nanoparticles at Thermal Equilibrium,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 26, pp. 14170–14175, Jul. 2012, doi: 10.1021/jp3047906.
- [47] A. L. González and C. Noguez, “Influence of Morphology on the Optical Properties of Metal Nanoparticles,” *J. Comput. Theor. Nanosci.*, vol. 4, no. 2, pp. 231–238(8), 2007, doi: <https://doi.org/10.1166/jctn.2007.2309>.
- [48] Y. Yang, Y. Yan, W. Wang, and J. Li, “Precise size control of hydrophobic gold nanoparticles using cooperative effect of refluxing ripening and seeding growth,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 17, Apr. 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/17/175603.
- [49] E. Dreaden, A. Alkilany, X. Huang, C. Murphy, and M. El-Sayed, “The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, pp. 2740–2779, Nov. 2011, doi: 10.1039/c1cs15237h.
- [50] X. Huang, S. Neretina, and M. A. El-Sayed, “Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications,” *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 48, pp. 4880–4910, Dec. 2009, doi: 10.1002/adma.200802789.
- [51] C. Radloff and N. J. Halas, “Enhanced thermal stability of silica-encapsulated metal nanoshells,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 79, no. 5, pp. 674–676, Jul. 2001, doi:

- 10.1063/1.1389322.
- [52] Y. Wang, J. Wan, R. J. Miron, Y. Zhao, and Y. Zhang, “Antibacterial properties and mechanisms of gold–silver nanocages,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 21, pp. 11143–11152, 2016, doi: 10.1039/C6NR01114D.
- [53] M. Sánchez-Domínguez and G. Rodríguez-Abreu, *Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists*, 1st ed. Cambridge: Elsevier, 2016.
- [54] Malvern Instruments, “Manual: Zetasizer Nano user manual MAN0485,” p. 250, 2013.
- [55] U. Nobbmann, “How important is the refractive index of nanoparticles?,” *Malvern Panalytical*, 2014. <https://www.materials-talks.com/faq-how-important-are-refractive-index-absorption-for-nanoparticles/> (accessed Jul. 09, 2022).
- [56] M. J. Rosen, *Surfactants and interfacial phenomena*, 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons., 2004.
- [57] Malvern Panalytical, “Measuring Surface Zeta Potential using the Surface Zeta Potential Cell,” Sep. 17, 2012. <https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/application-notes/AN120917SurfaceZetaPotentialCell> (accessed Jul. 11, 2022).
- [58] W. Wang, X. Ding, Q. Xu, J. Wang, L. Wang, and X. Lou, “Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 148, pp. 541–548, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.09.021.
- [59] H. N. Verma, P. Singh, and R. M. Chavan, “Gold nanoparticle: synthesis and characterization,” *Vet. World*, vol. 7, no. 2, pp. 72–77, Feb. 2014, doi: 10.14202/vetworld.2014.72-77.
- [60] T. Kim, C.-H. Lee, S.-W. Joo, and K. Lee, “Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 318, no. 2, pp. 238–243, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2007.10.029.
- [61] R. Tantra, P. Schulze, and P. Quincey, “Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility,” *Particuology*, vol. 8, no. 3, pp. 279–285, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.partic.2010.01.003.
- [62] H. D. Young and R. A. Freedman, *Física Universitaria*, 12th ed., vol. 2. México, 2009.
- [63] J. Reyes Gasca, “Breve reseña histórica de la microscopía electrónica en México y el mundo,” *Mundo nano*, vol. 13, no. 25, pp. 79–100, 2020, doi: <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.25.69610>.
- [64] D. C. Joy, B. J. Ford, and S. Bradbury, “scanning electron microscope,” *Encyclopedia Britannica*, 2019. <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope> (accessed Aug. 07, 2022).
- [65] L. Reimer, “Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis, Second Edition,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 11, no. 12, p. 1826, Nov. 2000, doi: 10.1088/0957-0233/11/12/703.

- [66] C. Kranz and B. Mizaikoff, *Microscopic Techniques for the Characterization of Gold Nanoparticles*, vol. 66. Elsevier, 2014.
- [67] V. G. Cano and J. O. Márquez, “Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones,” 2014.
- [68] B. Dietzek, D. Cialla, M. Schmitt, and J. Popp, “Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy BT - Confocal Raman Microscopy,” J. Toporski, T. Dieing, and O. Hollricher, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 47–68.
- [69] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, and J. G. Grasselli, *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Elsevier, 1991.
- [70] D. Neuville, M. Cicconi, W. Blanc, and M. Lancry, “Applications of Raman spectroscopy, a tool to investigate glass structure and glass fiber.” 2021.
- [71] Bruker, “Guide to Raman Microscopy,” <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-microscopes/what-is-raman-microscopy.html>, Jul. 24, 2022. .
- [72] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, and V. K. Valev, “Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 14, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [73] P. Li, F. Long, W. Chen, J. Chen, P. K. Chu, and H. Wang, “Fundamentals and applications of surface-enhanced Raman spectroscopy–based biosensors,” *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 13, pp. 51–59, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cobme.2019.08.008.
- [74] N. Rajput, “METHODS OF PREPARATION OF NANOPARTICLES-A REVIEW,” 2015.
- [75] P. Magudapathy *et al.*, “Alloying of metal nanoparticles by ion-beam induced sputtering,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 667, pp. 38–44, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.11.041>.
- [76] L. I. M. Silva, A. Pérez-Gramatges, D. G. Larrude, J. M. S. Almeida, R. Q. Aucélio, and A. R. da Silva, “Gold nanoparticles produced using NaBH₄ in absence and in the presence of one-tail or two-tail cationic surfactants: Characteristics and optical responses induced by aminoglycosides,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 614, p. 126174, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126174>.
- [77] L. Carlini *et al.*, “Comparison between silver and gold nanoparticles stabilized with negatively charged hydrophilic thiols: SR-XPS and SERS as probes for structural differences and similarities,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 532, pp. 183–188, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.05.045.
- [78] C. Daruich De Souza, B. Ribeiro Nogueira, and M. E. C. M. Rostelato, “Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction,” *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 798. Elsevier Ltd, pp. 714–740, Aug. 25, 2019, doi: 10.1016/j.jallcom.2019.05.153.
- [79] K. M. Jeerage, T. L. Oreskovic, A. E. Curtin, A. W. Sanders, R. K. Schwindt, and A. N.

- Chiaromonti, "Citrate-stabilized gold nanoparticles as negative controls for measurements of neurite outgrowth," *Toxicol. Vitr.*, vol. 29, no. 1, pp. 187–194, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.tiv.2014.10.007.
- [80] J. Sun, R. Luo, and Y. Xia, "Getting rid of NaBH₄: Gold seeds reduced by air-stable agents for synthesizing quasi one-dimensional gold nanoparticles," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 31, no. 7, pp. 1946–1950, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.12.037>.
- [81] M. Luty-Błoch *et al.*, "Synthesis of gold nanoparticles in an interdigital micromixer using ascorbic acid and sodium borohydride as reducers," *Chem. Eng. J.*, vol. 171, no. 1, pp. 279–290, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.03.104>.
- [82] N. Yang and W. H. Li, "Preparation of gold nanoparticles using chitosan oligosaccharide as a reducing and capping reagent and their in vitro cytotoxic effect on Human fibroblasts cells," *Mater. Lett.*, vol. 138, pp. 154–157, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.matlet.2014.09.078.
- [83] N. Tue Anh, D. Van Phu, N. Ngoc Duy, B. Duy Du, and N. Quoc Hien, "Synthesis of alginate stabilized gold nanoparticles by γ -irradiation with controllable size using different Au³⁺ concentration and seed particles enlargement," *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 79, no. 4, pp. 405–408, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.radphyschem.2009.11.013.
- [84] Y. Shang, C. Min, J. Hu, T. Wang, H. Liu, and Y. Hu, "Synthesis of gold nanoparticles by reduction of HAuCl₄ under UV irradiation," *Solid State Sci.*, vol. 15, pp. 17–23, 2013, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2012.09.002.
- [85] J. D. Mangadlao, P. Cao, D. Choi, and R. C. Advincula, "Photoreduction of Graphene Oxide and Photochemical Synthesis of Graphene–Metal Nanoparticle Hybrids by Ketyl Radicals," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 29, pp. 24887–24898, Jul. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b06275.
- [86] M. Mihaly, M. C. Fleancu, N. L. Olteanu, D. Bojin, A. Meghea, and M. Enachescu, "Synthesis of gold nanoparticles by microemulsion assisted photoreduction method," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 15, no. 11–12, pp. 1012–1021, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.crci.2012.09.013.
- [87] C. N. R. Rao, H. S. S. Ramakrishna Matte, R. Voggu, and A. Govindaraj, "Recent progress in the synthesis of inorganic nanoparticles," *Dalt. Trans.*, vol. 41, no. 17, pp. 5089–5120, May 2012, doi: 10.1039/c2dt12266a.
- [88] J. Kou, C. Bennett-Stamper, and R. S. Varma, "Green synthesis of noble nanometals (Au, Pt, Pd) using glycerol under microwave irradiation conditions," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 7, pp. 810–816, Jul. 2013, doi: 10.1021/sc400007p.
- [89] X. Liu, C. Cui, Y. Cheng, H. Ma, and D. Liu, "Shape control technology during electrochemical synthesis of gold nanoparticles," *Int. J. Miner. Metall. Mater.*, vol. 20, no. 5, pp. 486–492, 2013, doi: 10.1007/s12613-013-0755-y.
- [90] S.-J. Li, D.-H. Deng, Q. Shi, and S.-R. Liu, "Electrochemical synthesis of a graphene sheet and gold nanoparticle-based nanocomposite, and its application to amperometric sensing of dopamine," *Microchim. Acta*, vol. 177, no. 3, pp. 325–331, 2012, doi: 10.1007/s00604-012-0782-9.

- [91] G. H. Yang, A. Abulizi, and J. J. Zhu, “Sonochemical fabrication of gold nanoparticles-boron nitride sheets nanocomposites for enzymeless hydrogen peroxide detection,” in *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, vol. 21, no. 6, pp. 1958–1963, doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.01.020.
- [92] J. Ali, N. Ali, L. Wang, H. Waseem, and G. Pan, “Revisiting the mechanistic pathways for bacterial mediated synthesis of noble metal nanoparticles,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 159, pp. 18–25, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.010>.
- [93] J. Ali, N. Ali, S. U. U. Jamil, H. Waseem, K. Khan, and G. Pan, “Insight into eco-friendly fabrication of silver nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* and its potential impacts,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 4, pp. 3266–3272, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.06.038>.
- [94] N. Pantidos, “Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants,” *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 05, no. 05, 2014, doi: 10.4172/2157-7439.1000233.
- [95] S. A. Kumar, Y.-A. Peter, and J. L. Nadeau, “Facile biosynthesis, separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 49, p. 495101, Nov. 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/49/495101.
- [96] J. Qiao and L. Qi, “Recent progress in plant-gold nanoparticles fabrication methods and bio-applications,” *Talanta*, vol. 223. Elsevier B.V., Feb. 01, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121396.
- [97] M. N. Alam *et al.*, “*Murraya koenigii* spreng. leaf extract: An efficient green multifunctional agent for the controlled synthesis of au nanoparticles,” *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 2, no. 4, pp. 652–664, Apr. 2014, doi: 10.1021/sc400562w.
- [98] S. Yallappa, J. Manjanna, B. L. Dhananjaya, U. Vishwanatha, B. Ravishankar, and H. Gururaj, “Phytosynthesis of gold nanoparticles using *Mappia foetida* leaves extract and their conjugation with folic acid for delivery of doxorubicin to cancer cells,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 9, 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5567-3.
- [99] J. O. Kuti and E. S. Torres, “Potential nutritional and health benefits of tree spinach,” *Prog. new Crop.*, vol. 13, no. 5, pp. 516–520, 1996.
- [100] D. Berkelaar, “Chaya,” Florida, 2006.
- [101] J. M. E. Aguilar Luna, P. A. Macario Mendoza, E. Huerta Lwanga, S. Hernández Daumás, R. de Alba Becerra, and E. García Villanueva, “CRECIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD DE CHAYA (*Cnidoscolus chayamansa* MCVAUGH, EUPHORBIACEAE) CON DENSIDAD DE PLANTACIÓN VARIABLE,” *Cultiv. Trop.*, vol. 32, no. 1, pp. 42–48, 2011.
- [102] G. Bendaña, “Chaya, valor nutricional, cultivo, utilización,” Jan. 2020.
- [103] J. Ross-Ibarra and A. Molina-Cruz, “The ethnobotany of Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* ssp. *aconitifolius* Breckon): A Nutritious Maya Vegetable,” *Econ. Bot.*, vol. 56, no. 4, pp. 350–365, 2002.

- [104] G. A. Gutiérrez-, M. Z. Pérez González, and M. A. Jiménez Arellanes, “Importancia nutricional, farmacológica y química de la chaya (*Cnidoscolus chayamansa*). Revisión bibliográfica,” *Rev. Temas Cienc. y Tecnol.*, vol. 20, pp. 43–56, 2016.
- [105] R. I. Godínez-Santillán, J. L. Chávez-Servín, T. García-Gasca, and S. H. Guzmán-Maldonado, “Phenolic characterization and antioxidant capacity of alcoholic extracts from raw and boiled leaves of *Cnidoscolus aconitifolius* (Euphorbiaceae),” *Acta Bot. Mex.*, no. 126, Jun. 2019, doi: 10.21829/abm126.2019.1493.
- [106] J. O. Kuti and H. B. Konuru, “Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidoscolus* spp.),” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 1, pp. 117–121, 2004, doi: 10.1021/jf030246y.
- [107] M. Ramos-Gomez *et al.*, “Phytochemical Profile, Antioxidant Properties and Hypoglycemic Effect of Chaya (*Cnidoscolus Chayamansa*) in STZ-Induced Diabetic Rats,” *J. Food Biochem.*, vol. 41, no. 1, Feb. 2017, doi: 10.1111/jfbc.12281.
- [108] R. F. González-Laredo, M. E. Flores De, L. A. Hoya, M. J. Quintero-Ramos, and J. J. Karchesy, “Flavonoid and Cyanogenic Contents of Chaya (Spinach Tree),” *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 58, pp. 1–8, 2003, doi: <https://doi.org/10.1023/B:QUAL.0000041142.48726.07>.
- [109] A. A. Oyagbemi and A. A. Odetola, “Hepatoprotective Effects of Ethanolic Extract of *Cnidoscolus aconitifolius* on Paracetamol-Induced,” *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 164–169, 2010, doi: 10.3923/pjbs.2010.164.169.
- [110] F. Caruso, *Colloids and Colloid Assemblies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [111] L. L. Schramm, *Emulsions, Foams, and Suspensions Fundamentals and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [112] L. Boyadzhiev and Z. Lazarova, “Liquid membranes (liquid pertraction),” in *Membrane Separations Technology: Principles and Applications*, vol. 2, 1995, pp. 283–352.
- [113] D. Myers, *Surfaces, Interfaces, and Colloids*, Second Edi. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [114] H. Nazir *et al.*, “Silicone oil emulsions: strategies to improve their stability and applications in hair care products,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 36, no. 2, pp. 124–133, Apr. 2014, doi: 10.1111/ics.12104.
- [115] P. A. Lovell and F. J. Schork, “Fundamentals of Emulsion Polymerization,” *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 11, pp. 4396–4441, Nov. 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00769.
- [116] T. J. Silva, D. Barrera-Arellano, and A. P. B. Ribeiro, “Oleogel-based emulsions: Concepts, structuring agents, and applications in food,” *J. Food Sci.*, vol. 86, no. 7, pp. 2785–2801, Jul. 2021, doi: 10.1111/1750-3841.15788.
- [117] V. Mundada, M. Patel, and K. Sawant, “Submicron Emulsions and Their Applications in Oral Delivery,” *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, vol. 33, no. 3, pp. 265–308, 2016, doi:

- 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016017218.
- [118] M. Homs, “Estudi de la formació de nano-emulsions per mètodes de baixa energia,” Universitat de Barcelona, Barcelona, Maig, 2006.
- [119] A. G. Gómez Vega, “Formulación y caracterización de nano-emulsiones de aceite de parafina tipo agua-en-aceite (W/O),” Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Monterrey, 2014.
- [120] M. J. García-Celma, M. Homs, D. Morales, and C. Solans, “Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications,” in *Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists*, Elsevier Inc., 2016, pp. 365–388.
- [121] H. H. Tayeb, R. Felimban, S. Almaghrabi, and N. Hasaballah, “Nanoemulsions: Formulation, characterization, biological fate, and potential role against COVID-19 and other viral outbreaks,” *Colloids Interface Sci. Commun.*, vol. 45, no. July, p. 100533, 2021, doi: 10.1016/j.colcom.2021.100533.
- [122] A. Dzimitrowicz *et al.*, “Application of Oil-in-Water Nanoemulsion Carrying Size-Defined Gold Nanoparticles Synthesized by Non-thermal Plasma for the Human Breast Cancer Cell Lines Migration and Apoptosis,” *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 40, no. 4, pp. 1037–1062, Jul. 2020, doi: 10.1007/s11090-020-10070-6.
- [123] J. Eastoe and R. F. Tabor, “Surfactants and nanoscience,” in *Colloidal Foundations of Nanoscience*, Elsevier, 2022, pp. 153–182.
- [124] Y. Zhu and M. L. Free, “Introduction to Surfactants,” in *Surfactants in Precision Cleaning*, Elsevier, 2022, pp. 1–53.
- [125] J. H. Schulman, W. Stoeckenius, and L. M. Prince, “Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy,” *J. Phys. Chem.*, vol. 63, no. 10, pp. 1677–1680, 1959.
- [126] S. Kumar, M. Y. Wani, and J. Koh, “Synthesis of Nanomaterials Involving Microemulsion and Micellar Medium,” in *Nanotechnology in the Life Sciences*, Springer Science and Business Media B.V., 2018, pp. 273–290.
- [127] N. Pal, N. Saxena, and A. Mandal, “Phase Behavior, Solubilization, and Phase Transition of a Microemulsion System Stabilized by a Novel Surfactant Synthesized from Castor Oil,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 62, no. 4, pp. 1278–1291, Apr. 2017, doi: 10.1021/acs.jced.6b00806.
- [128] N. V Thampi, K. Ojha, and U. G. Nair, “Effect of branched alcohols on phase behavior and physicochemical properties of Winsor IV microemulsions,” *J. Surfactants Deterg.*, vol. 17, no. 2, pp. 371–381, 2014.
- [129] J. Eastoe *et al.*, “Ionic liquid-in-oil microemulsions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 20, pp. 7302–7303, 2005.
- [130] D. S. Moon and J. K. Lee, “Tunable synthesis of hierarchical mesoporous silica nanoparticles with radial wrinkle structure,” *Langmuir*, vol. 28, no. 33, pp. 12341–12347, Aug. 2012, doi: 10.1021/la302145j.

- [131] A. Serrà, E. Gómez, G. Calderó, J. Esquena, C. Solans, and E. Vallés, “Conductive microemulsions for template CoNi electrodeposition,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 35, p. 14653, 2013, doi: 10.1039/c3cp52021h.
- [132] R. Fortes Martín, C. Prietzel, and J. Koetz, “Template-mediated self-assembly of magnetite-gold nanoparticle superstructures at the water-oil interface of AOT reverse microemulsions,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 581, pp. 44–55, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.jcis.2020.07.079.
- [133] S. Asgari, A. H. Saberi, D. J. McClements, and M. Lin, “Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 86, pp. 118–130, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.008.
- [134] E. T. Adesuji, V. O. Torres-Guerrero, J. A. Arizpe-Zapata, M. Videa, M. Sánchez-Domínguez, and K. M. Fuentes, “Bicontinuous microemulsion as confined reaction media for the synthesis of plasmonic silver self-assembled hierarchical superstructures,” *Nanotechnology*, vol. 31, no. 42, p. 425601, 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab9f75.
- [135] E. Negro, R. Latsuzbaia, and G. J. M. Koper, “Bicontinuous microemulsions for high yield wet synthesis of ultrafine platinum nanoparticles: Effect of precursors and kinetics,” *Langmuir*, vol. 30, no. 28, pp. 8300–8307, 2014, doi: 10.1021/la502055z.
- [136] R. G. López, P. Y. Reyes, J. A. Espinoza, M. E. Treviño, and H. Saade, “Synthesis of silver nanoparticles by precipitation in bicontinuous microemulsions,” *J. Nanomater.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/948941.
- [137] S. Tanimoghdam and A. Salabat, “A microemulsion method for preparation of thiol-functionalized gold nanoparticles,” *Particuology*, vol. 37, pp. 33–36, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.partic.2017.05.007.
- [138] I. Capek, “Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 110, no. 1–2, pp. 49–74, Jun. 30, 2004, doi: 10.1016/j.cis.2004.02.003.
- [139] M. Sanchez-Dominguez, K. Pemartin, and M. Boutonnet, “Preparation of inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: A soft and versatile approach,” *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 17, no. 5, pp. 297–305, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.cocis.2012.06.007.
- [140] N. L. Olteanu *et al.*, “Tuning gold nanoparticles size and surface charge by oil-in-water microemulsion template,” *Artic. Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 8, no. 4, pp. 1687–1697, 2013.
- [141] M. Sanchez-Dominguez, M. Boutonnet, and C. Solans, “A novel approach to metal and metal oxide nanoparticle synthesis: The oil-in-water microemulsion reaction method,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 11, no. 7, pp. 1823–1829, Oct. 2009, doi: 10.1007/s11051-009-9660-8.
- [142] A. Pal, S. Shah, and S. Devi, “Preparation of silver, gold and silver–gold bimetallic nanoparticles in w/o microemulsion containing TritonX-100,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 302, no. 1–3, pp. 483–487, Jul. 2007, doi:

- 10.1016/j.colsurfa.2007.03.032.
- [143] C. Tojo, D. Buceta, and M. A. López-Quintela, “Bimetallic nanoparticles synthesized in microemulsions: A computer simulation study on relationship between kinetics and metal segregation,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 510, pp. 152–161, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2017.09.057.
- [144] A. Salabat and F. Mirhoseini, “A novel and simple microemulsion method for synthesis of biocompatible functionalized gold nanoparticles,” *J. Mol. Liq.*, vol. 268, pp. 849–853, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.07.112.
- [145] K. Jadhav, I. Shaikh, K. Ambade, and V. Kadam, “Applications of Microemulsion Based Drug Delivery System,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 3, no. 3, pp. 267–273, Jul. 2006, doi: 10.2174/156720106777731118.
- [146] S. P. Callender, J. A. Mathews, K. Kobernyk, and S. D. Wettig, “Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 526, no. 1–2, pp. 425–442, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.005.
- [147] R. B. Patel, M. R. Patel, S. D. Thakore, and B. G. Patel, “Nanoemulsion as a Valuable Nanostructure Platform for Pharmaceutical Drug Delivery,” in *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication*, Elsevier, 2017, pp. 321–341.
- [148] A. Gagliardi, S. Voci, M. C. Salvatici, M. Fresta, and D. Cosco, “Brij-stabilized zein nanoparticles as potential drug carriers,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 201, no. December 2020, p. 111647, 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111647.
- [149] K. L. Dionisio *et al.*, “The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products,” *Sci. Data*, vol. 5, no. 1, p. 180125, 2018, doi: 10.1038/sdata.2018.125.
- [150] H. Shah, A. Jain, G. Laghate, and D. Prabhudesai, “Pharmaceutical excipients,” *Remingt. Sci. Pract. Pharm.*, pp. 633–643, 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-820007-0.00032-5.
- [151] M. J. O’Neil and K. Heckelman, PE, Dobbelaar PH, Roman, “The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, ; Merck and Co,” *Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2013.
- [152] S. E. Çelik, M. Özyürek, K. Güçlü, and R. Apak, “Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods,” *Talanta*, vol. 81, no. 4–5, pp. 1300–1309, 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.02.025.
- [153] M. Özyürek, K. Güçlü, and R. Apak, “The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 4, pp. 652–664, 2011, doi: 10.1016/j.trac.2010.11.016.
- [154] M. Özyürek *et al.*, “A comprehensive review of CUPRAC methodology,” *Anal. Methods*, vol. 3, pp. 2439–2453, Aug. 2011, doi: 10.1039/C1AY05320E.
- [155] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 1, pp.

- 70–76, 1996, doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- [156] P. E. Guajardo-Fajardo, “Evaluación de la Capacidad Antioxidante de diferentes Variedades Autóctonas de Higo (*Ficus carica*) de las Islas Baleares,” *Universitat de les Illes Balears*, 2019.
- [157] M. M. Cauich Díaz, “Caracterización y aplicación del extracto acuoso de ‘*Cnidoscolus chayamasa* McVaugh (Chaya Maya)’ en la síntesis de nanopartículas,” *Universidad de Guanajuato, Guanajuato*, 2016.
- [158] W. A. Vallejo, C. Diaz, M. Alvis, A. Cantillo, and C. Fajardo, “Methylene blue degradation under visible irradiation on TiO₂ electrodes sensitized by dye chlorophyll extract from *Spinacia Olera*/Degradación de azul de metileno bajo irradiación visible sobre electrodos de TiO₂ sensibilizados con pigmentos de clorofila..,” *Prospectiva*, vol. 16, no. 2, pp. 7–12, Jul. 2018, doi: 10.15665/rp.v16i2.1455.
- [159] J. F. G. M. Wintermans and A. De Mots, “Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol,” *Biochim. Biophys. Acta - Biophys. Incl. Photosynth.*, vol. 109, no. 2, pp. 448–453, Nov. 1965, doi: 10.1016/0926-6585(65)90170-6.
- [160] M. Krysa, M. Szymańska-Chargot, and A. Zdunek, “FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review,” *Food Chem.*, vol. 393, no. February, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133430.
- [161] D. R. Pompeu, Y. Larondelle, H. Rogez, O. Abbas, J. A. F. Pierna, and V. Baeten, “Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools,” *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, vol. 22, no. 1, pp. 13–28, 2018, doi: 10.25518/1780-4507.16270.
- [162] Z. Jurasekova, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes, “Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 37, no. 11, pp. 1239–1241, 2006, doi: 10.1002/jrs.1634.
- [163] M. Paczkowska *et al.*, “Application of spectroscopic methods for identification (FT-IR, Raman spectroscopy) and determination (UV, EPR) of quercetin-3-O-rutinoside. Experimental and DFT based approach,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 140, pp. 132–139, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.12.050.
- [164] A. Bard, *Standard potentials in aqueous solution*. Routledge, 2017.
- [165] A. R. Shafiq, A. Abdul Aziz, and B. Mehrdel, “Nanoparticle Optical Properties: Size Dependence of a Single Gold Spherical Nanoparticle,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1083, p. 012040, Aug. 2018, doi: 10.1088/1742-6596/1083/1/012040.
- [166] N. G. Bastús, J. Comenge, and V. Puentes, “Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening,” *Langmuir*, vol. 27, no. 17, pp. 11098–11105, Sep. 2011, doi: 10.1021/la201938u.
- [167] R. D. Rivera Rangel, “Síntesis verde de nanopartículas de plata en microemulsiones y nano emulsiones,” *Universidad de Guanajuato, Guanajuato*, 2018.

- [168] A. M. Elokhov, O. S. Kudryashova, and A. E. Lesnov, "Salting-in Effects in Inorganic Acid–Ethoxylated Surfactant–Water Systems," *Russ. J. Phys. Chem. A*, vol. 93, no. 9, pp. 1822–1826, 2019, doi: 10.1134/S003602441909005X.
- [169] H. F. Eicke and W. Meier, "Interfacial charge transport in water-in-oil microemulsions stabilized by ionic-non-ionic surfactant mixtures," *Biophys. Chem.*, vol. 58, no. 1–2, pp. 29–37, 1996, doi: 10.1016/0301-4622(95)00083-6.
- [170] D. Kozanoglu, D. H. Apaydin, A. Cirpan, and E. N. Esenturk, "Power conversion efficiency enhancement of organic solar cells by addition of gold nanostars, nanorods, and nanospheres," *Org. Electron.*, vol. 14, no. 7, pp. 1720–1727, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.orgel.2013.04.008.
- [171] A. Woźniak *et al.*, "Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 28, no. 6, p. 92, Jun. 2017, doi: 10.1007/s10856-017-5902-y.
- [172] M. Wojnicki, E. Rudnik, M. Luty-Błocho, K. Paclawski, and K. Fitzner, "Kinetic studies of gold(III) chloride complex reduction and solid phase precipitation in acidic aqueous system using dimethylamine borane as reducing agent," *Hydrometallurgy*, vol. 127–128, pp. 43–53, 2012, doi: 10.1016/j.hydromet.2012.06.015.
- [173] L. Ducasse, M. Dussauze, J. Grondin, J.-C. Lassègues, C. Naudin, and L. Servant, "Spectroscopic study of poly(ethylene oxide)₆: LiX complexes (X = PF₆, AsF₆, SbF₆, ClO₄)," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 5, no. 3, pp. 567–574, Jan. 2003, doi: 10.1039/b211166g.
- [174] P. . Murphy and M. . LaGrange, "Raman spectroscopy of gold chloro-hydroxy speciation in fluids at ambient temperature and pressure: a re-evaluation of the effects of pH and chloride concentration," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 62, no. 21–22, pp. 3515–3526, Nov. 1998, doi: 10.1016/S0016-7037(98)00246-4.
- [175] J. A. Tossell, "The speciation of gold in aqueous solution: A theoretical study," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 60, no. 1, pp. 17–29, Jan. 1996, doi: 10.1016/0016-7037(95)00384-3.
- [176] B. Varnholt, P. Oulevey, S. Lubert, C. Kumara, A. Dass, and T. Bürgi, "Structural information on the Au-S interface of thiolate-protected gold clusters: A raman spectroscopy study," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 18, pp. 9604–9611, May 2014, doi: 10.1021/jp502453q.