

Mayo  
2018



| UNIVERSIDAD  
| DE GUANAJUATO |

# SÍNTESIS VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MICROEMULSIONES Y NANO-EMULSIONES

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN QUÍMICA  
PRESENTA:

**Q. RUBÉN DARÍO RIVERA RANGEL**

**Directora:** Dra. María del Pilar González Muñoz.

**Codirector:** Dr. Mario Ávila Rodríguez.

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
POSGRADO EN QUÍMICA.

Por este medio el Q. Rubén Darío Rivera Rangel agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca doctoral otorgada durante el período de Agosto 2012-Julio 2017.

La investigación titulada “Síntesis Verde de Nanopartículas de Plata en Microemulsiones y Nano-emulsiones” fue realizado por el Q. Rubén Darío Rivera Rangel, para obtener el grado de Doctor en Química, en los laboratorios del Departamento de Química Sede Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección la Dra. María del Pilar González Muñoz y del Dr. Mario Ávila Rodríguez. Así como también en las instalaciones del grupo de Química Coloidal e Interfacial (QCI) del Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC) en Barcelona, España bajo la asesoría de la Dra. Conxita Solans.

---

**Dra. María del Pilar González Muñoz**

---

**Dr. Mario Ávila Rodríguez**

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Quiero agradecer a mis asesores la Dra. Pilar González y al Dr. Mario Ávila por una vez más confiar en mí y en el trabajo desempeñado durante todo el doctorado.

También agradecer a la Dra. Conxita Solans y todo su equipo (Maria, Rodrigo, Ferran, Yoran, Albert, Eva, Jonathan, Susana, Marta, Elena, Jordi, Aurora y Gaby) por recibirme en su grupo en donde adquirí gran conocimiento y mi trabajo se nutrió muchísimo.

A mis amigos de Barcelona, David el «*meu professor de català*» y Valentín mi guía turístico, muchas gracias por todo «*moltes gràcies per tot*».

También agradecer a todos aquellos que estuvieron siempre ahí, a mi familia y amigos, de los cuales siempre recibía ánimos y buenos deseos. Fueron y serán siendo mi sostén. Gracias.

Al mejor *team* Ivette, Lupita, Tere y Lili, definitivamente este viaje no hubiese sido el mismo sin ustedes.

***No hay experimentos fallidos, sólo experimentos con resultados inesperados.***

**Richard Buckminster-Fuller (1895-1983).**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
RESUMEN .....	xv
INTRODUCCIÓN .....	xvi
Capítulo 1 .....	20
NANOTECNOLOGÍA Y ANTECEDENTES .....	21
Materiales nanoparticulados .....	22
SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS .....	26
Síntesis electroquímica .....	26
Síntesis sonoquímica .....	26
Síntesis radiolítica .....	27
Síntesis fotoquímica .....	28
Síntesis química .....	29
Mecanismos de formación de nanopartículas en solución .....	30
Síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas .....	32
Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de hojas de geranio como componente reductor .....	36
Mecanismo de formación de AgNPs .....	37
Factores involucrados en la síntesis de AgNPs .....	37
Aplicación de las AgNPs .....	38
MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN PARA NANOPARTÍCULAS DE PLATA .....	39
Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	39
Resonancia del Plasmón Superficial (RPS) .....	42
Microscopia de imagen hiperespectral Cytoviva .....	45
EMULSIONES .....	49
Nano-emulsiones .....	53

MICROEMULSIONES. ....	58
Comportamiento de fase.....	59
Diagramas ternarios de fase (TPD). ....	60
Formación de microemulsiones.....	62
Polidispersidad.....	63
Composición.....	64
Tensoactivos.....	64
Balance Hidrófilo-Lipófilo (HLB).....	66
Co-tensoactivos.....	67
Fase orgánica.....	67
Fase acuosa.....	69
Conductividad.....	69
Propiedades dinámicas de las microemulsiones.....	70
INTERACCIONES ENTRE GOTAS E INTERCAMBIO MICELAR. ....	72
Síntesis de nanopartículas metálicas en microemulsiones.....	73
MICROEMULSIONES LIBRES DE TENSOACTIVO.....	77
Capítulo 2 .....	79
Materiales y métodos.....	80
Tensoactivos.....	80
Co-tensoactivos.....	81
Aceite.....	81
Fases acuosas.....	82
Otros reactivos.....	82
Métodos.....	83
Obtención del extracto acuoso de hojas de <i>P. hortorum</i> .....	83
Poder reductor del extracto (FRAP).....	83
Formación de microemulsiones y comportamiento fásico.....	84
Conductividad.....	86
Tamaño de gota y de partícula.....	86
Potencial zeta.....	87
Análisis FTIR.....	88

Síntesis de nanopartículas .....	88
Tratamiento estadístico .....	90
Capítulo 3 .....	92
CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE GERANIO. .	93
MEZCLAS TERNARIAS LIBRES DE TENSOACTIVO (MICROEMULSIONES) COMO NANOREACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO EXTRACTO DE HOJAS DE <i>P. hortorum</i> COMO REDUCTOR. ....	96
Comportamiento fásico. ....	96
Caracterización estructural. ....	97
Síntesis de nanopartículas de plata. ....	100
Caracterización.....	100
Influencia de la concentración de plata y cinética de reacción. ....	105
Influencia de la variación del pH en la síntesis de nanopartículas de plata. ....	108
Conclusiones .....	111
MEZCLAS TERNARIAS LIBRES DE TENSOACTIVO (MICROEMULSIONES) COMO NANOREACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO HIDRÓXIDO DE SODIO Y EXTRACTO DE HOJAS DE <i>P.</i> <i>hortorum</i> COMO REDUCTORES. ....	112
Efecto de la temperatura .....	112
Variación de la concentración de hidróxido de sodio. ....	117
Caracterización FTIR.....	120
Variación de la cantidad de hidróxido de sodio en la síntesis. ....	122
Síntesis utilizando el extracto de hojas de <i>P. hortorum</i> (GLE) e hidróxido de sodio.....	126
Conclusiones .....	127
MICROEMULSIONES Y NANO-EMULSIONES FORMULADAS CON TENSOACTIVOS NO IÓNICOS DE BAJA/NULA TOXICIDAD PARA EL MEDIO AMBIENTE UTILIZADOS COMO NANOREACTORES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO EXTRACTO DE HOJAS DE <i>P.</i> <i>hortorum</i> COMO REDUCTOR.....	129
COMPORTAMIENTO FÁSICO DE LOS SISTEMAS FORMULADOS CON TENSOACTIVOS NO IÓNICOS. ....	129
Reactividad a lo largo de distintas líneas de dilución.....	139

Influencia del contenido de GLE en el sistema. ....	142
Influencia de la concentración de estearato de plata. ....	144
Caracterización por FTIR.....	145
Potencial zeta. ....	146
Conclusiones .....	147
Capítulo 4 CONCLUSIONES GENERALES .....	149
ANEXO.....	151
BIBLIOGRAFIA .....	160

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Escala de dimensiones, adaptado de [1]. .....	21
Figura 1.2. Estrategias para la fabricación de nanomateriales. ....	23
Figura 1.3. Categorías de nanomateriales [3][4]. ....	25
Figura 1.4. Mecanismos de crecimiento propuestos por Henglein a bajas y óptimas concentraciones de citrato. Adaptado de [31]. ....	30
Figura 1.5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata. Adaptado de [32]. .....	31
Figura 1.6. Mecanismo de crecimiento de cuatro pasos para nanopartículas de plata, adaptado de [33]. ....	32
Figura 1.7. Posibles constituyentes de los extractos de plantas responsables de la bioreducción de los iones metálicos. Adaptado de [39][40]. ....	34
Figura 1.8. Numero de publicaciones registradas en Scopus correspondientes al periodo 2012- julio de 2017 sobre síntesis de nanopartículas metálicas y de oro y plata utilizando extractos acuosos de plantas. ....	39
Figura 1.9. Representación del efecto oscilante de los electrones de superficie en nanopartículas metálicas. ....	43
Figura 1.10. Nanopartículas de plata de 60 nm utilizadas en citodiagnóstico observadas en un microscopio óptico con la técnica de campo oscuro. [98].	43
Figura 1.11. Resonancia del plasmón superficial en función del tamaño de las nanopartículas de plata esféricas. [98] .....	44
Figura 1.12. (Arriba) Fotografía de soluciones de nanopartículas de plata con diferentes colores. (Abajo) Espectros de extinción de las nanopartículas de plata correspondientes a las soluciones anteriores. ....	45
Figura 1.13. Ejemplo de aplicación de CytoViva® para la visualización de la internalización de nanopartículas en las células de <i>Caenorhabditis elegans</i> . ....	48
Figura 1.14. Imágenes hiperespectrales y los perfiles espectrales de nanopartículas en longitudes de onda visible e infrarroja cercanas (VNIR: 400-1000 nm). ....	49

Figura 1.15. Ilustración esquemática de los procesos de rompimiento en las emulsiones. Adaptado de [258].	51
Figura 1.16. Representación esquemática de un posible mecanismo de formación de nano-emulsiones O/W por el método PIT. La curvatura de la película interfacial del tensoactivo se cambia por enfriamiento, y la fase bicontinua D se rompe, formando nanogotas. A) Una fase de microemulsión D de aceite es la fase de equilibrio inicial; B) dos fases, W + D, son el equilibrio inicial, y el exceso de agua no está participando en la formación de nanogotas, sino como medio de dilución. Adaptado de [116].	55
Figura 1.17. Método de emulsificación espontanea. Adaptado de [119].	56
Figura 1.18. Estructuras de las mezclas de agua, aceite y tensoactivo descritas por Winsor. Adaptado de [129].	60
Figura 1.19. Diagrama Ternario de Fases. W: Agua, S: Tensoactivo, O: Aceite.	61
Figura 1.20. Representación esquemática de gotas de microemulsión: a)W/O y b)O/W. Adaptado de [137].	71
Figura 1.21. Representación gráfica de las diferentes conformaciones de las moléculas de aceite en una microemulsión de tipo O/W. Adaptado de [259].	72
Figura 1.22. Mecanismo de coalescencia entre gotas. [260]	72
Figura 1.23. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando microemulsiones. Adaptado de [261].	75
Figura 2.1. Diagrama ternario de fases utilizado para realizar un barrido rápido del comportamiento de fase, a partir de la dilución con agua (W) de mezclas aceite/tensoactivo (O/S) a temperatura constante.	85
Figura 3.1. Espectro EDS de los cristales obtenidos del extracto acuoso de las hojas de <i>P. hortorum</i> .	94
Figura 3.2. Espectro de infrarrojo del extracto de hojas de geranio obtenido mediante la técnica de pastilla de KBr.	95
Figura 3.3. Diagrama de fases ternario de los sistemas a) H <sub>2</sub> O/1-PrOH/Aceite de ricino y b) extracto de hojas de <i>P. hortorum</i> (GLE)/1-PrOH/Aceite de ricino a T=25±1 °C. La zona superior $\Phi$ a la línea bimodal corresponde a la zona	

monofásica o de microemulsión y la inferior a la zona multifásica $2\Phi$ , (★) es la composición elegida para realizar la síntesis de nanopartículas: Fase acuosa= 10 %P/P, Aceite= 40 %P/P y 1-PrOH= 50 %P/P. ....	97
Figura 3.4. Variación del tamaño de gota ( $R_h$ ) respecto al porcentaje en peso de agua adicionada. ....	98
Figura 3.5. a) Diagrama ternario de fases del sistema, la letra “a” denota la línea de dilución seguida para llevar a cabo la medición de la conductividad y b) perfil de conductividad del sistema. ....	99
Figura 3.6. Imagen del extracto (a) y espectro UV-vis de las nanopartículas de plata obtenidas y apariencia de las nanopartículas en el medio de reacción (b). ...	100
Figura 3.7. Distribución de tamaño de las nanopartículas sintetizadas en el sistema $[Ag^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ /1-PrOH/Aceite de Ricino utilizando extracto acuoso de hojas de geranio como reductor. Tamaño promedio $99.9 \pm 27.2 \text{ nm}$ . ....	101
Figura 3.8. Micrografías electrónicas de barrido de las partículas de plata sintetizadas, rodeadas del biomaterial del extracto de <i>P. hortorum</i> . ....	102
Figura 3.9. Espectro EDS de las partículas de plata obtenidas con el extracto de hojas de <i>P. hortorum</i> . ....	102
Figura 3.10. Espectros FTIR de las partículas de plata (azul) y del extracto de hojas de geranio (GLE; rojo). ....	103
Figura 3.11. a) Curva de calibración y b) perfiles de concentración obtenidos mediante espectrometría de absorción atómica de flama para la determinación de $Ag^+$ en disolución. ....	105
Figura 3.12. a) Evolución de la absorbancia máxima durante la formación de las partículas de plata utilizando una concentración de $AgNO_3 = 0.2 \text{ mol L}^{-1}$ y b) variación de la absorbancia máxima en función del tiempo. ....	106
Figura 3.13. Pasos involucrados durante la formación de las nanopartículas, de acuerdo a la forma de la gráfica de la cinética obtenida. ....	107
Figura 3.14. a) Evolución de la absorbancia máxima durante la formación de las partículas de plata utilizando una concentración de $AgNO_3 = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y b) variación de la absorbancia máxima en función del tiempo. ....	108

Figura 3.15. Desprotonación del grupo catecol del flavonoide quercetina, R: cualquier otra unidad. ....	109
Figura 3.16. a) Espectro UV-vis de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso de hojas de geranio a distintos pH e b) imágenes de los coloides. pH:5.4, 7 y 8; T=25 °C. ....	110
Figura 3.17. Espectros UV-vis de las nanopartículas sintetizadas a a) 25 °C y b) 80 °C, por acción reductora de la mezcla de hidróxido de sodio (0.1 mol L <sup>-1</sup> ) y aceite de ricino. [Ag <sup>+</sup> ]= 1x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> . ....	113
Figura 3.18. Imágenes obtenidas con el microscopio Cytoviva (100X) de las partículas sintetizadas a a) 25 °C y b) 80 °C, utilizando al aceite de ricino como reductor. ....	115
Figura 3.19. a) Espectros UV-vis y b) apariencia física de los coloides obtenidos de las partículas sintetizadas a distintas concentraciones (1-5x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ) a 80 °C y con [NaOH]= 0.1 mol L <sup>-1</sup> . ....	116
Figura 3.20. Imágenes de las partículas obtenidas con el microscopio Cytoviva (100X) al utilizar diferentes concentraciones de AgNO <sub>3</sub> . ....	117
Figura 3.21. Espectro UV-vis de las AgNPs obtenidas a una [Ag <sup>+</sup> ]=1 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> , T=80°C y [NaOH]= 0.1, 0.5 y 0.75 mol L <sup>-1</sup> . ....	118
Figura 3.22. Microscopias electrónicas de barrido (izq.) y perfiles de tamaño obtenidos de las fotografías (der.) de las nanopartículas sintetizadas con diferente concentración de hidróxido de sodio. [AgNO <sub>3</sub> ]= 1 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> de Ag <sup>+</sup> , T= 80 °C. ....	120
Figura 3.23. Espectros FTIR-ATR de la mezcla de reacción antes y después de llevada a cabo la síntesis de nanopartículas, así como del espectro de las nanopartículas de plata; a) Aceite de ricino, b) Mezcla antes de la síntesis compuesta de aceite de ricino, 1-Propanol e hidróxido de sodio 0.1 mol L <sup>-1</sup> , c) nanopartículas de plata, d) Mezcla después de la síntesis con [Ag <sup>+</sup> ]= 1x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> y e) 1-Propanol. ....	121
Figura 3.24. Posible acomodo de las moléculas de ácido ricinoleico adsorbidas sobre la superficie de las nanopartículas. ....	122

Figura 3.25. Espectro UV-vis y tamaños obtenidos mediante DLS de las AgNPs obtenidas al incrementar la cantidad de [NaOH]= 0.1 mol L <sup>-1</sup> adicionada al sistema de 10 % al 15 % utilizando una [Ag <sup>+</sup> ]= 1 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> y T= 80 °C...	123
Figura 3.26. Microscopias electrónicas de barrido y perfil del tamaño de las partículas sintetizadas con el incremento en el porcentaje de hidróxido de sodio 0.1 mol L <sup>-1</sup> y 1 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> de Ag <sup>+</sup> a 80 °C. ....	125
Figura 3.27. Espectro UV-vis de las nanopartículas obtenidas a 80 °C con el aceite de ricino (AR) y con la mezcla aceite de ricino y extracto de hojas de geranio (GLE). [Ag <sup>+</sup> ] =1 x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> , T= 80 °C y [NaOH]= 0.1 mol L <sup>-1</sup> ; GLE= 5 %; NaOH=5 %. ....	126
Figura 3.28. Micrografía MEB y perfil de tamaño de las nanopartículas sintetizadas bajo la acción del reductor GLE. [Ag <sup>+</sup> ]= 1x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> ; T=80 °C. ....	127
Figura 3.29. Diagrama de fase pseudo-ternario para los distintos co-tensoactivos probados con el tensoactivo Tween 80, la parte de la derecha muestra una ampliación de la zona rica en agua. Agua/Tween 80: Co-tensoactivo (1:1) /Aceite de ricino. ....	130
Figura 3.30. Diagramas pseudo-ternarios de fase para los distintos tensoactivos seleccionados utilizando el 1,2-hexanodiol como co-tensoactivo en una relación 1:1 (w/w). Las líneas punteadas dentro de los diagramas se refieren al comportamiento de otro tensoactivo. Φ: monofase; 2φ: multifase. ....	132
Figura 3.31. Diagrama de fases ternario del sistema Agua/Brij 96V/Aceite ricino a 25 °C donde se muestran las diferentes zonas encontradas. CL: Cristal líquido; EG: Emulsión/Gel; μE: microemulsión; 2φ: multifase. ....	134
Figura 3.32. Diagrama de fases pseudoternario de fases con distintas relaciones (w/w) tensoactivo: co-tensoactivo. 2φ: multifase; φ: una sola fase. ....	135
Figura 3.33. Diagrama de fases pseudoternario que muestra las distintas zonas del sistema Agua/Brij 96V:1,2-hexanodiol (1:1) /Aceite ricino. μE: microemulsión; nE: nanoemulsión; 2φ: multifase. ....	136
Figura 3.34. Figura donde se indica la a) línea de dilución utilizada para el análisis de conductividad (LD 35/65), b) y c) graficas de conductividad obtenidas para	

cuando la fase acuoso es agua y el extracto de hojas de geranio respectivamente. ....	137
Figura 3.35. Curvas de conductividad obtenidas para distintas líneas de dilución. ....	138
Figura 3.36. Diagrama de fase pseudo-ternario y curva de conductividad de la línea de dilución usada para la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto de hojas de geranio como reductor, los números indican las composiciones utilizadas para la síntesis. $\mu$ E: microemulsión, nE: nanoemulsión, 2 $\Phi$ : zona multifásica. ....	140
Figura 3.37. Espectros UV-vis de las nanopartículas sintetizadas utilizando diferentes contenidos de fase acuosa. ....	142
Figura 3.38. Imágenes de STEM de las nanopartículas sintetizadas con 5 % De AgSt y 50 % (Izquierda) y 80 % (Derecha) de GLE. En la parte inferior de la imagen se muestran las distribuciones de tamaño de partícula obtenido del conteo de las mismas en las micrografías obtenidas. ....	143
Figura 3.39. Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas con diferentes cantidades de AgSt a una concentración de $2.5 \times 10^{-3}$ mol L <sup>-1</sup> en el sistema usando 50 % de GLE. ....	144
Figura 3.40. Radio hidrodinámico de las nanopartículas de plata sintetizadas con diferentes contenidos de GLE en función del contenido del precursor metálico AgSt presente en el sistema. ....	145
Figura 3.41. Espectros FTIR de las AgNPs sintetizadas y espectros del GLE utilizados para la síntesis de nanopartículas. ....	146
Figura 3.42. Potencial zeta de las AgNPs sintetizadas con 5% de AgSt y diferentes contenidos de GLE en el sistema. ....	147

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Comparación entre los distintos sistemas de emulsiones y microemulsión. .....	53
Tabla 1.2. Intervalo de HLB de tensoactivos con diferentes usos, adaptado de [156]. .....	66
Tabla 1.3. Composición del aceite de soya [166]. .....	68
Tabla 1.4. Composición del aceite de ricino. ....	69
Tabla 2.1. Tensoactivos utilizados. ....	80
Tabla 2.2. Composiciones de los sistemas utilizados para la síntesis de las AgNPs en las mezclas ternarias libres de tensoactivo. ....	88
Tabla 2.3. Composiciones utilizadas para la síntesis de nanopartículas de plata en microemulsiones y nanoemulsiones O/W. ....	89
Tabla 3.1. Variación del tamaño de partícula en función del pH del extracto de P. hortorum.....	110
Tabla 3.2. Tamaños de partícula para las distintas concentraciones de plata probadas.....	116
Tabla 3.3. Tamaños de partículas obtenidos con DLS y MEB. ....	119
Tabla 3.4. Tamaños de partículas obtenidos con DLS y MEB. ....	124
Tabla 3.7. Radios hidrodinámicos obtenidos para las diferentes composiciones usadas a lo largo de la LD25/75 para la síntesis de nanopartículas de plata. .....	141

# RESUMEN

En este trabajo se propone un método verde de síntesis de nanopartículas de plata. Se seleccionó como medio de reacción a los sistemas de microemulsión y nano-emulsión debido a que estos sistemas se caracterizan por presentar tamaños de gota en el intervalo nanométrico, además de que han sido probados exitosamente en la producción de nanopartículas de plata. Para el método de síntesis se eligieron sistemas cuyos componentes presentan nula o baja toxicidad para los seres vivos y el medio ambiente. Aunado a lo anterior el uso del extracto de hojas de geranio (*P. hortorum*) como agente reductor se suma a considerar la síntesis como un proceso verde. Dos diferentes sistemas fueron empleados.

El primero de ellos fue un sistema libre de tensoactivos, las microemulsiones libres de tensoactivo (Surfactant-free microemulsions). Los estudios de comportamiento fásico mostraron que al utilizar el 1-propanol como tensoactivo, la zona monofásica se extiende en mayor grado. Por lo tanto el sistema fase acuosa/1-Propanol/Aceite de ricino fue el sistema elegido para la síntesis de nanopartículas de plata. Los resultados indicaron que estos sistemas no son aptos para el control en el tamaño de partícula, sin embargo, la producción de nanopartículas y partículas de plata puede llevarse a cabo.

Un segundo sistema fue probado, esta vez, en la formulación se incluyó un tensoactivo no iónico. El tensoactivo elegido fue el Brij 96V debido a la presencia de una mayor zona monofásica, sobre todo en la región aceite en agua (O/W). La cual se eligió para llevar a cabo la síntesis debido a que estos sistemas están compuestos en su mayoría por fase acuosa. El control en el tamaño de las partículas obtenidas se logra al variar la cantidad de fase acuosa en el sistema. Así, variados tamaños se obtienen al utilizar microemulsiones y nano-emulsiones O/W.

# INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha cobrado gran interés en la investigación debido a las propiedades físicas y químicas que muestran los nanomateriales. Los nanomateriales no son únicamente atractivos para la investigación sino también para la industria, debido a sus múltiples aplicaciones en dispositivos eléctricos, tecnología de uso diario, formulaciones cosméticas y farmacéuticas, entre otras. Las nanopartículas metálicas son uno de los tantos nanomateriales que se pueden sintetizar. Su reducido tamaño abre una amplia gama de aplicaciones como sensores para especies químicas y biológicas, remediación en procesos ambientales, catalizadores en reacciones de importancia a nivel industrial, etc.

Los métodos para obtener las nanopartículas metálicas se han diversificado enormemente. Entre las más utilizadas se puede citar a la síntesis química que es una de las más sencillas y eficaces al fundamentarse en una reacción redox y precipitación. Por otra parte, los métodos electroquímicos en donde los parámetros correctos de potencial, tiempo y medio de reacción aseguran el éxito para obtener nanopartículas y el método sonoquímico que en los últimos años ha cobrado gran relevancia debido a las propiedades que muestran las cavidades promovidas por la acción de las ondas sonoras en un medio líquido.

Una de las mayores desventajas de los métodos anteriores es la dispersión en tamaños y formas de las nanopartículas que se obtienen. La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando microemulsiones y nano-emulsiones, ofrece la ventaja de controlar el tamaño y forma de la nanopartícula a sintetizar y debido a la estabilidad termodinámica y cinética que éstos sistemas muestran, no se necesita de equipos especializados para su formación, por lo que en los últimos años las microemulsiones del tipo W/O como nanoreactores es una técnica que está en constante evolución e investigación en el área de síntesis de nanomateriales. De forma análoga la síntesis en sistemas del tipo O/W ha demostrado ser eficaz en la

obtención de nanopartículas metálicas obteniéndose además la ventaja de la reducción en la cantidad de disolventes orgánicos utilizados para su formulación.

Es importante mencionar que los sistemas de microemulsiones y nano-emulsiones estudiados hasta el momento para la síntesis de nanopartículas metálicas utilizan grandes cantidades de tensoactivos y disolventes orgánicos, lo cual hace a estos sistemas tóxicos, tanto para los seres vivos como para el medio ambiente. Es por esto que en la presente investigación se han formulado microemulsiones y nano-emulsiones con bajo impacto en el medio ambiente, utilizando aceites naturales y tensoactivos con una baja o nula toxicidad y sistemas libres de tensoactivo utilizando en su lugar alcoholes que son comúnmente usados como co-solventes. Además, de reducir los iones metálicos con extractos de plantas los cuales han mostrado ser eficaces en la síntesis de nanopartículas metálicas debido a los múltiples componentes con actividad antioxidante, sobre todo en la obtención de nanopartículas de plata.

Por lo anterior, en este trabajo de investigación de tesis doctoral se desarrolló una metodología de síntesis verde para obtener nanopartículas de plata con tamaño uniforme y controlado, por medio de microemulsiones y nano-emulsiones, utilizando una formulación de las mismas que no contiene elementos altamente tóxicos, y utilizando como agente reductor el extracto de hojas de *P. hortorum*.

Este documento está conformado por cuatro capítulos. En el primer capítulo se incluye una revisión bibliográfica, en donde de manera sucinta se abordan los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas para posteriormente describir de manera más detallada lo reportado en sistemas de microemulsiones y nano-emulsiones y su función como nanoreactores en la síntesis de nanopartículas metálicas, así como las tendencias existentes actualmente en el campo de la investigación en la síntesis de nanopartículas utilizando extractos de plantas.

En el capítulo dos se encuentra la sección de la metodología del proyecto donde se hace mención de los materiales y métodos utilizados en este proyecto.

El tercer capítulo corresponde a la sección de resultados y discusión donde se profundiza en la descripción y discusión de los resultados obtenidos. Este capítulo está conformado por tres partes, dividido así ya que se trata de tres formulaciones diferentes utilizadas para realizar la síntesis de las nanopartículas de plata. La primera parte aborda la caracterización del extracto de hojas de *P. hortorum* y la síntesis de nanopartículas de plata en sistemas ternarios libres de tensoactivo utilizando el extracto de hojas de *P. hortorum* como agente reductor y los distintos parámetros que pueden influir durante la síntesis. La segunda parte aborda el uso de sistemas ternarios libres de tensoactivos pero utilizando como agente generador de reductor in-situ al hidróxido de sodio, generando compuestos con actividad antioxidantes capaces de llevar a cabo la reducción de los iones metálicos, en esta sección también es estudiada la influencia que presenta la variación de distintos parámetros durante la síntesis. Finalmente la tercera parte involucra la síntesis de nanopartículas de plata en sistemas de microemulsiones y nano-emulsiones utilizando un tensoactivo no iónico, la influencia de la variación de los parámetros durante la síntesis fue estudiada de igual manera.

Por último el cuarto capítulo corresponde a las conclusiones generales del proyecto.

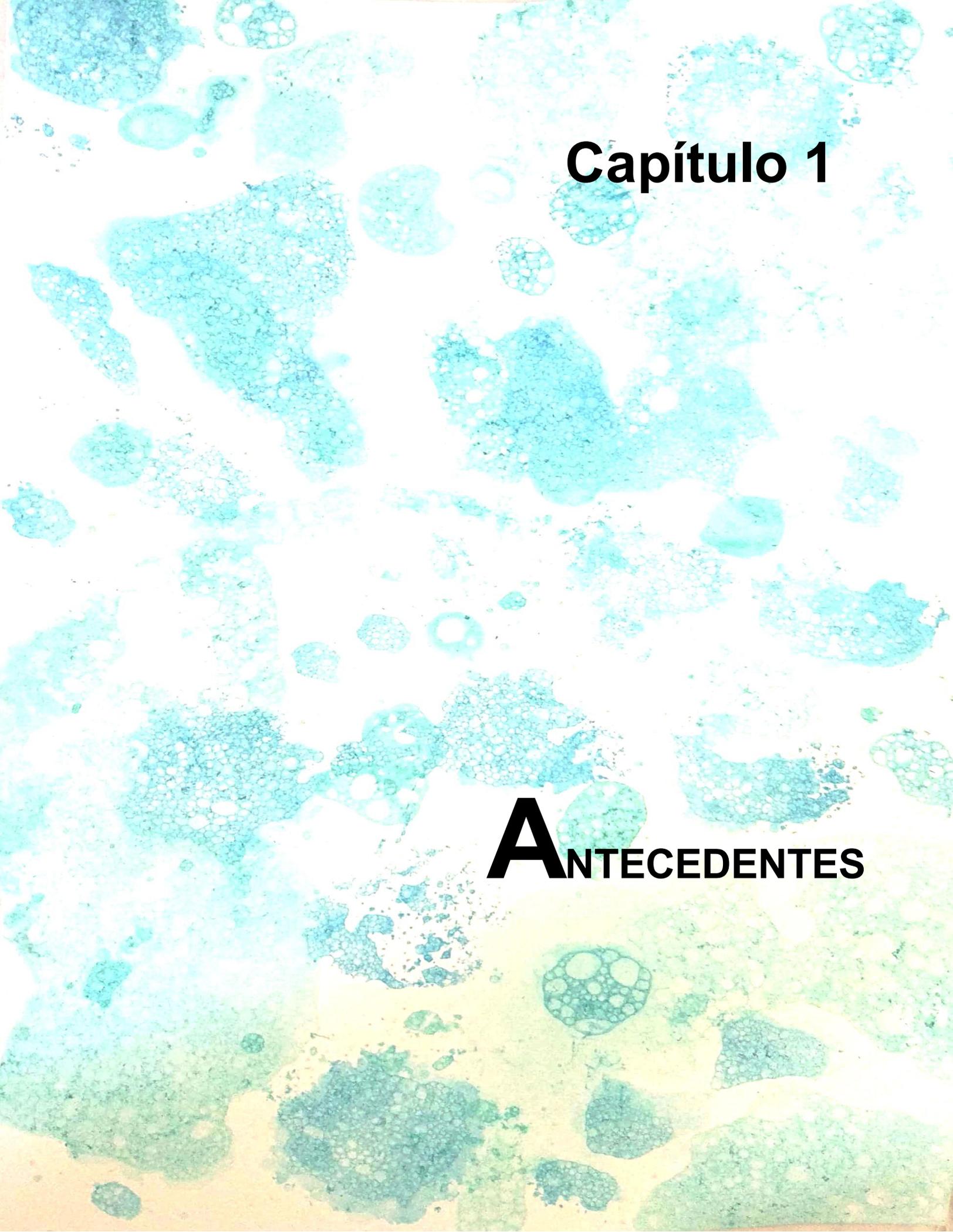
# OBJETIVOS

## Objetivo GENERAL

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

## Objetivos ESPECÍFICOS

1. Selección de componentes acuoso/tensioactivo/fase oleosa adecuados que permitan obtener sistemas de baja o nula toxicidad.
2. Determinación del comportamiento físico y caracterización de los sistemas elegidos mediante conductividad y dispersión de luz dinámica.
3. Preparación de nanopartículas de plata en microemulsiones y nano-emulsiones utilizando como reductor al extracto de hojas de *P. hortorum* 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

# A ANTECEDENTES

## NANOTECNOLOGÍA Y ANTECEDENTES.

El prefijo "nano" identifica el orden de escala de  $10^{-9}$  m, en dimensiones espaciales, significa estar únicamente un orden de magnitud por encima de las dimensiones típicas de los diámetros atómicos,  $1 \text{ \AA}$  ( $10^{-10}$  m), de aquí se define a los nanomateriales como aquellos materiales que tienen características estructurales de por lo menos una de sus dimensiones en nanómetros. En la Figura 1.1 podemos observar diferentes objetos con su respectivo intervalo de dimensiones.

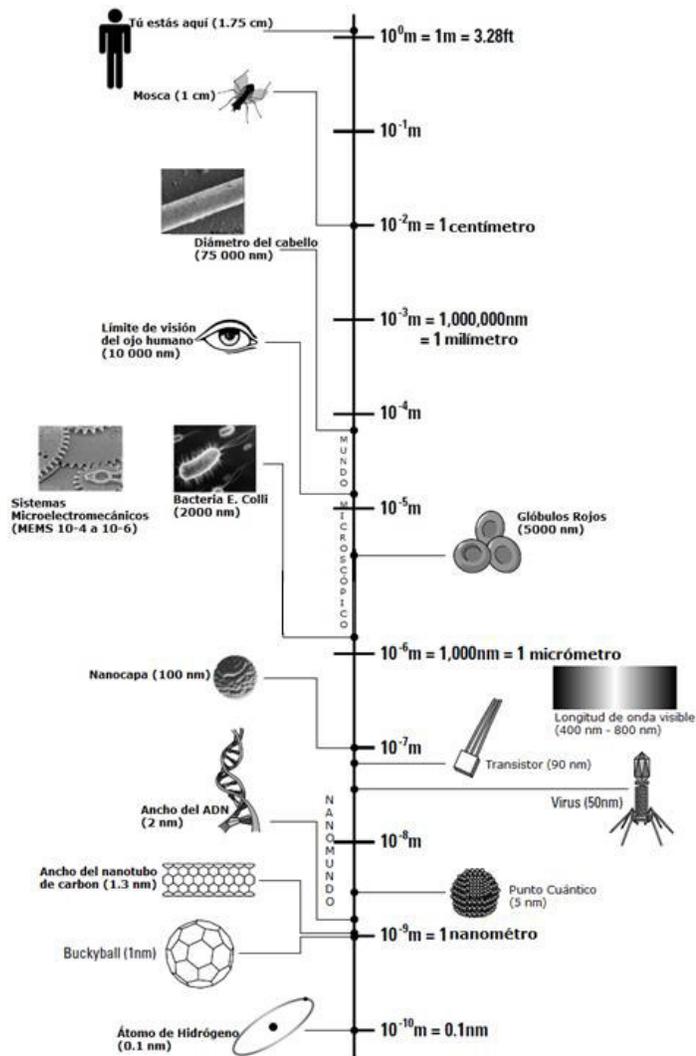


Figura 1.1. Escala de dimensiones, adaptado de [1].

Ante el surgimiento de la nanotecnología y los obstáculos con que se encontraron para definirla, se formó un comité en Estado Unidos llamado la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (the National Nanotechnology Initiative) y es así como se definieron las características de la nanotecnología:

1. La nanotecnología consiste en la investigación y el desarrollo tecnológico en el rango de 1 nm a 100 nm.
2. La nanotecnología crea y utiliza las estructuras que tienen nuevas propiedades, debido a su pequeño tamaño.
3. La nanotecnología se basa en la capacidad de controlar o manipular en la escala atómica.

#### **Materiales nanoparticulados.**

Existen dos caminos para sintetizar nanomateriales; de arriba hacia abajo (descendiente) y de abajo hacia arriba (ascendente) ilustrados en la Figura 1.2. El agotamiento o el moler un material hasta obtener pequeños materiales a nano-escala es un método de arriba hacia abajo típico en la fabricación de nanopartículas. En cambio, una dispersión coloidal en donde se forman cúmulos por cristalización es un buen ejemplo del método ascendente en la síntesis de nanopartículas.

Dentro de las técnicas descendentes tenemos los métodos físicos, la fotolitografía, procedimientos con rayo láser y técnicas mecánicas (molienda y pulido/lijado). En cuanto a las técnicas ascendentes encontramos a las distintas técnicas de síntesis en las que la investigación científica se ha enfocado como lo son los métodos químicos en solución, la síntesis orgánica, el auto-ensamblaje y la agregación coloidal, por mencionar algunos [2].

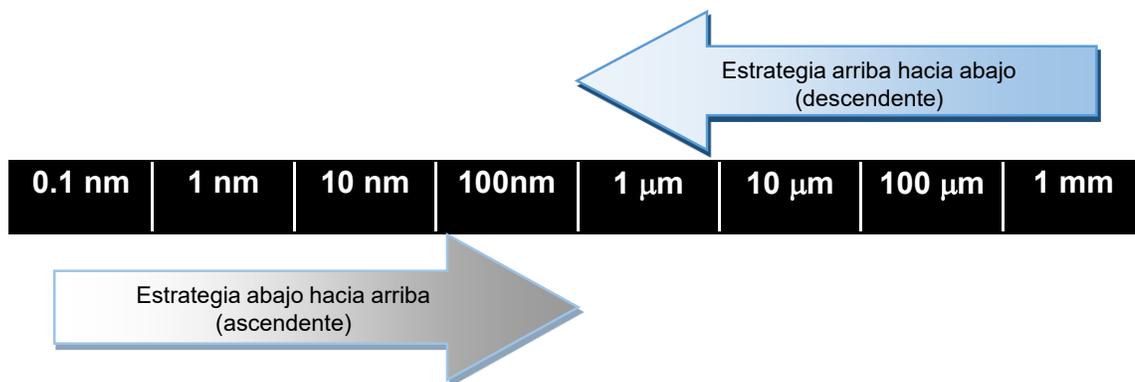


Figura 1.2. Estrategias para la fabricación de nanomateriales.

Existen ventajas y desventajas en este tipo de métodos, por ejemplo, en la estrategia descendente el material obtenido contiene imperfecciones en su estructura superficial. La estrategia descendente, como lo es la técnica de la litografía (la cual consiste en la creación de estructuras tridimensionales a escala nanoscópica en superficies delgadas mediante un proceso de estampado), puede causar un daño significativo en el cristal.

Tales imperfecciones tienen un efecto en las características físicas y químicas del nanomaterial, puesto que la superficie por unidad de volumen en los nanomateriales es muy grande. Las imperfecciones dan lugar a una conductividad térmica reducida debido a la dispersión superficial inelástica, que alternadamente llevaría a la generación de calor excesivo y por lo tanto al no poder controlar su estructura sería un material prácticamente inservible [3].

El método ascendente se reporta en mayor porcentaje en la literatura para la obtención de nanomateriales. La síntesis consiste en construir el nanomaterial átomo por átomo, por ejemplo, la producción de sal y de nitratos en la industria química o el depósito de películas en la industria electrónica. El principio de este método consiste en la acumulación de un material: átomo por átomo, molécula por molécula, o cúmulo por cúmulo hasta obtener un nanomaterial.

Aunque esta metodología no sea nada nueva, juega un importante papel en la fabricación y el proceso de obtención de nanoestructuras. El método ascendente da la oportunidad de obtener nanomateriales con menos defectos y una composición química más homogénea. Esto es debido a que este método es conducido principalmente por la reducción de la energía libre de Gibbs, de modo que las nanoestructuras y los nanomateriales producidos estén en un estado más cercano al equilibrio termodinámico [4].

El estudio de estos nanomateriales no sólo comprende la síntesis de ellos, sino el estudio las estructuras que estos toman, desde figuras que son llamadas de dimensión cero a las cuales corresponden las nanopartículas ya que en este caso las 3 dimensiones están en el orden de los nanómetros, las de una dimensión que están conformados por los nanotubos y nano-alambres éstos tienen una longitud variable conservando únicamente solo una dimensión en el orden de los nanómetros. Los de dos dimensiones que es el caso de las películas delgadas las cuales tienen áreas de tamaño indefinido pero un espesor que oscila entre 1 nm y 100 nm, y los materiales de tres dimensiones que son sólidos tridimensionales conformados por agregados de tamaño nanométrico. Existen divisiones dentro de los materiales nanoestructurados (ver Figura 1.3), los cuales se dividen en aquellos que proceden de materiales orgánicos, materiales poliméricos y aquellos que provienen de materia inorgánica, siendo así éstos últimos nanomateriales los que han sido más estudiados en los últimos años [5][6][7].

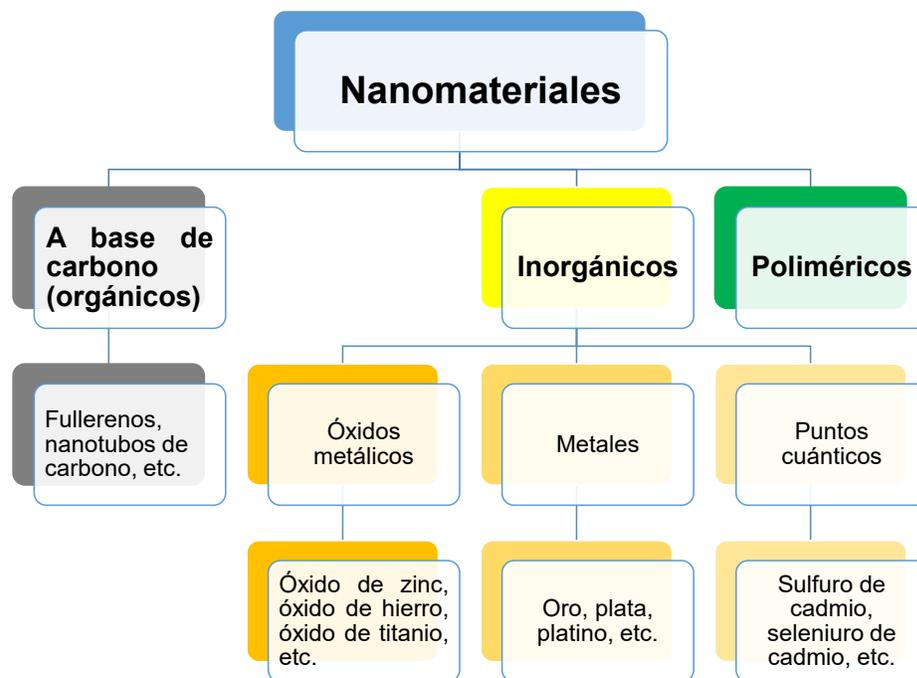


Figura 1.3. Categorías de nanomateriales [8][9].

Los metales nobles como el Au, Ag y Pt nanoestructurados, han llegado a tener una gran importancia debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan, tales como la conductividad eléctrica, conductividad térmica y resistencia a la corrosión. Éstos nanomateriales han sido de gran interés ya que se han visto ventajas en la utilización en distintas aplicaciones tecnológicas tales como la catálisis [10], sensores químicos [11] y biológicos [12], en óptica [13], espectroscopía Raman amplificada en superficie (SERS) [14], en la industria cosmética [15] y farmacéutica [16].

Existe una gran variedad de técnicas que se emplean para llevar a cabo la síntesis de estos materiales, entre las más utilizadas encontramos las técnicas, electroquímicas, sonoquímica, química, por método radiolítico y fotoquímico. A continuación, se describen brevemente cada una de las técnicas mencionadas anteriormente.

## **SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS.**

### **Síntesis electroquímica.**

El proceso por el cual se obtienen los materiales de nanopartículas se basa en la aplicación de un campo eléctrico al sistema, el cual provoca la formación de iones en el ánodo que viajan a través de la matriz hacia el cátodo donde son reducidos para dar paso a la nucleación y de esta manera la nanopartícula empieza a crecer. Es así como al variar las condiciones del sistema se pueden obtener distintos tipos de materiales con distintas formas, tamaños y composición [17][18].

Esta técnica de síntesis ha evolucionado al mejorar las condiciones para obtener submicropartículas y nanopartículas metálicas. Mediante este proceso en el que el uso de electrodos de distinta naturaleza (electrodos metálicos, de base carbono, etc.) y el correcto control de las distintas condiciones como la intensidad de la corriente, temperatura, tiempo y el uso de dispersantes y materiales de soporte, permiten obtener con relativa facilidad materiales nanoestructurados, con una dispersión homogénea y un control del tamaño uniforme [17][19][20].

Esta técnica muestra desventajas ya que el uso de productos químicos como el amoníaco o sales de amonio disueltas en el electrolito soporte [21], ciclohexano, acetona [22], etc., que se utilizan durante el proceso de síntesis pueden generar gases dañinos y/o tóxicos.

### **Síntesis sonoquímica.**

Los procesos sonoquímicos se han probado como técnicas eficaces para la fabricación y obtención de nuevos nanomateriales con propiedades inusuales y variadas formas [23]. Los efectos químicos de los procesos en los que se utiliza el uso de sondas de ultrasonido se basan principalmente, en la acción hidrodinámica que se produce, cuando en un líquido pasa a gran velocidad un perturbador, que en este caso son las ondas sonoras, creando así una descompresión.

Puede ocurrir que la acción del paso de esta onda sonora haga que el líquido alcance la presión de vapor, formándose así las burbujas o cavidades, lo que causa ambientes químicos y físicos inusuales que dan la pauta para la síntesis de materiales nanoparticulados [24]. La radiación con ondas sonoras es capaz de crear partículas metálicas de tamaños muy pequeños de apenas unos cuantos nanómetros (4-15 nm) [25].

### **Síntesis radiolítica.**

La radiólisis se refiere a la disociación de la molécula debido al efecto ionizante de una fuente de radiación. Esta radiación o flujo de electrones de alta energía causa el rompimiento de uno o varios enlaces. La radiación usada en este método de síntesis es radiación radioactiva, es así como se diferencia de la técnica de fotólisis, en donde, la radiación utilizada es la radiación UV-visible (UV-vis). El uso de radiación ionizante para la síntesis de nanopartículas metálicas es una técnica novedosa, ya que in situ se producen especies altamente reactivas con un potencial de reducción muy alto, lo cual es difícil de lograr mediante otros métodos. Los radicales  $H\cdot$  y  $e^-_{ac}$  (electrones en la disolución) son utilizados para reducir los iones metálicos, y a su vez estos átomos metálicos colisionan para formar las nanopartículas metálicas [26].

Uno de los estudios que fundamenta a esta técnica para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas es la disociación del agua bajo la influencia de radiación  $\alpha$  formándose así el radical hidrógeno ( $H\cdot$  altamente reductor) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$  altamente oxidante). Es por ello que se prefiere el uso de disolventes que contengan estos grupos [23].

En medios acuosos se puede llevar a cabo esta técnica, sin embargo, se prefieren los disolventes orgánicos como los alcoholes (metanol, isopropanol, etanol, etc.) ya que se observan algunos cambios en la estabilidad y reactividad de las partículas usando este tipo de disolventes en comparación con el agua. Y cabe mencionar que

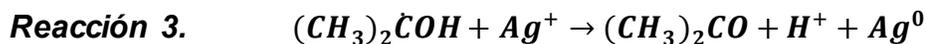
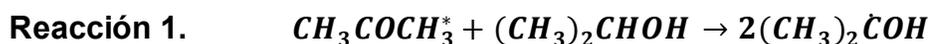
se necesita de un equipo especializado y ciertas condiciones para el buen funcionamiento de este proceso de síntesis [23][24][27].

Biswal y col. en 2011 [28] reportan que mediante la incidencia de radiación gamma sobre ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) disuelto en una mezcla de 2-propanol y acetona, se logra llevar a cabo la síntesis de nanopartículas usando como agente dispersante polivinilpirrolidona. Este mismo tipo de radiación ha sido utilizada por Mostafavi y col. en 2002 [29] para la preparación de nano-clústeres de plata en metanol. Diversos tipos de nanopartículas con distintas aplicaciones se han obtenido con este método. Sin embargo, la radiación que se utiliza para tal fin es considerada peligrosa; y se necesita de permisos especiales para hacer uso de ella. Además de equipo especializado lo que la coloca en desventaja frente a las demás técnicas.

### **Síntesis fotoquímica.**

La fotoquímica se define como aquella rama de la química que estudia las reacciones que proceden a causa de la absorción de radiación electromagnética (luz). En las reacciones fotoquímicas o reacciones inducidas mediante la radiación, ésta actúa produciendo radicales libres en las moléculas. Los radicales de interés para el uso de esta técnica son aquellos que tienen un potencial reductor muy alto, para que así la interacción entre los radicales y los iones metálicos, propicie la reducción de éstos y la formación de las nanopartículas.

La ventaja de la fotoquímica es que proporciona una vía directa y rápida para que se lleve a cabo la reacción química. La irradiación de una solución acuosa de  $\text{AgClO}_4$ , 2-propanol, acetona y varios estabilizantes poliméricos, produce nanopartículas de plata. La radiación UV produce radicales por medio de la excitación de la acetona y de los átomos de hidrógeno del 2-propanol. Las reacciones siguientes son ejemplo típico del proceso fotoquímico para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas [30]:



### Síntesis química.

La síntesis mediante reducción química tiene gran ventaja sobre las demás, ya que esta técnica se basa en una ruta simple, no requiere de tiempos largos y se puede escalar el proceso. Las reacciones por las cuales se lleva a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas son reacciones redox, por lo que la correcta elección del reductor, entre otras variables, es la clave del éxito para la obtención del material nanoparticulado.

Dos de las técnicas más importantes para producir nanopartículas metálicas son aquellas en las que se utiliza borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), y citrato de sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub>), como agentes reductores [31][32]. Con estas técnicas se pueden obtener nanopartículas con variedad de formas y tamaños. El método de Turkevich [33] utiliza el citrato de sodio para la reducción de iones metálicos y se obtienen partículas que van desde los 9 nm hasta los 120 nm, la variación del pH influye en el tamaño y forma de la nanopartícula.

El principal reductor utilizado actualmente es el borohidruro de sodio. Sin embargo, éste es inestable y se descompone rápidamente por lo que se han estudiado reductores alternativos, que además de mostrar buenos resultados son amigables con el medio ambiente, como lo son el citrato de sodio y el ácido ascórbico [34][35].

Esta técnica es una de las más sencillas y con mejores resultados. Sin embargo, el uso masivo de productos químicos para llevar a cabo la reducción de los iones metálicos es perjudicial para el medio ambiente, es por esto que en recientes años se está llevando a cabo el reemplazo de estos compuestos químicos por derivados naturales, a estos procesos se les ha denominado “síntesis verde” [36][37].

### Mecanismos de formación de nanopartículas en solución.

La formación de nanopartículas de plata ha sido estudiada a profundidad para comprender de mejor manera la forma en la que las nanopartículas son formadas. Uno de los primeros estudios fue llevado a cabo por Rothenberg y col. [38], en el cual sienta las bases de la formación de clústers metálicos mediante técnicas espectrofotométricas por el seguimiento de la cinética de reacción por UV-vis.

Henglein y col. [39] estudiaron el mecanismo de formación de nanopartículas de plata al sintetizarlas con un método fotoquímico, como precursor metálico utilizaron  $\text{AgClO}_4$ , el medio de reacción fue propanol y el estabilizante citrato de sodio. Los resultados sugieren 2 mecanismos de crecimiento en los cuales la concentración del citrato (agente estabilizante) juega un papel importante en la formación de partículas monodispersas. Así cuando la concentración de citrato es muy baja las nanopartículas formadas no se estabilizan por completo y mediante coalescencia se forman agregados. De igual manera sucede cuando la concentración es muy alta ya que la fuerza iónica aumenta y desestabiliza a las partículas, por lo que una concentración óptima de iones citrato permite la formación de nanopartículas monodispersas (ver Fig.1.4)

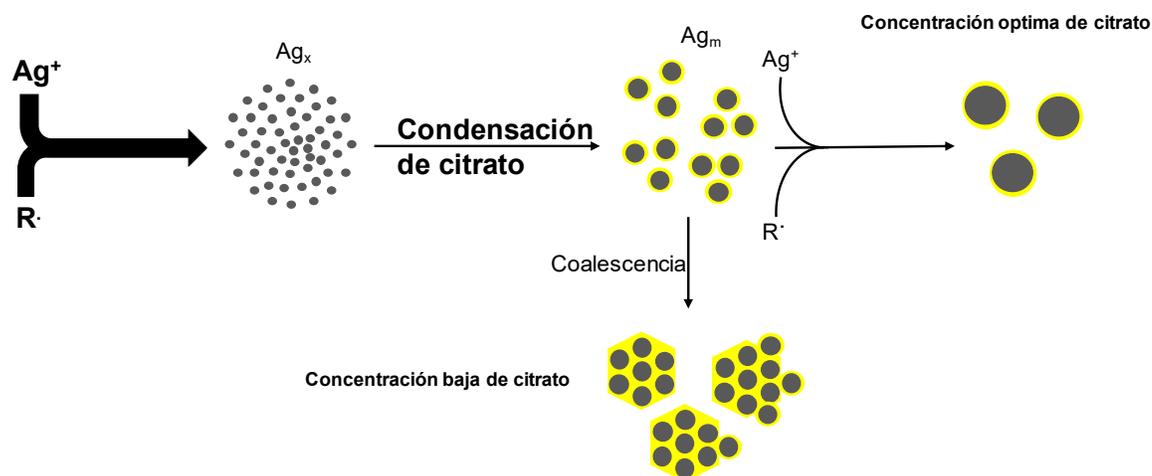


Figura 1.4. Mecanismos de crecimiento propuestos por Henglein a bajas y óptimas concentraciones de citrato. Adaptado de [39].

En 2011 Nishimura y col. [40] llevaron a cabo la síntesis de nanopartículas de plata, monitoreando por medio de las técnicas de espectrofotometría UV-vis y difracción de rayos X. La síntesis se lleva a cabo por reducción de los iones metálicos con acrilato de sodio, en presencia de hidróxido de sodio, en agua. Los resultados arrojan que la formación de las nanopartículas se lleva a cabo en tres pasos: primero se forma la especie  $\text{Ag}_2\text{O}$  la cual es dependiente de la relación nitrato de plata/hidróxido de sodio. Posteriormente la especie  $\text{Ag}_2\text{O}$  se redisuelve por acción de calentamiento, liberando así los iones  $\text{Ag}^+$ . Finalmente éstos son reducidos y empieza la formación de núcleos en la solución, este último paso puede ser acelerado al incrementar la concentración de hidróxido de sodio en la mezcla. En la Figura 1.5 se esquematiza el mecanismo por el cual ocurre la reducción de los iones metálicos en solución básica.

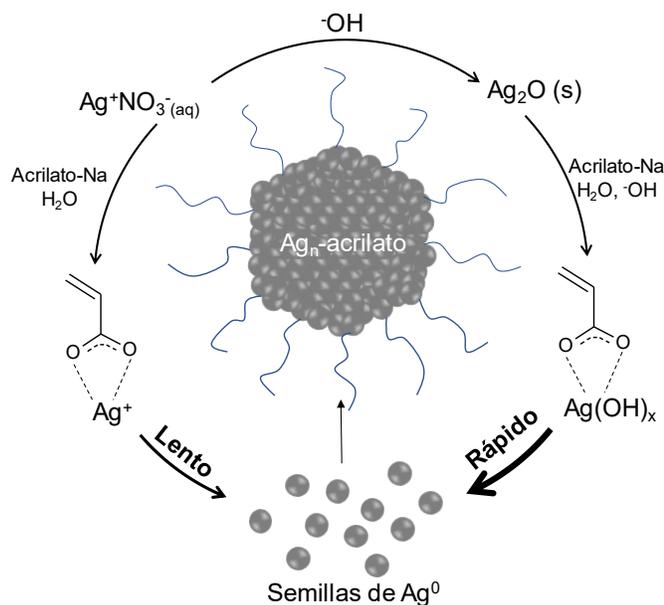


Figura 1.5. Mecanismo de formación de nanopartículas de plata. Adaptado de [40].

Estudios con UV-vis, dispersión de rayos X a ángulo bajo y microscopía electrónica de transmisión (MET) llevados a cabo por Polte y col. [41] en la síntesis de nanopartículas de plata utilizando borohidruro de sodio en presencia de polivinilpirrolidona (PVP), muestran que al llevar a cabo la síntesis sin la presencia

de la PVP, en los primeros 100 ms se forman nanopartículas de tamaño de 1 nm y al pasar el tiempo hasta 400 ms el número de estas se incrementa conservándose el tamaño. Después de 2 segundos, el tamaño de las partículas se incrementa hasta 4.6 nm y el número de partículas disminuye. Lo anterior debido a un proceso de coalescencia durante el crecimiento de las partículas. Por otra parte, cuando la PVP está presente en la síntesis los resultados no cambian, sin embargo, las partículas de 1 nm formadas en la primera fase de crecimiento se conservan así hasta 80 min después de llevada a cabo la síntesis, comprobando la acción estabilizante por parte de la PVP impidiendo significativamente la coalescencia. El esquema de formación propuesto por Polte y col. se muestra en la Figura 1.6.

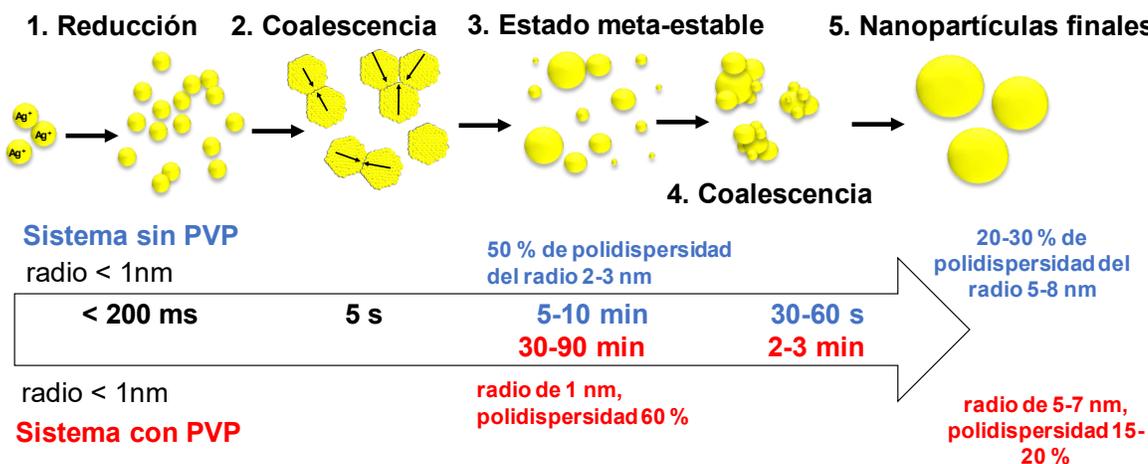


Figura 1.6. Mecanismo de crecimiento de cuatro pasos para nanopartículas de plata, adaptado de [41].

Hasta ahora los mecanismos más estudiados se han llevado a cabo en solución acuosa como los mostrados anteriormente. Sin embargo, han servido de pauta para esclarecer cómo es que se lleva a cabo la formación y crecimiento de las nanopartículas de plata durante la síntesis.

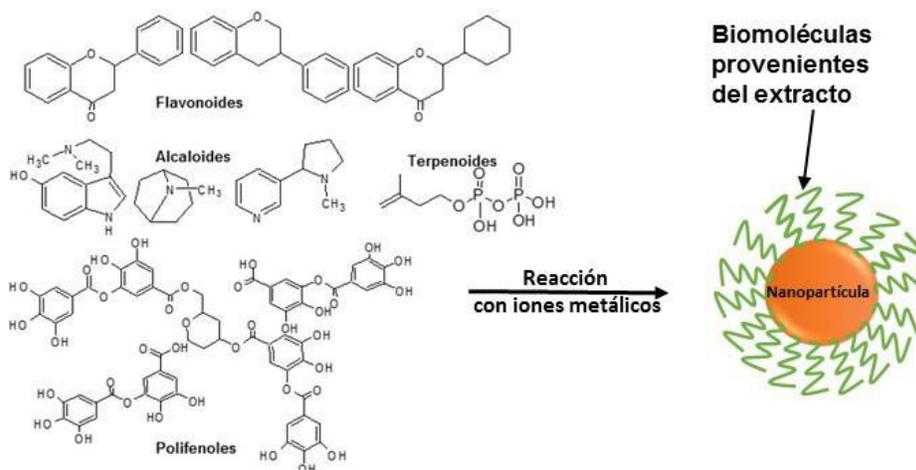
### Síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas.

La química verde es una rama de la química en la cual cada vez se implementan más esfuerzos para optimizar los procesos hasta ahora utilizados. De la misma manera, el desarrollo de métodos de síntesis de nanopartículas metálicas ha

desplegado un gran avance al utilizar compuestos naturales para la fabricación de las mismas, entre ellos se encuentran el ácido ascórbico, ácido cítrico, extractos de plantas y diversos microorganismos como hongos y bacterias. Todos los anteriores han sido probados con éxito en la obtención de nanopartículas metálicas principalmente de oro, plata y platino [42][43]. Por otra parte, varias investigaciones han centrado sus esfuerzos en la obtención de nanopartículas metálicas con el uso de extractos de plantas llamados reductores verdes [44][45][46].

La síntesis de nanopartículas metálicas utilizando extractos de plantas como componentes reductores ofrece varias ventajas frente a los métodos usuales de síntesis química donde diversos compuestos (dispersantes, reductores, medios de reacción) están involucrados. Las ventajas radican en el uso de compuestos no dañinos para el medio ambiente, así como el alto contenido en especies antioxidantes que garantizan la reducción de los iones metálicos. Se ha visto que los compuestos presentes en los extractos ayudan a la estabilización de las nanopartículas formadas [47,48][49] (Fig. 1.7), éstos compuestos adheridos a la nanopartícula hacen que éstas sean menos tóxicas para organismos vivos [50][51].

La gama de extractos utilizados para sintetizar nanopartículas metálicas es tan variada como el número de especies de plantas que existen en la corteza terrestre por lo cual además de ser un método verde, es económico al haber una gran disponibilidad de la fuente de donde son extraídos. Entre los extractos más utilizados se encuentran las plantas de Neem (*Azadirachta indica*), Aloe vera, té (*Camellia sinensis*), *Catharanthus roseus*, hierba de limón (*Cymbopogon sp.*), *Cinnamomum camphora* y *Datura metel* [52]. Los compuestos que se han señalado como los principales en la reducción de los iones metálicos son distintas clases de flavonoides, alcaloides, terpenoides y polifenoles [37][44].



**Figura 1.7. Posibles constituyentes de los extractos de plantas responsables de la bioreducción de los iones metálicos. Adaptado de [47][48].**

Es importante mencionar que a pesar de que este método de reducción con extractos de plantas ha mostrado ser una buena alternativa en la obtención de nanopartículas metálicas, los estudios se han centrado en la elaboración de nanopartículas principalmente de oro y plata [53][54], por lo que el desarrollo de nanopartículas de otros iones metálicos ofrece un amplio campo de investigación.

Uno de los primeros reportes de síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de geranio, fue en el año 2003 [55]. Comparado con otros métodos de síntesis verde, como el uso de microorganismos (bacterias y hongos), los extractos de plantas son más eficaces y rápidos. Es de notar que con el uso de los extractos de plantas la formación de nanopartículas metálicas usualmente se lleva a cabo a condiciones normales de temperatura y presión, lo que ofrece una ventaja frente a otros tipos de métodos con reductores que necesitan de energía (calor) para llevar a cabo la reducción de los iones metálicos. Parámetros tales como el pH, masa de hojas para hacer el extracto, concentración del precursor metálico y tiempo de reacción afecta directamente a las nanopartículas obtenidas.

Las partes más utilizadas para elaborar estos extractos acuosos son las hojas, aunque las raíces, tallos y flores han sido probados para el mismo fin. Las moléculas

a las cuales se les ha conferido la acción reductora o antioxidante además de estabilizantes al cubrir la superficie de las nanopartículas son biomoléculas pertenecientes a las familias de compuestos fenólicos, polisacáridos, flavonoides, alcaloides, terpenoides, aminoácidos, enzimas, proteínas, alcoholes, vitaminas e incluso algunos pigmentos [56][57][58][59][60][61][62][63][64]. La mayoría de los autores no utiliza un agente estabilizante extra, sino, que el simple uso del extracto suele ser suficiente para actuar como estabilizante y reductor, sin embargo, algunos investigadores han utilizado L-cistina [65] y piperitona [66] para recubrir las nanopartículas formadas y evitar su agregación.

Para fines prácticos la elección deberá focalizarse sobre una planta cuya distribución y adaptabilidad a distintas condiciones climáticas sea buena, así como el fácil manejo.

Para separar las nanopartículas del medio de reacción, la centrifugación es el método más común para la obtención de una pastilla la cual después es sometida a lavados y a secado para su posterior caracterización. Entre las caracterizaciones más comunes a las que se someten las nanopartículas de plata son la obtención del espectro UV-vis, microscopia electrónica de barrido (MEB), microscopia electrónica de transmisión (MET), análisis infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y energía dispersiva de rayos X (EDX). Mediante el uso de dispersión de luz dinámica (DLS) los tamaños de partícula en suspensión pueden ser determinados y se reportan como radio o diámetro hidrodinámico ( $R_h$  o  $D_h$ ).

Las técnicas térmicas, como el análisis termogravimétrico (TGA) es utilizado principalmente para la determinación de la cantidad de componentes orgánicos que quedan adsorbidos sobre la superficie de la nanopartícula asimismo para estudiar la resistencia térmica de la nanopartícula [67]. El análisis por medio de espectroscopía de emisión utilizando Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) para

analizar la concentración y conversión de los iones plata a nanopartículas ha sido reportado [68].

**Síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de hojas de geranio como componente reductor.**

Las especies de *Pelargonium* comúnmente conocidas como geranios o malvas son plantas cuyos componentes son ampliamente utilizados en la industria alimenticia, cosmética y de productos sanitarios. Existen más de 300 especies pertenecientes al género *Pelargonium*. Sin embargo, el más extendido y de uso ornamental es el *Pelargonium x zonale* o *Pelargonium hortorum* debido a la adaptabilidad que esta especie ha mostrado frente a distintas condiciones ambientales [69][70]. La caracterización de extractos acuosos y etanólicos de distintas especies de *Pelargonium* arrojan que compuestos flavonoides son principalmente extraídos de las hojas de estas plantas [71][72]. Debido a lo anterior *P. hortorum* mejor conocida como geranio o malva es una excelente opción para ser considerada como una fuente de componentes reductores para la síntesis de nanopartículas de plata. Jafarizad y col. [73] reportaron el uso de extractos de menta y *Pelargonium* para la producción de nanopartículas de oro con tamaños en el intervalo de 10-100 nm, la caracterización de estos extractos arrojó que los principales componentes reductores son isoeugenol y espatulenol presentes en la menta y flavonoides, fenoles y taninos del extracto de *Pelargonium*. Sastry y col. [74] reportan el uso de *Pelargonium graveolens* para la síntesis de nanopartículas de plata obteniendo tamaños que varían desde los 16 hasta los 40 nm. Mirończyk y col. [75] obtuvieron nanopartículas de oro (2-80 nm) al utilizar el extracto de hojas de *Pelargonium hortorum*. Sin embargo, múltiples morfologías fueron obtenidas (partículas esféricas, triangulares y hexagonales). Cuando aunado al efecto reductor del extracto de *P. hortorum* se adiciona el efecto sonocatalítico, nanopartículas de oro con tamaños en el intervalo de 8-20 nm pueden ser obtenidas [76]. Así los extractos obtenidos a partir de las especies de *Pelargonium* muestran ser eficaces en la obtención de nanomateriales, sin embargo, dependiendo del medio de reacción, la

polidispersidad en los tamaños de las nanopartículas obtenidas es una gran desventaja [77].

### **Mecanismo de formación de AgNPs.**

A pesar de que este método ha resultado ser eficaz y muy utilizado en recientes años, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la formación de las nanopartículas aún no ha sido completamente esclarecido debido a la complejidad que presentan los extractos, los cuales son un coctel de antioxidantes (carbohidratos, grasas, proteínas, enzimas y co-enzimas, fenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides, gomas, etc.) capaces de donar electrones para llevar a cabo la reducción de los iones plata a plata metálica. Sin embargo, técnicas analíticas como la cromatografía han ayudado a determinar los componentes mayoritarios de algunos de los extractos estudiados, pudiendo de tal manera proponer que especies pueden ser las responsables de la transformación de los iones metálicos a nanopartículas metálicas. De tal manera se ha podido esclarecer que la donación de electrones se deriva de la deshidrogenación de ácidos (en el caso del ácido ascórbico) y alcoholes (catecol), y a conversiones ceto-enol (quinonas, remirin) [78][79][80][81].

### **Factores involucrados en la síntesis de AgNPs.**

Los principales factores que afectan la síntesis de nanopartículas utilizando este método son la temperatura, concentración de ion metálico, contenido de hojas para realizar el extracto, pH, tiempo y agitación durante la síntesis. Estas variables, se ha visto, afectan de manera significativa al tamaño y forma de las nanopartículas [82]. Una gran cantidad de reportes indica que la síntesis en medio básico mejora la estabilidad de las nanopartículas [83][84][85][78], la velocidad de la reacción disminuye [86][87][88], además de buenos rendimientos de reacción y mejoría en el proceso de reducción [89]. Por su parte Daizy reporta que al modificar el pH logra cambiar la morfología de las nanopartículas sintetizadas de poliédricas a esféricas [90]. Sin embargo, al aumentar el pH por arriba de 11 el fenómeno de aglomeración de las partículas prevalece haciendo que estas se desestabilicen y precipiten [91].

La agitación y temperatura de reacción se ha demostrado que son parámetros muy importantes. Muchos investigadores han llevado a cabo la síntesis de nanopartículas con temperaturas de hasta 100 °C al utilizar biopolímeros y extractos de plantas obteniendo tamaños de partícula pequeños y disminuyendo los tiempos de reacción [92][93]. A pesar de lo anterior casi todas las síntesis donde se involucra el uso de extractos de plantas llevan a cabo a temperatura ambiente (25-37 °C). En cuanto a la agitación se ha visto que es importante, principalmente para evitar la aglomeración de las nanopartículas al utilizar microorganismos como componentes reductores, sin embargo, al utilizar extractos de plantas aún no existe un estudio que demuestre que la agitación evita el proceso de aglomeración.

### **Aplicación de las AgNPs.**

La mayoría de las nanopartículas de plata sintetizadas mediante éste método se aplican principalmente en biomedicina, como antibióticos, bactericidas [94] y anticancerígenos [95] mostrando una buena biocompatibilidad y a la vez siendo eficaces en la acción antibacteriana y anticancerígena. Lo anterior debido a las moléculas (presentes en los extractos de plantas) que rodean la superficie de la nanopartícula [96][64]. Sin embargo también han sido utilizadas en otros procesos, como catalizadores en la degradación del colorante azul de metileno [97], sensor de iones de metales pesados [98], sensor de peróxido de hidrógeno [91], en radioterapia [99], y como nano-acarreadores de fármacos [100].

De acuerdo a los indicadores de Scopus la síntesis utilizando extractos acuosos de plantas es un método que poco a poco va ganando popularidad para la síntesis de nanopartículas metálicas de oro y plata. Los datos arrojan que durante el periodo de 2012 a julio de 2017 los métodos comunes, son los más utilizados para sintetizar nanopartículas. Sin embargo, los que usan extractos de plantas representan aún un pequeño porcentaje. En la Figura 1.8 se muestra el número de publicaciones relacionadas con la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando todo tipo de métodos además de la síntesis utilizando extractos acuosos de plantas y la síntesis de nanopartículas de oro y plata utilizando éste último método.

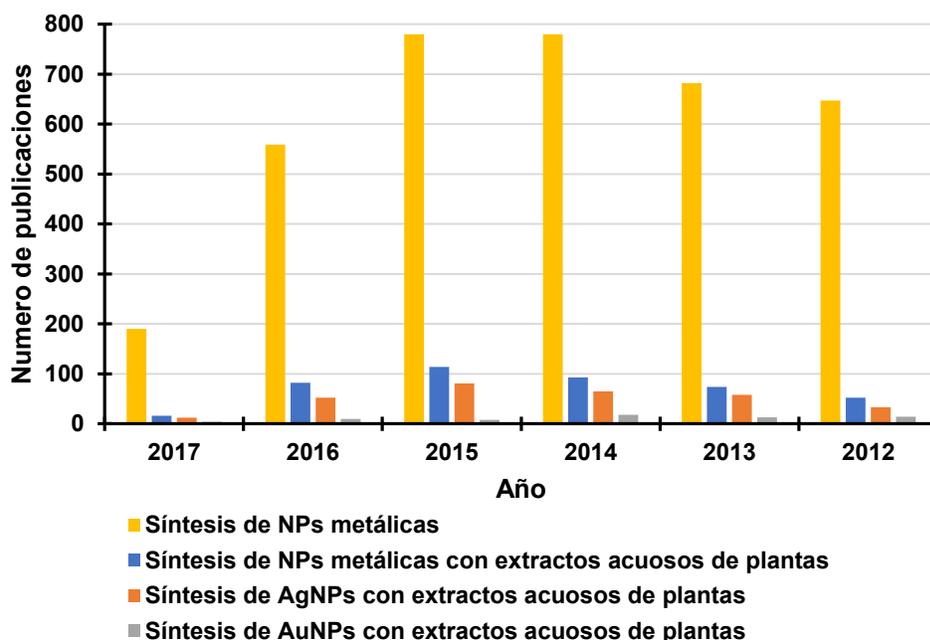


Figura 1.8. Numero de publicaciones registradas en Scopus correspondientes al periodo 2012-2017 sobre síntesis de nanopartículas metálicas y de oro y plata utilizando extractos acuosos de plantas.

## MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN PARA NANOPARTÍCULAS DE PLATA.

A continuación se describirán algunos de los métodos que se utilizaron para llevar a cabo la caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas en este trabajo. Así, se abordarán técnicas como la dispersión de luz dinámica para la medición del tamaño de partícula, la resonancia del plasmón superficial y la técnica de Cytoviva con obtención de imagen hiperespectral para la visualización de las partículas.

### Dispersión de luz dinámica (DLS).

La técnica de DLS se usa para determinar el tamaño de gota/partícula y la polidispersidad en dominios dispersos. Cuando un haz de luz interactúa con partículas coloidales que están bajo la influencia del movimiento browniano, las partículas dispersan la luz. La medida que se realiza es la fluctuación de la variación

de la intensidad de dispersión de luz por parte de las partículas en función del tiempo (tiempo de retardo), el cual se usa para extraer el coeficiente de difusión de una partícula o gota en solución [101]. El coeficiente de difusión medido se puede usar para calcular un radio hidrodinámico ( $R_h$ ) de la partícula usando la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 1.3):

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin;  $\eta$  es la viscosidad (cP) de la fase continua y  $D$  ( $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ) es el coeficiente de difusión [101,102]. La correlación de la intensidad se puede realizar mediante hardware electrónico (correlacionador digital) o análisis de software de las estadísticas de fotones. Debido a que las fluctuaciones suelen oscilar entre nanosegundos y milisegundos, el hardware electrónico suele ser más rápido y más confiable en este trabajo.

Al igual que otras técnicas, este método presenta limitaciones las cuales son [103]:

- La presencia de partículas grandes, incluso en pequeñas cantidades, pueden ser contabilizadas durante el análisis.
- Sedimentación: esto es particularmente probable con partículas densas. Aumentar la densidad del dispersante mediante, por ejemplo, la introducción de sacarosa es una estrategia útil, sin embargo, solo permite aumentar la densidad hasta  $1.05 \text{ g mL}^{-1}$ .
- Baja resolución: cuando los tamaños de la muestra están muy cercanos, la técnica DLS no caracterizará con precisión una muestra polidispersa, por lo que es aconsejable llevar a cabo la separación antes de la medición.
- Dispersión de luz múltiple: la dispersión múltiple se produce cuando la luz dispersada de una partícula se dispersa por otra antes de llegar al detector, y compromete el cálculo preciso del tamaño de partícula en muestras más concentradas.

- La muestra no debe absorber la luz de la longitud de onda utilizada. Se deben evitar soluciones muy coloridas o que presenten fluorescencia.
- Las moléculas o partículas en solución deben tener un índice de refracción diferente al del dispersante/disolvente.
- La solución/dispersión debe ser termodinámicamente estable en la escala de tiempo de una medición, es decir, no deben tener lugar reacciones rápidas en la solución.

En el presente trabajo se utilizaron dos distintos modelos de análisis matemáticos, el método de Acumulativos y de CONTIN. Para tal efecto, en todos los modelos se suponen dispersiones altamente diluidas para evitar la interacción entre partículas, así como, que las partículas en cuestión presentan morfología esférica.

***Método de acumulativos.***

Para obtener el coeficiente de difusión, se debe analizar la función de correlación de intensidad. El procedimiento estándar para esto es la aplicación del método acumulativo. Al ajustar un polinomio de tercer grado al logaritmo de la función de correlación de intensidad, se obtiene la tasa de decaimiento  $\Gamma$  (primer cumulante). La velocidad de decaimiento está directamente relacionada con el coeficiente de difusión D:

$$\Gamma = q^2 \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde q es el vector de onda, que depende del ángulo de dispersión.

Las órdenes más altas del resultado de ajuste (2º y 3er cumulante) dan el índice de polidispersidad de la muestra. Los instrumentos modernos de dispersión de luz dinámica realizan análisis acumulativos de forma automática. Sin embargo, la calidad del resultado depende significativamente de la calidad de los datos y la configuración de restricciones del procedimiento. El análisis acumulativo solo puede determinar la distribución del tamaño de partícula de una distribución gaussiana en torno al tamaño medio de partícula. Para distribuciones de tamaño de partícula bi o

polimodales, se requieren métodos de análisis más complejos, como el método Contin.

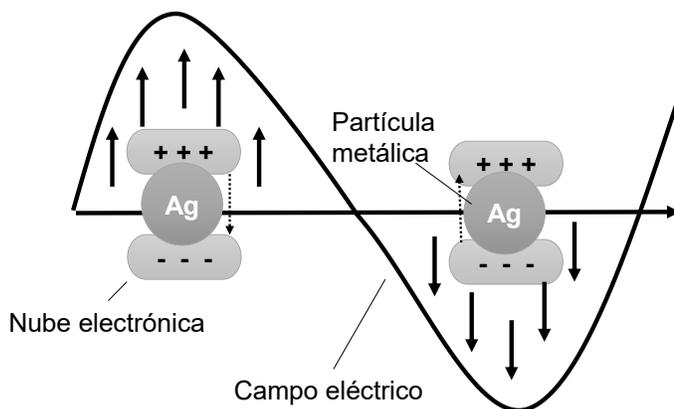
### ***Método de Contin.***

Un método alternativo para analizar la función de autocorrelación se puede lograr a través de una transformada de Laplace inversa conocida como CONTIN desarrollada por Steven Provencher [104][105]. El análisis CONTIN es ideal para sistemas heterodispersos, polidispersos y multimodales que no se pueden resolver con el método acumulativo. La resolución para separar dos poblaciones de partículas diferentes es aproximadamente un factor de cinco o más y la diferencia en las intensidades relativas entre dos poblaciones diferentes debe ser inferior a  $1 \times 10^{-5}$ .

### **Resonancia del Plasmón Superficial (RPS).**

Existe un interés creciente en la utilización de las propiedades ópticas de las nanopartículas de plata como componente funcional en diversos productos y sensores. Las nanopartículas de plata son extraordinariamente eficaces para absorber y dispersar la luz y, a diferencia de muchos tintes y pigmentos, tienen un color que depende del tamaño y la forma de la partícula.

La fuerte interacción de las nanopartículas de plata con la luz se produce porque los electrones de conducción en la superficie del metal sufren una oscilación colectiva cuando se excitan con luz a longitudes de onda específicas. Esta oscilación conocida como resonancia de plasmón de superficie (RPS) esquematizada en la Figura 1.9, da lugar a propiedades de dispersión y absorción inusualmente fuertes. De hecho, las nanopartículas de plata pueden tener secciones eficaces de extinción (dispersión + absorción) hasta diez veces más grandes que su sección transversal cuando esta no se encuentra en tamaños nanométricos. La sección transversal de dispersión permite que las nanopartículas de 100 nm se visualicen fácilmente con un microscopio convencional de campo oscuro.



**Figura 1.9.** Representación del efecto oscilante de los electrones de superficie en nanopartículas metálicas.

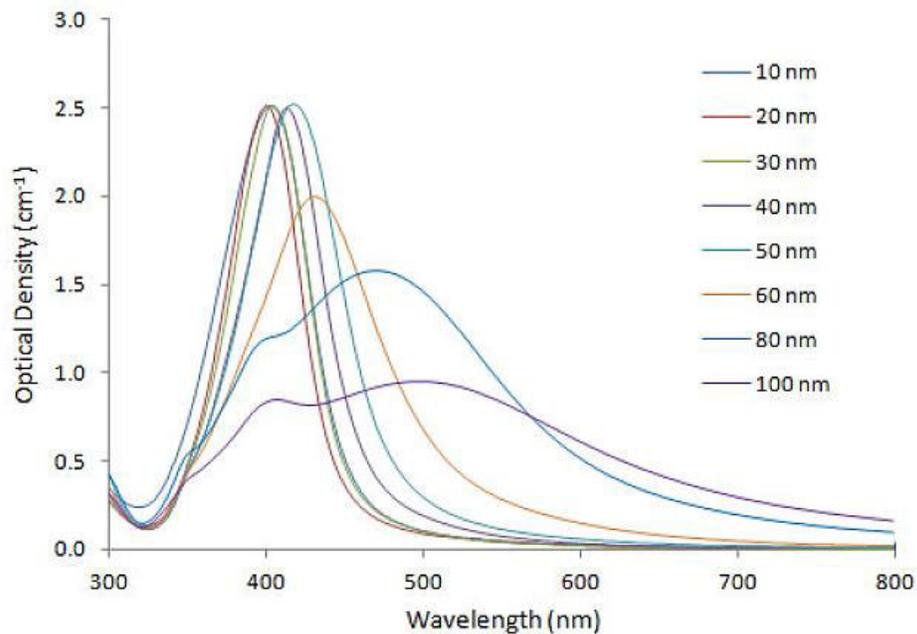
Cuando las nanopartículas de plata de 60 nm se iluminan con luz blanca, aparecen como difusores de fuente puntual de color azul brillante bajo un microscopio de campo oscuro (Figura 1.10). El color azul brillante se debe a una RPS que alcanza su punto máximo a una longitud de onda de 450 nm.



**Figura 1.10.** Nanopartículas de plata de 60 nm utilizadas en citodiagnóstico observadas en un microscopio óptico con la técnica de campo oscuro. [106]

Una propiedad única de las nanopartículas esféricas de plata es que esta longitud de onda máxima se puede sintonizar desde 400 nm (luz violeta) a 530 nm (luz verde) dependiendo del tamaño y forma de la partícula, el índice de refracción local cercano a la superficie, la presencia de especies adsorbidas y la distancia media entre nanopartículas vecinas. Incluso se pueden lograr desplazamientos más grandes de la longitud de onda de la RPS hacia la región infrarroja del espectro

electromagnético cuando las nanopartículas de plata presentan formas de varilla o platos. Un ejemplo del espectro de absorción UV-vis al variar el tamaño de las nanopartículas se muestra en la Figura 1.11. En este espectro se puede observar el desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo a medida que aumenta el tamaño de la nanopartícula.



**Figura 1.11. Resonancia del plasmón superficial en función del tamaño de las nanopartículas de plata esféricas.** [106]

En la literatura se puede encontrar una diversidad de espectros de RPS de nanopartículas de plata en la región visible, por ejemplo, el trabajo realizado por Tang y col [107], donde las coloraciones de las nanopartículas de plata van del amarillo (partículas esféricas) al azul (partículas triangulares) pasando por el rojo (partículas en forma de barra) (Figura 1.12).

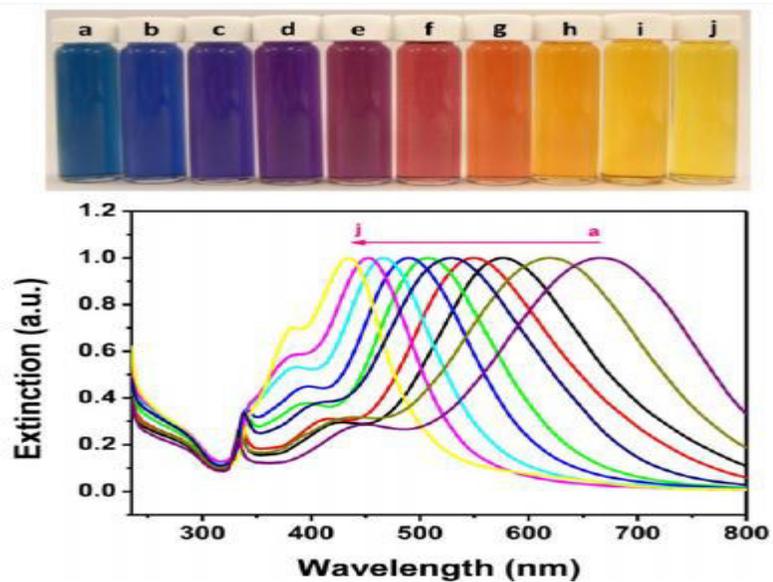


Figura 1.12. (Arriba) Fotografía de soluciones de nanopartículas de plata con diferentes colores. (Abajo) Espectros de extinción de las nanopartículas de plata correspondientes a las soluciones anteriores.

### Microscopía de imagen hiperespectral Cytoviva.

La microscopía hiperespectral es una técnica que se está desarrollando y explorando para abordar los desafíos analíticos actuales para los materiales a nanoescala. Esta técnica combina la proyección de imagen hiperespectral (HSI) con la óptica avanzada, típicamente centrándose en los sistemas especializados de la reflectancia del campo oscuro. Varias publicaciones [108][109][110] han demostrado la eficacia de la técnica en una amplia gama de aplicaciones, incluida la fabricación de materiales y el análisis de muestras biológicas y ambientales. La técnica permite recopilar datos del perfil espectral característicos (análogos a los que proporciona la espectrofotometría típica) de luz infrarroja y visible reflejada por muestras que identifican de manera única los materiales de interés.

El principio es combinar espectrofotometría e imágenes, en lugar de tomar una sola fotografía con una sola longitud de onda dominante por píxel, la óptica avanzada y los algoritmos permiten la captura de un espectro completo por píxel. Con esto agrega otra dimensión a una imagen que de otro modo sería bidimensional, a veces se hace referencia a una imagen hiperespectral como un cubo de datos. Mediante

la recopilación de espectros de materiales de referencia, es posible correlacionar estos espectros de referencia con una imagen hiperespectral para identificar materiales específicos de interés en la imagen. Esto forma la base de la técnica y su principal ventaja: la capacidad de obtener imágenes simultáneas de muestras diversas y heterogéneas e identificar los materiales presentes [111]. El término "hiperespectral", en lugar de solo "espectral", se refiere al rango de longitudes de onda medidas, que generalmente incluye espectros cercanos al infrarrojo, visibles y en ocasiones, casi ultravioletas. El uso de imágenes de campo oscuro mejora la efectividad de la técnica ya que disminuye la señal de fondo y enfatiza materiales que dispersan la mayor cantidad de luz, y tales espectros de dispersión son características más exclusivas de un material dado [112].

El mejor ejemplo de esta técnica con capacidades a nanoescala es el microscopio CytoViva® y el sistema HSI (Auburn, Alabama, EE.UU.). El sistema está montado en un microscopio óptico Olympus BX-41 (Melville, Nueva York, EE.UU.). Emplea un novedoso iluminador basado en campo oscuro que enfoca una luz altamente colimada. Las imágenes resultantes tienen mejor contraste y mayor relación señal/ruido que las obtenidas mediante microscopía de campo oscuro convencional. Esto se logra mediante el uso de las propiedades de dispersión intrínseca de la luz de los objetos, materiales y productos biológicos, de modo que no es necesaria la tinción previa de la muestra para su visualización, ahorrando costos.

La información espectral de la muestra se obtiene con las longitudes de onda visible y cercana al infrarrojo (VNIR; 400-1000 nm) de luz dispersa con el sistema HSI y el software Environment for Visualization (ENVI). La imagen HSI obtenida permite analizar las partículas en solución u otras matrices. Un ejemplo de imágenes y los perfiles espectrales que se pueden obtener con CytoViva se muestran en la Figura 1.13. La imagen muestra al microorganismo *C. elegans* expuesto a AgNPs, las AgNPs se absorben junto con los alimentos por *C. elegans* (Fig. 1.13 a). Algunas AgNPs también son introducidas en las células de los nematodos, y se transfieren a los embriones, las nanopartículas son identificadas al obtener su espectro (Fig.

1.13 b). Imagen hiperespectral (HSI) que muestra la presencia de AgNPs dentro y fuera de *C. elegans* después de la exposición; los rectángulos coloreados corresponden a áreas de píxeles (regiones de interés) en la HSI donde se recogen los perfiles espectrales (Fig. 1.13 c). Los perfiles espectrales de las AgNPs y la región de la hipodermis de *C. elegans*; muestra los colores verde, rojo y azul oscuro que representan clústeres internos de AgNPs, y grupos de AgNPs externos al microorganismo presentan colores amarillos, cian y marrón, el fondo se ilustra en color magenta (Fig. 1.13 d). Se detecta muy poca señal en nematodos no expuestos (Fig. 1.13 e y f), hay que tener en cuenta que los valores del eje Y son mucho más bajos en (f) que en (d); y un mayor contraste fue usado en (e) que en (c) para la visualización. Imágenes tomadas con la tecnología de imagen hiperespectral CytoViva con microscopía de campo oscuro a 100x (imágenes a, b y e) o aumento total de 40x (imagen c). El color del perfil espectral corresponde al color del rectángulo en la imagen y cada perfil representa el promedio de todos los píxeles presentes en cada cuadrado. Imágenes adaptadas de [113].

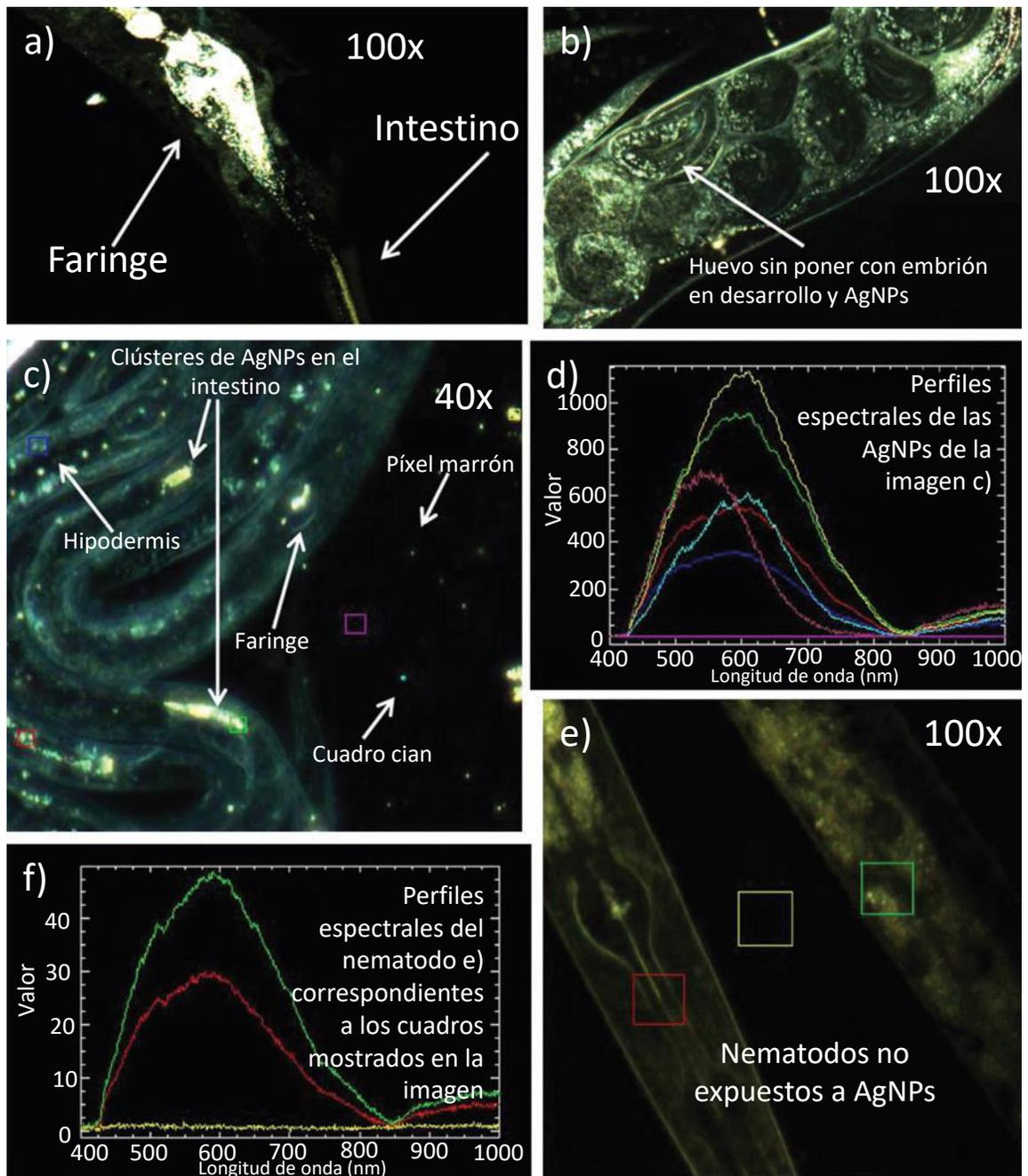


Figura 1.13. Ejemplo de aplicación de CytoViva® para la visualización de la internalización de nanopartículas en las células de *Caenorhabditis elegans*.

Liu y colaboradores reportaron la identificación y caracterización de AgNPs en agua ultrapura como en aguas complejas, es decir, agua de ecosistema de humedal simulado y aguas residuales. Se pudo determinar la presencia de AgNPS utilizando

la técnica de Cytoviva observando variados colores para las nanopartículas dispersas mientras que un color amarillo a blanco para los agregados presentes. Se pudo demostrar que los colores varían dependiendo del tamaño de las nanopartículas. Se encontró que las nanopartículas que presentaban color azul/violeta, verde y rojo tienen tamaños aproximadamente, 10, 20 y 40 nm, respectivamente [114], en la Figura 1.14 se muestra lo anterior mencionado.

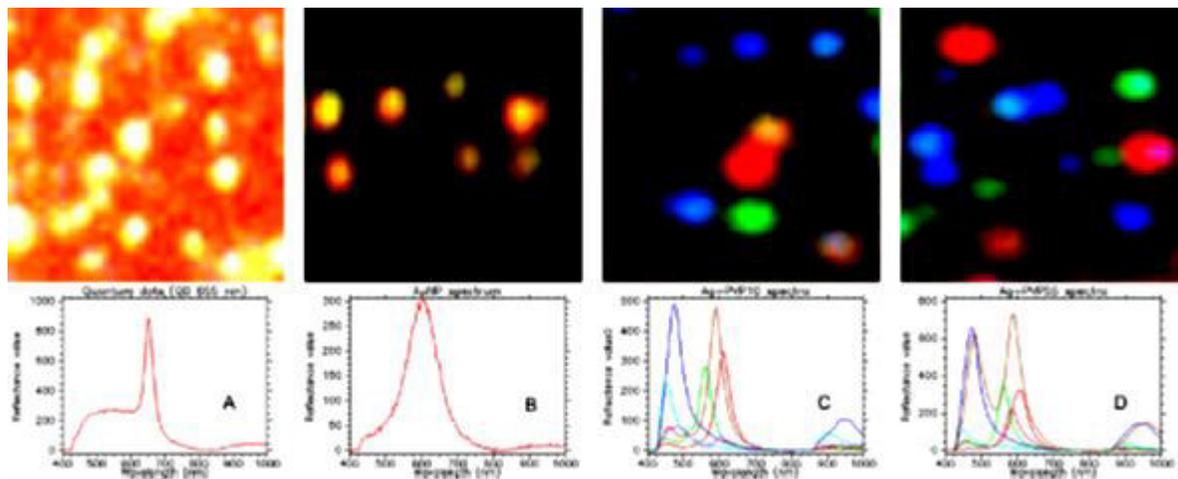


Figura 1.14. Imágenes hiperespectrales y los perfiles espectrales de nanopartículas en longitudes de onda visible e infrarroja cercanas (VNIR: 400-1000 nm).

## EMULSIONES.

Los coloides son dispersiones de dos o más materiales inmiscibles, donde el tamaño de las partículas o material dispersado se encuentra entre 1 nm y 1  $\mu\text{m}$  [115]. Las emulsiones forman parte de los coloides y en 1965 Becher las definió como sistemas heterogéneos que se conforman por un líquido inmiscible finamente disperso en otro en forma de gotas con diámetros mayores o iguales a 0.1  $\mu\text{m}$ , se forman gracias a la acción mecánica de un agitador y se caracterizan por tener poca estabilidad, ésta puede mejorarse al utilizar emulsificadores o tensoactivos [116].

El término “estable” varía desde unos pocos minutos hasta años y está en función de distintos fenómenos, que como consecuencia llevan a cabo la separación de las fases. Dentro de éstos fenómenos encontramos a la floculación, coalescencia, formación de cremas o natas y la maduración de Ostwald, todos derivados de los choques e interacciones que se llevan a cabo entre las gotas de aceite o agua dependiendo de la naturaleza de la emulsión.

La sedimentación y formación de natas depende del tamaño de la gota formada, resulta de la acción de fuerzas externas como la gravitacional o centrífuga, estas fuerzas son mayores a las debidas al movimiento Browniano por lo que las gotas de mayor tamaño tenderán a ubicarse al fondo o en la parte superior (dependiendo de la densidad del medio).

Cuando la magnitud de las fuerzas atractivas es mayor a la de las fuerzas repulsivas entre las gotas dispersas, éstas tienden a flocular. Es decir, las fuerzas de Van der Waals son tan débiles que las gotas dispersas forman cúmulos conservando el tamaño de gota de cada una de ellas.

En la maduración de Ostwald [117] se da un fenómeno de solubilización, a pesar de tratarse de líquidos inmiscibles siempre hay una pequeña porción que se solubiliza (y no es despreciable). De tal forma que las gotas más pequeñas comparadas con las más grandes tendrán una mayor solubilidad, así al pasar el tiempo estas tienden a desaparecer dejando únicamente a las gotas más grandes por lo que la distribución de tamaños se desplazara a tamaños mayores.

La estabilidad que proporcione la película conformada por el emulsificador que rodea a las gotas de la fase dispersa determinará que se lleve a cabo o no la coalescencia, así como también la inversión de fase que es, como su nombre lo indica, que la fase dispersa pasa a ser el dispersante y viceversa. El constante choque entre las gotas ocasionará el rompimiento de las mismas si es que la capa de tensoactivo que rodea a las gotas no es estable, ocasionando la formación de gotas de mayor tamaño y en el peor de los casos la separación de las fases.

En la Figura 1.15 se ilustran los fenómenos de rompimiento antes mencionados.

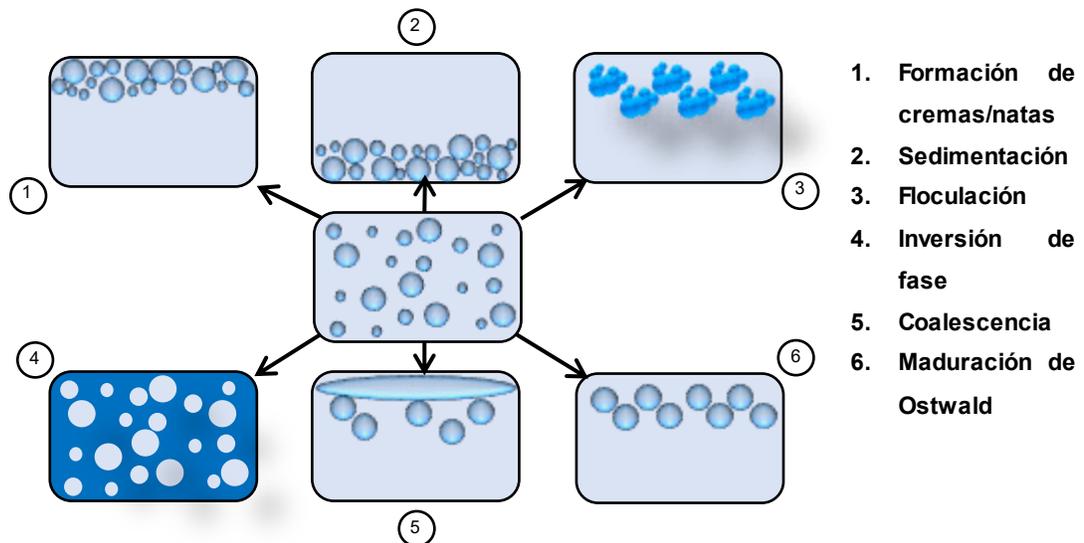


Figura 1.15. Ilustración esquemática de los procesos de rompimiento en las emulsiones. Adaptado de [270]

Las emulsiones dependiendo del tamaño de las partículas dispersas, pueden clasificarse como:

- a) Macroemulsión o Emulsión: tamaño de gota desde (0.1-100)  $\mu\text{m}$ .
- b) Miniemulsión o Nanoemulsión: tamaño de gota desde (20-200) nm.

La apariencia de la emulsión depende de la dispersión de la luz provocada por las gotas de la fase dispersa. La intensidad de la dispersión es proporcional a la sexta potencia del radio de la gota,  $\approx R^6$  [118]. A medida que el diámetro de las gotas disminuye, la apariencia de las emulsiones va desde una solución lechosa o "macroemulsión" (dispersa todo el espectro de la luz visible incidente) al de una solución translúcida gris (opalescente) o nano-emulsión (las gotas son muy pequeñas para dispersar todo el espectro de incidencia de la luz visible) y finalmente

a una solución transparente o "microemulsión" (con diámetro de gota menor que la longitud de onda de la luz visible incidente).

Las emulsiones debido a las estructuras compartimentalizadas que forman, tienen múltiples aplicaciones, desde formar parte de gran número de formulaciones farmacéuticas, cosméticas, en la extracción líquido-líquido [119], deshidratación del crudo [120], en la industria alimenticia [121], en la fabricación de pinturas [122], adhesivos [123], recubrimientos [124], lubricantes [125], hasta la síntesis de nanomateriales [126].

Existen varios tipos de emulsiones, éstas son clasificadas tomando en cuenta que componente actúa como dispersante y cuál como dispersado, por lo que son clasificadas en:

Emulsión aceite en agua (Oil-in-Water O/W). En este tipo de emulsión la fase dispersa es el aceite mientras que la fase continua es el agua o una fase acuosa.

Emulsión agua en aceite (Water-in-Oil W/O). Aquí la fase continua es un medio oleoso y en ella se encuentra dispersa agua o una fase acuosa.

En la Tabla 1.1 se muestra un comparativo entre emulsión, nano-emulsión y microemulsión donde se presentan las principales diferencias entre ellas.

Tabla 1.1. Comparación entre los distintos sistemas de emulsiones y microemulsión.

Propiedades	Emulsión	Nano-emulsión	Microemulsión
Aspecto Visual			
Diámetro de gota promedio	0.5-100 $\mu\text{m}$	50-200 nm	1-100 nm
Estabilidad	C i n é t i c a		Termodinámica
Formación	Aporte de energía		Espontánea
Concentración de tensoactivo	B a j a		Alta

### Nano-emulsiones.

Las nano-emulsiones son emulsiones cuyo tamaño de gota se encuentra típicamente entre los 20 y 200 nm. A diferencia de las microemulsiones las nano-emulsiones no presentan estabilización termodinámica pero sí gotas de tamaño nanométrico, lo cual las hace interesantes para diversas aplicaciones. Debido al tamaño nanométrico de las gotas, la apariencia de las nano-emulsiones puede ser desde traslucido hasta opalescente y a diferencia de las emulsiones estas poseen estabilidad frente a la sedimentación o cremado.

Al ser emulsiones, éstas necesitan de energía externa para su formación, así se han desarrollado métodos para la obtención de nano-emulsiones. Que se pueden dividir en métodos de alta y baja energía, siendo estos últimos los preferidos debido

a la facilidad de obtención de las nano-emulsiones, además de no necesitarse equipos especializados.

Los métodos de alta energía para la formación de nano-emulsiones hacen uso de equipos mecánicos como agitadores de alta velocidad, homogeneizadores de alta presión y equipos de ultrasonido. Así las técnicas de homogeneización a alta presión, microfluidización, sonicación, dispersión a chorro y ultrasonido de amplitud alta son utilizados para tal fin. Los métodos anteriormente mencionados han demostrado ser eficaces en la obtención de gotas de tamaño nanométrico, sin embargo, el gasto energético para la formación de las nano-emulsiones puede considerarse como la principal desventaja de estos métodos.

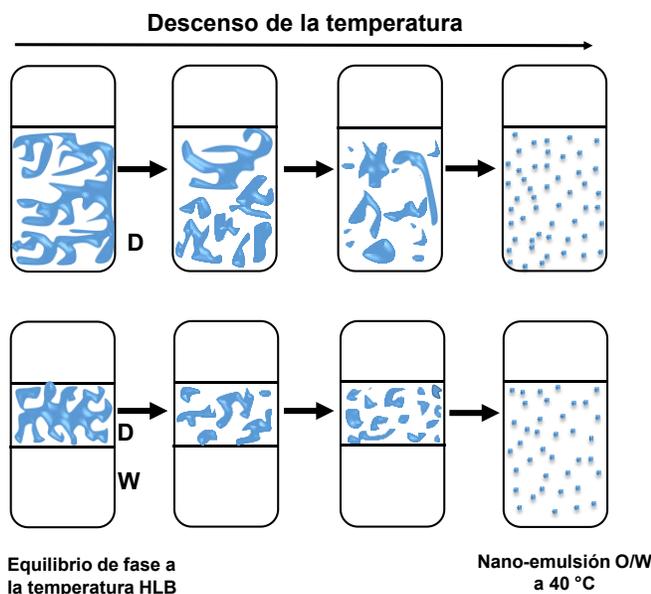
Debido a que en este trabajo se utilizó un método de baja energía, se profundizará un poco en lo que consisten cada uno de ellos.

En contraste con los métodos de alta energía, los de baja energía utilizan las propiedades físicas y químicas del sistema para la obtención de nano-gotas. Uno de los métodos más utilizados para la obtención de nano-emulsiones es el propuesto por Shinoda [126], en el cual los cambios de solubilidad de tensoactivos no iónicos, que contienen al grupo polietileno son aprovechados, este método es también llamado método PIT (Phase Inversion Temperature).

En éste se utiliza una mezcla de aceite, agua y tensoactivo no iónico la cual se somete a cambios en la temperatura, esto hace que el tensoactivo se vuelva más lipofílico (debido a la deshidratación de los grupos polietileno) y empiece a solubilizarse en la fase oleosa. La temperatura en la cual el tensoactivo muestra propiedades balanceadas de hidrofiliidad e hidrofobicidad se denomina temperatura de equilibrio hidrófilo-lipófilo ( $T_{HLB}$ ). El cambio en la temperatura se prefiere sea rápido ya que de esta manera se previenen fenómenos como la coalescencia y la estabilidad de las nano-emulsiones obtenidas aumenta. Las desventajas que presenta este método son: es limitado al uso de tensoactivo no

iónicos y se necesita de energía térmica y la presencia de fases de cristal líquido o microemulsión para la obtención de las nano-emulsiones.

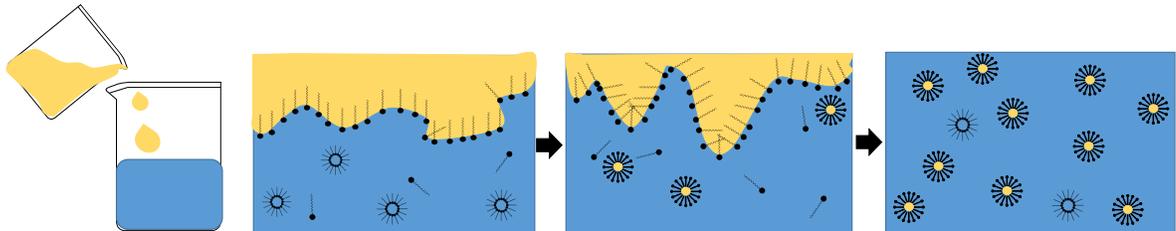
En la Figura 1.16 se describe gráficamente el proceso PIT para la formación de nano-emulsiones.



**Figura 1.16.** Representación esquemática de un posible mecanismo de formación de nano-emulsiones O/W por el método PIT. La curvatura de la película interfacial del tensoactivo se cambia por enfriamiento, y la fase bicontinua D se rompe, formando nanogotas. A) Una fase de microemulsión D de aceite es la fase de equilibrio inicial; B) dos fases, W + D, son el equilibrio inicial, y el exceso de agua no está participando en la formación de nanogotas, sino como medio de dilución. Adaptado de [127].

Otro de los métodos que se han empleado es el llamado efecto Ouzo, donde una mezcla compuesta por aceite y un disolvente inmisible o parcialmente miscible en agua se ponen en contacto con agua y la formación de nanogotas se da de manera espontánea, por lo que también es conocido como emulsificación espontánea [128] (Figura 1.17). Las nano-emulsiones se pueden producir por este método a temperatura ambiente sin el uso de ningún equipo especial. Generalmente se añade agua gradualmente a una mezcla de aceite y tensoactivo, a temperatura constante para producir nano-emulsiones O/W. La espontaneidad del proceso de emulsión depende principalmente de: la tensión interfacial, la viscosidad interfacial y de la

mezcla, la región de transición de fase, la estructura del tensoactivo y su concentración [129]. La desventaja principal de este método es la cantidad limitada de la fase oleosa y la presencia del disolvente que tienen que estar presentes en la mezcla inicial.



**Figura 1.17. Método de emulsificación espontánea. Adaptado de [130].**

Por último se describirá el método PIC (Phase Inversion by Composition), el cual fue utilizado en este trabajo para la obtención de nano-emulsiones O/W. A diferencia del método PIT, en este método el cambio que se necesita es en la composición del sistema, así cuando la relación aceite:agua es alterada la inversión de fase se da [131]. En este método la mezcla inicial es generalmente una microemulsión W/O a la cual se añade progresivamente la fase acuosa a utilizar. Al incrementarse el volumen de agua en el sistema, el grado de hidratación de los grupos polietileno del tensoactivo va aumentando y las propiedades hidrofílicas-lipofílicas del tensoactivo se empiezan a igualar, similar a la temperatura HLB. Cuando el agua se encuentra en exceso en comparación con el aceite pequeñas gotas de aceite en agua (O/W) empiezan a formarse. Es de notar que este método es análogo al método PIT, sin embargo, el uso de temperatura y tensoactivos no iónicos no es necesario. Se ha observado que con este método los tamaños de gota suelen ser menores (tan bajos como 20 nm) [132][133], comparados con los obtenidos con el método PIT además de suponerse que las nano-emulsiones obtenidas pueden ser sometidas a una dilución infinita.

***Síntesis de nanopartículas metálicas en nano-emulsiones.***

Entre las principales aplicaciones que se les ha dado a las nano-emulsiones se encuentra la preparación de partículas poliméricas, sin embargo, en el ámbito farmacéutico, cosmético y de obtención de nanomateriales también destaca su desempeño. Es por ello que estos sistemas son interesantes para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas, sobre todo las nano-emulsiones O/W debido a los tamaños de gota que se pueden obtener y a la baja cantidad de tensoactivo que se utiliza para su fabricación.

Nanopartículas de metales y aleaciones con puntos de fusión bajo como el indio (156.6 °C) y la aleación de Field (35 % Bi, 51 % In y 16.5 % Sn con punto de fusión 63.2°C) fueron sintetizadas con una técnica combinada que utiliza nano-emulsiones y ultrasonido. Los tamaños obtenidos fueron de 15 nm para la aleación de Field y de 30 nm para las nanopartículas de indio, haciendo evidente el uso de las nano-emulsiones como plantilla [134].

Poblaciones monodispersas de nanopartículas del tipo núcleo-coraza o “core-shell” de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au fueron sintetizadas por el método de nano-emulsión, por el cual se obtuvieron tamaños de 8 nm en promedio con un valor de polidispersidad menor al 10 % [135].

Así, de acuerdo a la bibliografía las nano-emulsiones son eficaces en el control del tamaño de partícula durante la síntesis de nanopartículas metálicas. Sin embargo, estos sistemas también han sido utilizados para el control del tamaño de partícula para diferentes materiales: nanopartículas lipídicas [136], poliméricas [137], catalizadores y materiales porosos [138].

## **MICROEMULSIONES.**

Hoar y Schulman [139] prepararon una mezcla cuaternaria de agua, benceno, hexanol y oleato de potasio la cual fue estable, homogénea y ligeramente opalescente, este fue el descubrimiento de las microemulsiones. Gracias a estudios posteriores se pudo proponer el tamaño de las gotas formadas y el arreglo que toman los tensoactivos y co-tensoactivos en la interfase agua-aceite resultando en la formación espontanea de nanogotas.

Debido a lo anterior, el término “microemulsión” se definió como: sistema de dos fases transparentes ópticamente isotrópicas, que consisten en una mezcla de aceite, agua y tensoactivo(s), además en algunas ocasiones se puede utilizar un co-tensoactivo (alcohol de cadena corta).

Por otra parte y en contraste con las emulsiones, las microemulsiones no son emulsiones y presentan estabilización termodinámica al no observarse separación de las fases de las cuales se componen [2], son macroscópicamente homogéneas pero microscópicamente heterogéneas, gracias a la acción estabilizadora de las moléculas del tensoactivo. Al igual que las emulsiones éstas se clasifican en O/W, bicontinuas y W/O dependiendo de la cantidad de fase dispersa y fase continua en la mezcla.

En síntesis, las microemulsiones son soluciones isotrópicas, macroscópicamente homogéneas y termodinámicamente estables conformadas por al menos tres componentes, llamados fase oleosa (usualmente un disolvente orgánico), fase acuosa (agua) y un tensoactivo. A un nivel microscópico las moléculas de tensoactivo forman una monocapa que separa los dominios polares de los no polares. Esta capa interfacial forma diferentes microestructuras que van desde gotas de aceite dispersadas en una fase continua de agua (microemulsión O/W) pasando por una fase esponjosa “bicontinua” hasta gotas de agua dispersas en la fase oleosa (microemulsión W/O).

Múltiples formulaciones han sido estudiadas a partir de los diagramas de fase. Las microemulsiones presentan propiedades únicas como tensión interfacial ultra baja, área superficial enorme y la habilidad de solubilizar líquidos inmiscibles. El aumento en la temperatura causa múltiples cambios en estos sistemas principalmente al utilizar tensoactivos no iónicos y repercute directamente en las transiciones de fase y por consecuencia en las propiedades macroscópicas. Las formas que adoptan los agregados micelares pueden ser caracterizadas mediante técnicas experimentales como microscopía electrónica y espectroscopía de difusión ordenada (DOSY) por resonancia magnética nuclear (RMN).

### **Comportamiento de fase.**

En 1947 Winsor desarrolló un método por el cual los equilibrios de las mezclas de agua, aceite y tensoactivo pueden clasificarse, el cual es utilizado aún. Las cuatro categorías son:

Tipo I: Una microemulsión del tipo O/W se presenta en equilibrio con un exceso de aceite debido a la preferencia del tensoactivo de solubilizarse mayormente en agua.

Tipo II: Una microemulsión del tipo W/O en equilibrio con un exceso de agua debido a que el tensoactivo se solubiliza mayormente en el aceite.

Tipo III: Una estructura bicontinua en equilibrio con un exceso tanto de aceite como de agua, estas estructuras bicontinuas se forman debido a que el tensoactivo no presenta preferencia por ninguna de las fases de agua y aceite.

Tipo IV: Sistemas de microemulsión monofásicos sin la presencia de exceso de agua o aceite.

En la Figura 1.18 se presenta de forma esquemática los equilibrios antes mencionados.

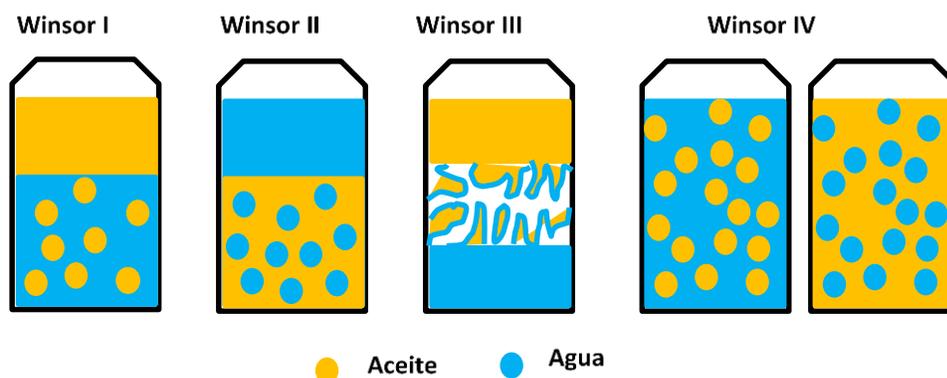


Figura 1.18. Estructuras de las mezclas de agua, aceite y tensoactivo descritas por Winsor. Adaptado de [140].

### Diagramas ternarios de fase (TPD).

Los equilibrios de fase de Winsor descritos previamente pueden ser representados en un diagrama de fase ternario a temperatura y presión constante. Los DTF o TPD (Ternary Phase Diagram) por sus siglas en inglés, son comúnmente utilizados para caracterizar los cambios de fase que sufre una mezcla ternaria. Los tres componentes (fase acuosa, fase orgánica y un tensoactivo) que forman al sistema son localizados en las esquinas del triángulo, donde su fracción en ese punto corresponde al 100%, es decir, al compuesto puro (ver Figura 1.13). Moviéndose de esquina a esquina la fracción de un componente se reducirá y la del otro aumentará. El incremento de la concentración de cada componente se lee, en su eje correspondiente, en el sentido contrario de las manecillas del reloj.

Es así como cada punto en el triángulo representa a una combinación única de los tres componentes. La variación de la composición conduce a la determinación de los límites, es decir, en que composiciones encontraremos a un sistema monofásico, bifásico o trifásico por ejemplo. La fase de tensoactivo, fase acuosa y orgánica pueden ser una mezcla de varios compuestos, por ejemplo una fase orgánica compuesta por aceite y co-tensoactivo.

Cuando se utilizan cuatro o más componentes, los diagramas de fases pseudo-ternarios (DFPT) son utilizados, en donde uno o más vértices del triángulo representan mezclas de dos o más componentes, por lo general mezclas de dos tensoactivos diferentes o una mezcla de tensoactivo y co-tensoactivo compondrán la fase a la que nos referimos como del tensoactivo.

Para un punto "P" (Figura 1.19), la proporción de agua (W) puede ser calculada trazando una línea que atraviese por "P" y a su vez sea paralela al eje del aceite-tensoactivo (OS). Como el vértice W en el TPD representa el 100 % de agua, el punto "P" representa una concentración de agua del 50 %. Aplicando la misma lógica, la proporción de tensoactivo (S) corresponde a un 20 % y la fase oleosa (O) al 30 %. Cualquier punto a lo largo de los ejes corresponde únicamente a una mezcla de dos componentes.

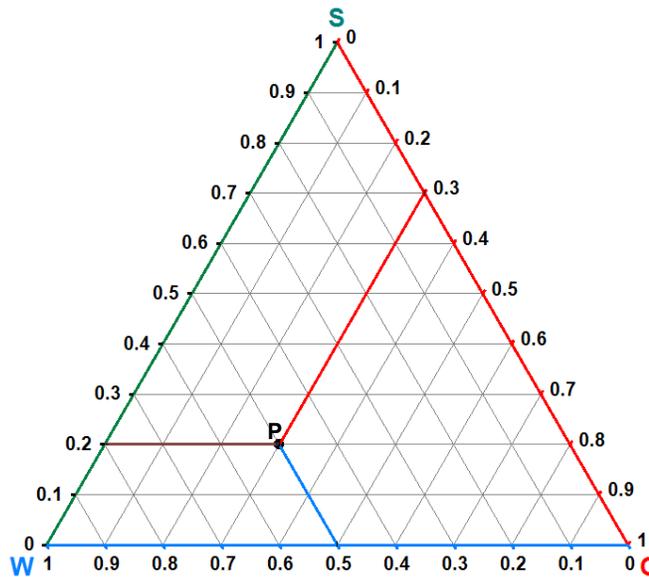


Figura 1.19. Diagrama Ternario de Fases. W: Agua, S: Tensoactivo, O: Aceite.

Cabe mencionar que el análisis en los cambios de fase de las mezclas se suele realizar a simple vista, es decir, cambios de apariencia o de separación de fases, y de tal forma se delimitan los cambios de fases. Por otra parte un estudio más

minucioso se puede realizar al observar las mezclas a través de filtros polarizadores, los cuales revelarán la presencia de fases de cristales líquidos.

### **Formación de microemulsiones.**

Cuando existe un ensamblaje molecular (por ejemplo agregados entre moléculas de tensoactivo) el arreglo que adoptan las moléculas es tal que la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) se reduce al mínimo [141]. Para cualquier proceso termodinámico que ocurre espontáneamente el cambio en la energía libre de Gibbs es negativo, la  $\Delta G$  está ligada y dependerá del área y energía interfacial ( $\gamma\Delta A$ ) así como del cambio de la entropía del sistema al llevarse a cabo la formación de las gotas ( $T\Delta S$ ):

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S$$

### **Ecuación 1.3**

Donde  $\gamma$  es la tensión interfacial entre la fase dispersada y la fase continua (agua y aceite),  $\Delta A$  es el cambio en el área interfacial en la emulsificación de las gotas,  $T$  es la temperatura y  $\Delta S$  es la entropía del sistema. Tras la formación de la microemulsión,  $\Delta A$  es muy grande debido a la formación de un gran número de gotas de tamaño nanométrico.

Inicialmente, se creía que una tensión superficial negativa era necesaria para la formación de la microemulsión. Generalmente en un sistema que contiene aceite/agua/tensoactivo, la tensión interfacial entre el agua y el aceite es mayor a 1 mN/m mientras que en una microemulsión, existen tensiones interfaciales tan bajas como  $10^{-4}$  mN/m. Ahora se sabe que aunque  $\gamma$  es pequeño siempre es positivo y se debe a la disminución de la entropía de la monocapa del tensoactivo [142][143]. De acuerdo a Kumar y col. [144], las microemulsiones se formarán cuando la tensión interfacial sea menor a  $10^{-2}$  mN/m. El componente más influyente en el valor de la energía libre de Gibbs es la entropía, ya que ésta dictamina la dispersión de una fase en otra en forma de miles de pequeñas gotas. Por sí solos los tensoactivos disminuyen la tensión interfacial, sin embargo, algunos como los tensoactivos de grado alimenticio no proporcionan valores tan bajos para que se lleve a cabo una

microemulsión, para lograr dicha reducción se utilizan los co-tensoactivos que comúnmente son alcoholes de cadena corta.

Por ejemplo, una emulsión O/W cuyas gotas tienen un diámetro promedio de 1  $\mu\text{m}$  (con una tensión interfacial de 0.01 N/M), tiene una energía interfacial de aproximadamente 3  $\text{kJ/m}^3$ , mientras que el valor para el término de la entropía configuracional ( $T\Delta S$ ) es próximo a los  $3 \times 10^{-7}$   $\text{kJ/m}^3$  [145]. Por lo anterior, usualmente la expresión para la energía libre de Gibbs está dado por:

$$\Delta G = \gamma \Delta A$$

**Ecuación 1.4**

Puesto que el cambio en la energía interfacial en una emulsión ( $\gamma \Delta A$ ) es siempre positivo debido al aumento del área de contacto entre las fases de aceite y agua después de la emulsificación [146],  $\Delta G$  en la Ecuación 2 será positivo y por lo tanto se requiere de un aporte de energía para formar emulsiones estables.

### **Polidispersidad.**

La polidispersidad es una medida de la uniformidad u homogeneidad en la distribución del tamaño de gota o partícula, cuyos valores varían típicamente de 0.0 a 1.0 [147], donde el intervalo de valores que va desde 0.0 a 0.2 indica una distribución homogénea, valores mayores de 0.7 son indicativos de muestras con poblaciones de distribuciones amplias o heterogéneas y usualmente no son adecuadas para la técnica de DLS.

A pesar de que las microemulsiones son sistemas polidispersos, usualmente son tomadas como sistemas monodispersos para el estudio y simplificación de su análisis. Idealmente, las microemulsiones deberían ser monodispersas, con una distribución de tamaños estrecha por debajo de los 100 nm. Un incremento en la polidispersidad usualmente sacrifica la estabilidad, así como también la adición de distintos componentes como compuestos bioactivos o cambios en su ambiente químico (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) [148].

### **Composición.**

Casi todas las microemulsiones son sistemas formados por una fase orgánica (comúnmente algún aceite o disolvente orgánico), una fase acuosa, un tensoactivo y un co-tensoactivo. Sin embargo, en algunos estudios, los co-tensoactivos pueden no ser utilizados y sustituidos por mezclas de tensoactivos cuyos balances hidrófilos-lipófilos (HLB) sean opuestos y que estructuralmente se complementen [149].

Es así como tensoactivos con grupos polares muy voluminosos (polisorbatos o polioxietilenos) tienden a formar microemulsiones del tipo O/W, por otra parte tensoactivos con colas voluminosas (por ejemplo el dioctil sulfosuccinato de sodio o AOT) tiende a formar microemulsiones W/O [150]. Así la combinación de estos tipos de tensoactivos promueve una gran variedad de composiciones que resultan en la formación de microemulsiones [151].

### **Tensoactivos.**

Los tensoactivos son compuestos que poseen actividad sobre la tensión superficial y están compuestos por una parte polar unida a una cola hidrofóbica (usualmente una cadena hidrocarbonada larga). Presentan afinidad por las fases acuosas u oleosas dependiendo de si la parte hidrófoba o hidrófila es la dominante [152][153]. Cuando éstos están presentes en altas concentraciones, tienden a formar una monocapa en la interfase ordenándose las colas hidrofóbicas en el medio oleoso y las cabezas hidrofílicas hacia la fase acuosa. Existen tres tipos en los cuales se dividen los tensoactivos: iónicos, no iónicos y zwitteriónicos. Para fines prácticos se abordaran únicamente los tensoactivos no iónicos que fueron los utilizados en éste trabajo.

#### ***Tensoactivos no iónicos.***

Los tensoactivos que integran este grupo son comúnmente utilizados para la formulación de microemulsiones, debido a la baja toxicidad, que no son irritantes y la facilidad con la que se forman microemulsiones [154]. Algunos ejemplos incluyen

a los tensoactivos derivados de ésteres de azúcares (monooleato de sorbitán) [154][155], éteres de polioxietileno [156] y ésteres de sorbitán etoxilados (polisorbatos, familia de Tween®) [157]. Se ha observado que mezclas de tensoactivos no iónicos son por mucho más efectivos que otra clase de tensoactivos para la formación de microemulsiones [158].

En este trabajo se utilizó el tensoactivo no iónico Brij 96V, antes conocido como BRij 98, Brij 97 y ahora comercializado por Sigma-Aldrich bajo el nombre de Brij O10. Los diferentes nombres fueron otorgados debido a cambios en la pureza y método de obtención del tensoactivo. Este tensoactivo presenta una estabilidad alta (años) si es protegido de agentes oxidantes. A altas temperaturas un entrecruzamiento entre los grupos éter ocurre formando como subproductos peróxidos. Hasta el año de 1991 este tensoactivo contenía una pequeña cantidad de ácido cítrico o BHA como antioxidante, sin embargo, no lo contiene más. El HLB reportado por el fabricante es de 12.4.

Posee propiedades emolientes, emulsificantes, lubricantes y solubilizantes para aplicaciones cosméticas; emulsificante para cremas astringentes y lociones; en la formación de geles traslúcidos; en champús; espumante en preparaciones para la ducha; en geles de Carbopol; utilizado también en productos depilatorios, alaciadores para el cabello; solubilizante de oxácidos en lápices labiales y como agente dispersante en baños de aceite [159].

Las principales aplicaciones que se le han dado a este tensoactivo al ser utilizado en microemulsiones son en aquellas de uso oftálmico [160], en formulaciones utilizadas para la dosificación de medicamentos [161][162], como extractante de proteínas [163], en formulaciones de aplicación cutánea [164] y como componente en microemulsiones de grado alimenticio [165].

**Balance Hidrófilo-Lipófilo (HLB).**

Los tensoactivos anfífilicos están caracterizados por poseer un valor HLB, una relación relativa de los grupos polares y no polares del tensoactivo. Cuan más hidrofílico es el tensoactivo normalmente el valor HLB es mayor.

Los valores HLB y los sistemas formados al variar el valor de este se muestran en la Tabla 1.2, que proporciona un principio elemental para tratar con la gran variedad de tensoactivos. Aunque no existe un principio absolutamente correcto para elegir un tensoactivo para las aplicaciones requeridas, su valor HLB proporciona parcialmente una indicación cuantitativa útil. En el extremo superior de la escala se encuentran los tensoactivos hidrófilos, que poseen una alta solubilidad en agua y generalmente actúan como buenos agentes solubilizantes, detergentes y estabilizadores para emulsiones de aceite en agua; en el extremo inferior hay tensoactivos con baja solubilidad en agua, que actúan como solubilizantes de agua en aceites y buenos estabilizadores de microemulsión W/O. La eficacia de un tensoactivo dado para estabilizar un sistema de emulsión particular dependería del equilibrio entre los valores HLB del tensoactivo y la fase oleosa involucrada [166].

**Tabla 1.2. Intervalo de HLB de tensoactivos con diferentes usos, adaptado de [167].**

<b>HLB</b>	<b>Usos en los que se puede aplicar</b>
1 - 3.5	Antiespumante
3.5 - 8	Emulsificante W/O
7 - 9	Agentes dispersantes y humectantes
8 - 16	Emulsificante O/W
13 - 16	Detergentes

15 - 40 Solubilizantes

### **Co-tensoactivos.**

Un co-tensoactivo juega variados papeles en la formación de una microemulsión, que van desde ayudar a la reducción de la tensión interfacial, al incremento de la flexibilidad y fluidez de la interfase formada por los tensoactivos mediante el posicionamiento de estos compuestos en medio de las colas apolares de los tensoactivos.

Otro aspecto importante es que ayuda a disminuir la viscosidad de los aceites, la cual impide la formación de estructuras más rígidas como geles. Por su naturaleza química (alcoholes de cadena corta), los co-tensoactivos son solubles en ambas fases, la acuosa y la oleosa, además ayudan a solubilizar compuestos poco solubles como algunos péptidos, vitaminas, etc.

El uso de co-tensoactivos da como resultado sistemas de microemulsiones que pueden ser diluidos, además de que ayuda a conectar las regiones W/O y O/W a través de una región bicontinua, sin que se lleve a cabo una separación de fases [168][169][170].

### **Fase orgánica.**

Esta fase usualmente está compuesta por sustancias de carácter hidrofóbico (aceites naturales y disolventes orgánicos). Desde un punto de vista de la industria alimenticia, los aceites vegetales son candidatos ideales para la formulación de microemulsiones, por su baja presión de vapor y gran abundancia lo que los hace económicos y “amigables con el ambiente”.

Sin embargo, las fases orgánicas más utilizadas para la formación de microemulsiones son los aceites minerales, los cuales son mezclas de hidrocarburos de cadenas alifáticas con longitud de 8 a 30 carbonos [171]. Los aceites minerales han sido usados ampliamente para formular sistemas de microemulsiones generando una buena dispersión de las fases [172].

Muchos aceites vegetales incluyendo el de soya, aceite de maíz, de semillas de algodón y girasol han sido utilizados para generar microemulsiones que no necesariamente son para aplicaciones de la industria alimenticia [171], sino la industria metalúrgica [173], investigaciones a nivel de biología molecular [174], técnicas cromatográficas [175], etc.

El aceite de soya es un componente común en muchas microemulsiones, esto debido a la abundancia, bajo costo, y cuya composición es de aproximadamente el 80% de ácidos grasos insaturados (ver Tabla 1.3) [168][150][176].

Tabla 1.3. Composición del aceite de soya [177].

Ácido graso	Porcentaje
Ácido palmítico (C16:0)	7-14
Ácido oleico (C18:1)	19-30
Ácido linoleico (C18:3)	44-62
Ácido $\alpha$ -linoleico (C18:3)	4-11

Triglicéridos de cadena larga (18 carbonos) son difíciles de solubilizar debido a su gran peso molecular el cual limita su flexibilidad en las interfaces y restringe la formación de una película (como en el caso de los tensoactivos) así como también el intercambio de materia. Es así que, se prefieren triglicéridos más pequeños (de cadena mediana) que permitan la formación de una interface debido a una mayor flexibilidad en su estructura.

El aceite de ricino es el aceite natural que posee la viscosidad más grande, también ha mostrado capacidad para formular microemulsiones, recientes investigaciones

han mostrado que en conjunto con líquidos iónicos, los cuales toman el papel del tensoactivo se puede obtener una microemulsión a temperatura ambiente [178].

En la tabla 1.4 se muestra la composición del aceite de ricino.

Tabla 1.4. Composición del aceite de ricino.

Ácido graso	Porcentaje
Ácidos saturados	2.4
Ácido dihidroxiestearico	0.6
Ácido oleico (C18:1)	7.4
Ácido ricinoleico	87.0
Ácido linoleico (C18:3)	3.1

#### Fase acuosa.

El agua es un componente esencial en las microemulsiones. En las del tipo O/W el agua actúa como fase continua. La inmiscibilidad del agua frente a los hidrocarburos del aceite combinada con la habilidad para formar puentes de hidrogeno con los tensoactivos resultan en la formación de gotas de aceite (sin embargo esto depende de las propiedades del tensoactivo).

La formación de microemulsiones usualmente requiere de la presencia co-tensoactivos solubles en agua (polioles de cadena corta como el propilenglicol). Los distintos componentes de la fase acuosa como la fuerza iónica y el pH influyen en la formación de la microemulsión.

#### Conductividad.

La conductividad en los sistemas de microemulsión es muy sensible y los cambios revelan modificaciones en el tamaño de las gotas formadas, las interacciones gota-gota y el intercambio de materia entre ellas. Las mediciones de conductividad en

estos sistemas también reflejan la variación de microestructuras presentes. La variación también es debida a cambios en el ambiente químico como la composición del sistema y fuerza iónica y factores externos como la temperatura. En condiciones normales, las microemulsiones del tipo W/O presentan conductividades tan bajas como  $10^{-9}$ - $10^{-7} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , ligeramente mayores a la que presentaría únicamente el disolvente orgánico o aceite empleado (rondando los  $10^{-14} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) el cual es el medio continuo y componente principal. Tal aumento en la conductividad refleja las microgotas formadas en las microemulsiones, las cuales son capaces de transportar cargas. Al aumentar la cantidad de la fase dispersa, la conductividad aumenta de manera significativa (de hasta cuatro órdenes de magnitud) la cual en comparación con la conductividad típica que presentan las microemulsiones W/O es mayor lo que indica un reacomodo en el sistema para poder estabilizar tal cantidad de agua y la formación de estructuras tipo esponja que es favorecida, a esta fase se le conoce también como microemulsión bicontinua. Finalmente un decaimiento en los valores de la conductividad es típicamente observado, el cual confirma el reacomodo de las moléculas de tensoactivo al forma gotas de aceite dispersas en el medio acuoso (microemulsiones O/W).

### **Propiedades dinámicas de las microemulsiones.**

En los sistemas de microemulsiones, las gotas están en constante movimiento promoviendo colisiones entre sí. Debido a lo anterior las interacciones que se dan entre los componentes de las gotas y las interacciones gota-gota se toman en cuenta [148]. La Figura 1.20 muestra una representación gráfica de las gotas de microemulsiones W/O y O/W, compuestas por una fase acuosa, fase oleosa, tensoactivo y co-tensoactivo. El núcleo de las gotas de agua en aceite contiene a la fase acuosa, la cual a su vez se divide en distintas partes debido a las interacciones agua-tensoactivo, ya que el tensoactivo necesita de una capa de hidratación de la parte polar para así estabilizar la interfase agua-aceite. Entonces el agua se divide en agua enlazada al tensoactivo y agua libre (Fig. 1.20). El que haya esta división no significa que estas moléculas de agua se encuentren de manera estática y solo

pertenezcan al agua enlazada al tensoactivo o al agua libre, el agua está en equilibrio, sin embargo, siempre habrá moléculas asociadas al tensoactivo y moléculas libres [179]. Así mismo, en la fase acuosa se podrán encontrar iones o solutos disueltos los cuales podrán pasar del agua enlazada al agua libre y viceversa. Los principales parámetros que limitan el intercambio de especies solubles en la fase acuosa son la temperatura, la composición de la fase acuosa y la concentración de solutos.

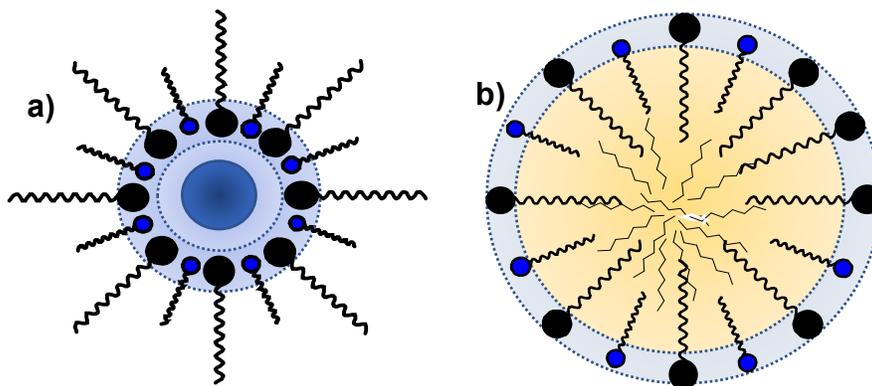


Figura 1.20. Representación esquemática de gotas de microemulsión: a)W/O y b)O/W. Adaptado de [148].

Por otra parte, cuando se tiene una microemulsión del tipo O/W, las moléculas de aceite se pueden incorporar como un núcleo o bien dispersar entre las colas del tensoactivo (Fig. 1.21). Las configuraciones anteriores dependerán de la naturaleza y estructura de la fase oleosa.

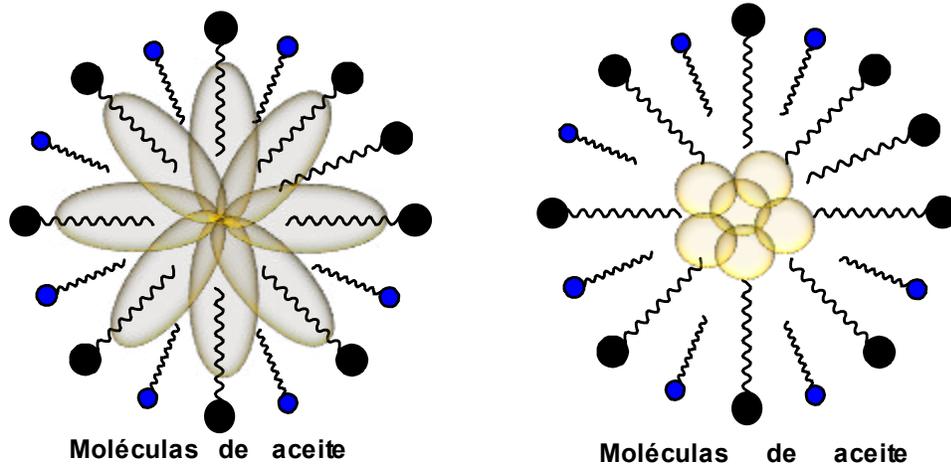


Figura 1.21. Representación gráfica de las diferentes conformaciones de las moléculas de aceite en una microemulsión de tipo O/W. Adaptado de [271].

**INTERACCIONES ENTRE GOTAS E INTERCAMBIO MICELAR.**

El intercambio entre gotas presentes en las microemulsiones y en sistemas micelares es muy parecido y depende de los componentes del sistema, es decir, de la viscosidad del sistema, flexibilidad de la interface formada por el aceite-tensoactivo-agua y la temperatura, así como del número de gotas que se encuentren en el sistema. El movimiento Browniano es responsable de las colisiones entre las gotas y el intercambio de materia entre estas, tal intercambio dependerá de que tan fuerte sea la interfase estabilizada por el tensoactivo [180], en la Fig.1.22 se esquematiza de manera general. Lo anterior facilita el uso de estos sistemas microemulsionados como medios de reacción [181].

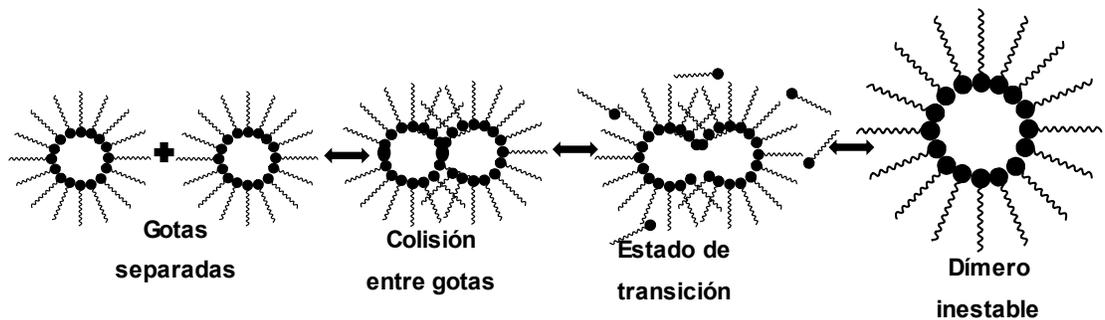


Figura 1.22. Mecanismo de coalescencia entre gotas. [272]

La rigidez que la película de tensoactivo posea, afecta las propiedades de coalescencia de la gota. La rigidez de la interface se incrementa al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensoactivo, sin embargo, decrece sustancialmente cuando un co-tensoactivo es añadido. El incremento de las moléculas de surfactantes en la película interfacial incrementa a su vez la rigidez de la interface.

La naturaleza del tensoactivo y sus propiedades fisicoquímicas dictarán si este se puede absorber o no en la interfase, promoviendo o impidiendo la transferencia entre las gotas [182]. La absorción del tensoactivo en la interface depende del coeficiente de difusión en las fases, la relación de volúmenes de las fases y los parámetros termodinámicos interfaciales como la energía libre de Gibbs [183][184].

### **Síntesis de nanopartículas metálicas en microemulsiones.**

El uso de microemulsiones del tipo agua en aceite (W/O) y aceite en agua (O/W) para la síntesis de nanopartículas ofrece grandes ventajas frente a otros métodos. Ya que al controlar parámetros como el tamaño del núcleo de agua (volumen de reacción), el tipo de disolvente (para controlar la flexibilidad de la interfase de las micelas), el tipo de tensoactivo y co-tensoactivo utilizado, la temperatura y las concentraciones de los reactivos a utilizar ayudan a controlar la forma y tamaño del nanomaterial.

En este trabajo se propone el uso de sistemas de microemulsiones y nano-emulsiones para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas, utilizando reductores verdes, por lo que es importante describir algunas propiedades, que deben ser consideradas para formular dichos sistemas.

En síntesis, las microemulsiones son mezclas isotrópicas, macroscópicamente homogéneas y termodinámicamente estables que están conformadas por al menos tres componentes, llamados fase oleosa (usualmente un disolvente orgánico), fase acuosa (agua) y un tensoactivo o mezcla de ellos. A un nivel microscópico las moléculas de tensoactivo forman una monocapa que separa los dominios polares

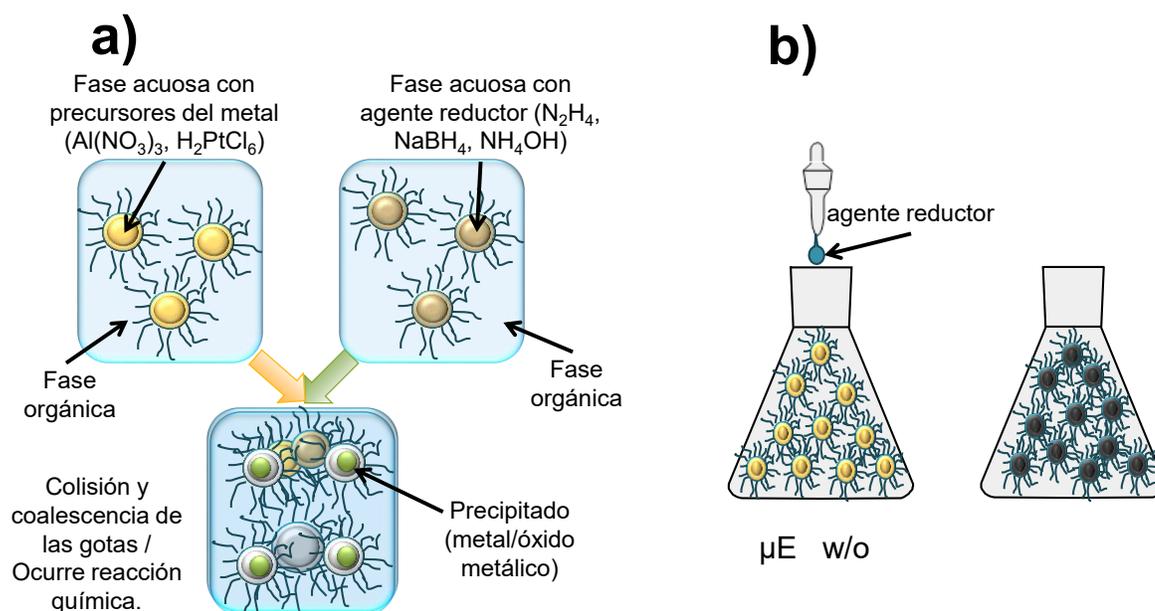
de los no polares. Esta capa interfacial forma diferentes microestructuras que van desde gotas de aceite dispersadas en una fase continua de agua (microemulsión O/W) pasando por una fase esponjosa “bicontinua” hasta gotas de agua dispersas en la fase oleosa (microemulsión W/O).

Las diferentes formas y morfologías de las microemulsiones están relacionadas con las propiedades de la monocapa del tensoactivo en la interfase agua-aceite o viceversa. Gotas con alta monodispersidad, estructuras bicontinuas que no es más que túneles de agua o aceite interconectados por la acción del tensoactivo, estructuras cilíndricas o de esponja han sido observadas. Las microemulsiones presentan propiedades únicas, como una tensión superficial muy baja y la habilidad de solubilizar otros líquidos inmiscibles. Por lo anterior y debido a la estabilización termodinámica que presentan las microemulsiones han sido objeto de estudio de la química coloidal durante las últimas décadas. El cambio gradual en la temperatura origina cambios de fase en las microemulsiones, tales cambios pueden ser determinados al medir la conductividad de la misma, aunque existen otras técnicas empleadas para determinar las microestructuras presentes en estos sistemas tales como la microscopía electrónica, técnicas de dispersión de luz y resonancia magnética nuclear. Estas caracterizaciones han contribuido al modelado teórico y computacional de los diagramas de fases donde se refleja el comportamiento fásico de estos sistemas.

En general existen dos métodos para la preparación de nanopartículas usando la técnica de microemulsión. El primer método se basa en la preparación de una microemulsión la cual contiene al precursor metálico y gota a gota se le añade el agente precipitante (reductor) (Fig. 1.23b). Este método de adición del agente precipitante se basa en el fenómeno de difusión de la fase continua aceitosa hacia los núcleos acuosos donde se encuentra el precursor metálico.

El segundo método que es también usualmente utilizado para sintetizar nanopartículas es mediante el uso de dos microemulsiones, donde dos reactivos A

y B son disueltos en los núcleos acuosos de dos microemulsiones (Fig. 1.23a), para que cuando se lleve a cabo la síntesis se mezclen ambas microemulsiones y mediante la colisión de las gotas estas intercambien ambos reactivos y se complete la reacción. Este método depende de la fusión-fisión de las nanogotas que se encuentran en las microemulsiones. Los métodos antes mencionados se ilustran en la Figura 1.17.



**Figura 1.23. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas utilizando microemulsiones. Adaptado de [273].**

Se ha encontrado que en general con el método de adición del reductor o agente precipitante las nanopartículas obtenidas son de mayor tamaño comparadas con el tamaño de la gota inicial de la microemulsión, mientras que con el método de dos microemulsiones las nanopartículas obtenidas son de tamaño menor a las gotas de la microemulsión [185][186] debido a la velocidad de reacción, que suele ser mayor para los sistemas donde se mezclan dos microemulsiones que en los que se adiciona por separado el agente reductor. Sin embargo, la velocidad de reacción no

es el único parámetro que ejerce influencia sobre el tamaño final de la nanopartícula, investigaciones han probado que la relación agua:tensoactivo, el tipo de aceite que conforma la fase continua y la concentración molar de los reactantes son factores que se deben tomarse en cuenta [187].

No solo se pueden sintetizar nanopartículas monometálicas, la técnica de microemulsiones ha mostrado ser versátil ya que distintos tipos de nanomateriales han sido obtenidos. Ejemplos de la gran variedad de nanomateriales que se pueden preparar por este método incluyen nanopartículas metálicas, bimetálicas [188] y trimetálicas [189], nanopartículas de óxidos metálicos [190], puntos cuánticos o "quantum dots" [191], estructuras del tipo core-shell [192] e incluso materiales cerámicos complejos como espinelas [193][194] y perovskitas [195].

Partículas con diferentes morfologías han sido sintetizadas por Grillo y col. [196], donde observaron la transición de partículas cilíndricas a esféricas al disolverse distintos iones en la solución acuosa. Li y col. obtuvieron nanobarras y nanopartículas de sulfuro de zinc cuya formación depende del tensoactivo con el que se formule la microemulsión ya sea CTAB o Triton X-100 [197].

Estructuras como partículas bimetálicas e incluso trimetálicas de gran importancia en el área de catálisis han sido sintetizadas con este sistema de microemulsión. Usualmente en la preparación de partículas bimetálicas se buscan aquellos metales que puedan formar aleaciones y que por lo tanto tengan una estructura cristalina similar para que el ensamblaje de los átomos sea óptimo. Así, partículas bimetálicas de oro-plata [198], níquel-oro [199], platino-níquel [200] y trimetálicas como  $Ni_{1-x}Co_x-Fe_2O_4$  [201], Pt-Ru-Ni [202] y Ce-Zr-Sr [203], entre otras más, fueron sintetizadas en microemulsiones y aplicadas en procesos catalíticos como la reacción de reducción de oxígeno y oxidación de alcoholes pequeños.

El estado del arte documenta que la técnica de microemulsiones en la síntesis de nanopartículas metálicas es una de las mejores ya que controla muy bien el tamaño y forma de la nanopartícula con tan solo la variación de la relación agua/tensoactivo.

Sin embargo este tipo de sistemas no son nada amigables con el ambiente debido al uso de disolventes orgánicos y grandes cantidades de tensoactivo, es por eso que las investigaciones apuntan a sustituir los componentes de la microemulsión por aquellos que no causen daño al ambiente. Así Eastoe en 2006 [204], Vesperinas y col. [205], y Salabat y col. [206] en 2007 proponen el uso de tensoactivos foto degradables (con luz UV) para la formulación de microemulsiones ayudando a que se dé la separación de las fases y poderlas reutilizar eliminando la gran cantidad de tensoactivo que se utilizó para formularla. Sin embargo el uso de tensoactivos derivados de productos naturales expande cada vez más las posibilidades de formulación de estos sistemas para que tengan un bajo impacto ambiental.

## **MICROEMULSIONES LIBRES DE TENSOACTIVO.**

Esfuerzos por desarrollar tecnologías “verdes” han hecho que los investigadores recurran a compuestos derivados de productos naturales ya que son amigables con el ambiente y de bajo costo. El grupo de Hou [207] ha centrado su investigación en el desarrollo de microemulsiones libres de tensoactivos *SFME* por sus siglas en inglés (Surfactant-Free MicroEmulsions). Ellos utilizan componentes oleosos comunes (derivados de hidrocarburos) así logran obtener una microemulsión del tipo O/W a partir de una mezcla de benceno, etanol y agua donde el tamaño de gota ronda los 20 a 50 nm, por lo que no se pueden considerar verdes. Sin embargo demuestran que los sistemas sin tensoactivo tienden a formar microestructuras como las encontradas en las formulaciones que contienen tensoactivos. Lo cual sirve de parteaguas para realizar el estudio con distintas fases oleosas que no se consideren tóxicas.

Investigaciones en el mismo rubro pero ahora sustituyendo la fase orgánica por un aceite natural como el ácido oleico en combinación con n-propanol y agua, resulta en la obtención de regiones de microemulsión (O/W y W/O). Según el estudio

llevado a cabo por Hou en 2013 [152] tales regiones de microemulsión fueron caracterizadas obteniéndose tamaños de gota que van desde 2 hasta 40 nm, dependiendo de la composición de la microemulsión, cabe mencionar que estos sistemas se caracterizan por obtenerse únicamente en las regiones ricas en tensoactivo –que en este caso son los alcoholes, los cuales son utilizados en otras formulaciones como co-tensoactivos-. Hou y col. [207,208] reportan propiedades muy similares a las obtenidas con los sistemas donde se utilizan tensoactivos y gran capacidad para solubilizar sustancias altamente iónicas, lo cual hace a estos sistemas libres de tensoactivos buenos candidatos para llevar a cabo la síntesis de nanomateriales.

Éste tipo de sistemas han sido estudiados en recientes años debido a la discrepancia entre los científicos al tratar de clasificarlos como microemulsiones o simples soluciones ternarias. Por tal motivo, en 2016 ha quedado demostrado que las nanoestructuras están presentes al igual que en los sistemas de microemulsiones comunes [209,210]. Sin embargo, estas nanoestructuras presentan una interface más flexible en comparación con aquellas formadas por tensoactivos comunes. Debido a lo anterior Zemb y col. [211] denominaron a este tipo de sistemas como microemulsiones ultra-flexibles.

# Capítulo 2

## **S** ECCIÓN **E** XPERIMENTAL



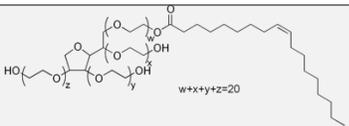
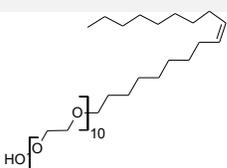
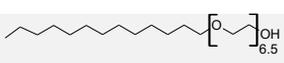
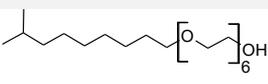
## Materiales y métodos.

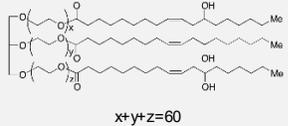
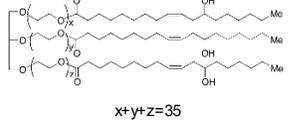
Todos los reactivos fueron utilizados sin ningún tipo de purificación.

### Tensoactivos.

Para la formulación de las microemulsiones y nano-emulsiones aceite en agua se utilizaron tensoactivos cuya toxicidad para el medio ambiente fuera nula o baja, por lo anterior, los tensoactivos probados fueron aquellos que se utilizan en formulaciones farmacéuticas, cosméticas y en la industria alimenticia. En la Tabla 2.1 se muestran los tensoactivos utilizados, su estructura y el HLB correspondiente.

Tabla 2.1. Tensoactivos utilizados.

<b>Tensoactivo (nombre comercial)</b>	<b>Nombre químico</b>	<b>Estructura química</b>	<b>HLB</b>
<i>Tween 80</i>	Monooleato de polioxietilen(20)sorbitano		15 [212]
<i>Brij 96V/ Brij O10</i>	Éter de polioxietilen(10)oleílico		12 [213]
<i>Synperonic 13/6.5</i>	Polioxietilen(6.5) tridecanol		12.5 [214]
<i>Synperonic 10/6</i>	Polioxietilen(6) isodecanol		12.6 [214]

<i>Cremophor RH60</i>	Aceite de ricino de polioxietileno (60)	 $x+y+z=60$	15.7 [215]
<i>Cremophor EL</i>	Aceite de ricino de polioxietileno (35)	 $x+y+z=35$	12-14 [216]

### Co-tensoactivos.

Los co-tensoactivos utilizados fueron principalmente alcoholes y algunos de ellos se utilizaron para formular microemulsiones libres de tensoactivo, además de ayudar a disminuir la viscosidad de los sistemas formulados con tensoactivos evitando la formación de cristales líquidos.

Para la formulación de las mezclas libres de tensoactivos los alcoholes utilizados fueron etanol (EtOH), 1-propanol (PrOH), isopropanol (i-PrOH), 1-butanol (BuOH), pentanol (mezcla de isómeros, PnOH) además de acetona, todos grado reactivo y suministrados por Karal.

Al formular microemulsiones y nano-emulsiones utilizando varios tensoactivos los co-tensoactivos probados fueron: EtOH, PrOH, BuOH, 1,2-propanodiol (PG), 1-pentanol, 1,2-hexanodiol y 2-fenoxietanol. El PG 99.5 %, 1,2-hexanodiol 98 % y 2-fenoxietanol 99 % fueron suministrados por Sigma-Aldrich, todos grado reactivo.

### Aceite.

El aceite utilizado como fase oleosa en todos los experimentos fue el aceite de ricino, que es un aceite vegetal compuesto por varios triglicéridos encontrándose en mayor proporción el ácido ricinoleico, debido a lo anterior es el aceite que posee la mayor viscosidad. El aceite de ricino tiene varios usos entre los que se encuentran la fabricación de plásticos, pinturas y lubricantes de alto rendimiento. En el sector farmacéutico es empleado como base para la obtención de tensoactivos

biocompatibles que mejoran la solubilidad de fármacos. Y en el sector cosmético se destina para la elaboración de distintas formulaciones de aplicación tópica.

**Fases acuosas.**

Las disoluciones acuosas empleadas para la síntesis de nanopartículas fueron soluciones de nitrato de plata a distintas concentraciones ( $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> hasta 0.2 mol L<sup>-1</sup>). Soluciones de hidróxido de sodio en concentraciones de 0.1 hasta 0.75 mol L<sup>-1</sup> fueron utilizadas, así como el extracto acuoso de hojas de geranio (*P. hortorum*).

**Otros reactivos.**

Reactivos para formar el azul de Prusia para la determinación del poder reductor.

Solución de cloruro de hierro (III) (FeCl<sub>3</sub>) al 0.1 % P/V.

Buffer de fosfatos a partir de soluciones de concentración 2 mol L<sup>-1</sup> de fosfato ácido de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) y fosfato diácido de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>).

Solución de ácido tricloroacético al 10 %.

Solución de ferricianuro de potasio (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) al 1 %.

Soluciones estándar de α-tocoferol y ácido ascórbico a distintas concentraciones desde 50-1000 µg mL<sup>-1</sup>.

Todos los reactivos fueron suministrados por Karal (grado reactivo).

## Métodos

En esta sección se describirán las metodologías realizadas para la obtención de las nanopartículas de plata y su caracterización. Se hace referencia a los componentes por sus iniciales de la palabra en inglés, así, para el tensoactivo se utilizó la letra S (surfactant), para el aceite la O (oil) y para la fase acuosa W (water). La cantidad de cada uno de los componentes empleados se expresa en porcentaje en peso (%P/P o wt. %) a menos que se indique otra cosa y las relaciones entre ellos son másicas.

### **Obtención del extracto acuoso de hojas de *P. hortorum*.**

Para la elaboración del extracto acuoso de hojas de geranio (GLE) 2g de hojas secas (las hojas son secadas en una estufa a 60 °C durante 12 horas) se ponen en contacto con agua hirviendo durante 5 minutos y el extracto se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Una vez obtenido el extracto, éste se centrifuga a 4500 rpm durante 10 minutos para separar partículas que se encuentren suspendidas y posteriormente se filtra por membranas hidrófilas de Nylon con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente con filtros de 0.25  $\mu\text{m}$ , lo anterior para eliminar los residuos que mediante centrifugación no pudieron ser separados. El extracto se almacenó en un congelador a -4 °C hasta el día de su uso.

### **Poder reductor del extracto (FRAP).**

El poder reductor de las biomoléculas se refiere a la capacidad de actuar como donadores de electrones o receptoras de protones en reacciones usualmente metabólicas de óxido-reducción.

El poder reductor del extracto fue determinado utilizando el método de la formación del azul de Prusia por la reducción del hierro o FRAP por sus siglas en inglés (Ferric Reducing Ability of Plasma).

Se prepararon distintas soluciones acuosas del extracto y el estándar (ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol) a las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600,

700, 800 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , se toman 10 mL de las soluciones anteriores y cada una se mezcla con 2.5 mL de buffer de fosfatos a pH 6.6 y ferricianuro de potasio al 1 % P/V (2.5 mL).

La mezcla es incubada a 50 °C por 20 minutos, una vez pasado el tiempo se adiciona ácido tricloroacético al 10 % P/V (2.5 mL) y se centrifugan las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante de las muestras se le adicionan 2.5 mL de agua desionizada y 0.5 mL de cloruro de hierro (III) al 0.1 % P/V y se lee la absorbancia a 700 nm.

Las curvas de calibración se determinan a partir de la linealidad que muestre la absorbancia a 700 nm de los estándares probados. Para el  $\alpha$ -tocoferol es hasta una concentración de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y para el ácido ascórbico hasta 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio de las mediciones  $\pm$  límite de confianza.

### **Formación de microemulsiones y comportamiento fásico.**

Las microemulsiones fueron formuladas una vez llevado a cabo el diagrama ternario de fases para cada una de las mezclas de aceite, tensoactivo y agua probadas. Así el estudio del comportamiento fásico se llevó a cabo utilizando dos métodos, el método conocido como de valoración y el método de pesado directo. Primeramente se realizó un barrido rápido del comportamiento utilizando el método de valoración donde distintas relaciones peso/peso de aceite y tensoactivo son “valoradas” con la fase acuosa. En la Figura 2.1 se muestra el diagrama que indica el contenido de agua adicionado (izquierda) a las mezclas O/S (derecha), las mezclas obtenidas por cada adición de agua son analizadas visualmente observando la formación de una o más fases y mediante polarizadores cruzados la existencia de estructuras de cristal líquido, de tal manera se pueden obtener los límites entre la zona monofásica de la multifásica.



Las nano-emulsiones son obtenidas a partir de la dilución de microemulsiones O/W, por lo que una vez formada la microemulsión O/W se diluye con el agua necesaria para completar la composición deseada. La adición de agua deber ser progresiva y con agitación constante.

La estabilidad de las nano-emulsiones fue observada al medir la variación del tamaño de gota y la polidispersidad de las muestras, ya que se ha observado que la maduración de Ostwald es el principal mecanismo por el cual se desestabilizan. El aspecto visual el cual es traslucido y monofásico para todas las nano-emulsiones formuladas también se verificó.

### **Conductividad**

Los experimentos de conductividad fueron llevados a cabo utilizando el conductímetro 712 de Metrohm y conductímetro Crison GLP31 con una constante de celda de  $\approx 1 \text{ cm}^{-1}$  a temperatura controlada.

Mediante esta técnica se puede identificar a las diferentes microestructuras W/O, bicontinua y W/O al observar cambios significativos en los valores de conductividad. Las mezclas de aceite y tensoactivo son colocadas en un tubo de ensayo en un baño a temperatura de 25 °C bajo agitación intensa para que haya una buena homogenización. A las mezclas O/S se les adiciona lentamente agua Milli Q o la fase acuosa a utilizar y se registra la conductividad. Usualmente para realizar mediciones de conductividad es necesario la presencia de un electrolito en concentraciones bajas, para observar de mejor manera el perfil de conductividad, sin embargo, en el presente trabajo el tensoactivo con el que se trabajó presenta impurezas iónicas (debidas al proceso de obtención del tensoactivo) que hacen prescindir del electrolito.

### **Tamaño de gota y de partícula**

La técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) fue utilizada para obtener el radio hidrodinámico de las gotas de las nano-emulsiones así como de las nanopartículas de plata sintetizadas. Las mediciones fueron llevadas a cabo a 25 °C y utilizando un

ángulo de 90 °. Cada muestra se midió por triplicado y el radio hidrodinámico fue calculado a partir del ajuste manual del primer parámetro del método de los cumulantes. Las medidas del tamaño para las partículas, fueron determinadas a partir de partículas lavadas y re-suspendidas en agua.

El tamaño de gota para los sistemas de microemulsión no pudo ser evaluado de forma asertiva ya que al tratar de diluir las muestras estas presentaban separación de fases, por lo que los valores mostrados son de los sistemas concentrados.

### **Potencial zeta**

EL potencial zeta ( $\zeta$ ) se midió utilizando un equipo Zetasizer nano Z de Malvern Instruments, utilizando agua como medio de dispersión. El potencial zeta fue determinado a partir de la medición de la movilidad electroforética ( $\mu$ ) aplicando la aproximación de Smoluchowski.

### **Microscopia electrónica**

La microscopia electrónica de barrido (MEB) y microscopia electrónica de barrido-transmisión (STEM por sus siglas en inglés) de las partículas se realizó usando un microscopio electrónico ZEISS Gemini 500 con detector para STEM y energía dispersiva de rayos-x (EDS) capaz de cuantificar incluso Boro. Las partículas no fueron recubiertas con ningún tipo de aditivo debido a su naturaleza metálica.

### **Microscopia hiperespectral Cytoviva.**

Las muestras fueron observadas bajo esta técnica en los medios de reacción, es decir, sin ser lavadas o centrifugadas a menos que se indique lo contrario. Todas fueron observadas por el objetivo de 100X y sin ser sometidas a ningún tipo de pretratamiento.

### **Espectrofotometría UV-vis.**

Los espectros UV-vis de las muestras fueron obtenidas en un espectrofotómetro varian Cary 50 y varian Cary 300 en una celda de cuarzo de 10  $\mu$ L de volumen.

### Análisis FTIR

Los espectros FTIR fueron adquiridos mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR) con punta de diamante en un espectrofotómetro Nicolet Avatar 360 y también en forma de pastilla de bromuro de potasio en un espectrofotómetro Lambda 450 de Perkin Elmer.

### Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de nanopartículas se utilizaron dos sistemas:

- I. Utilizando mezclas ternarias sin tensoactivo
- II. Microemulsiones y nano-emulsiones O/W

#### Sistema I.

El sistema utilizado para la síntesis de nanopartículas fue: Agua/1-Propanol/Aceite de ricino. La síntesis se llevó a cabo utilizando como precursor metálico al nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a distintas concentraciones, como agente reductor se utilizó al extracto de hojas de geranio (GLE) e hidróxido de sodio, las temperaturas probadas fueron 25, 50 y 80 °C.

Las composiciones utilizadas para la síntesis son las siguientes:

**Tabla 2.2. Composiciones de los sistemas utilizados para la síntesis de las AgNPs en las mezclas ternarias libres de tensoactivo.**

<i>Fase acuosa (%P/P)</i>	<i>Aceite (%P/P)</i>	<i>1-Propanol (%P/P)</i>	<b>Sistema</b>
10	40	50	Microemulsión
10	50	40	Microemulsión
15	30	55	Nano-emulsión

20	30	50	Nano-emulsión
----	----	----	---------------

La síntesis consiste en la mezcla de dos sistemas de igual composición pero diferente naturaleza de fase acuosa, es decir, una mezcla que contiene al precursor metálico ( $\text{AgNO}_3$ ) y otra al agente reductor (extracto de hojas de *P. hortorum*). Ambas mezclas son homogenizadas con agitación magnética o vórtex y son puestas en un baño termostatzado.

#### Sistema II

El sistema utilizado fue: Agua/Brij 96V:1,2-hexanodiol (1:1)/Aceite de ricino, la síntesis fue llevada a cabo en sistemas O/W, microemulsiones como nano-emulsiones. Las composiciones utilizadas se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Composiciones utilizadas para la síntesis de nanopartículas de plata en microemulsiones y nanoemulsiones O/W.

<b>Sistema</b>	<b>Fase acuosa (% P/P)</b>	<b>Tensoactivo (% P/P)</b>	<b>Aceite de ricino (% P/P)*</b>
<i>Microemulsión</i>	50	45	5
<i>Microemulsión</i>	60	35	5
<i>Nano-emulsión</i>	70	25	5
<i>Nano-emulsión</i>	80	15	5
<i>Microemulsión</i>	50	40	10

<i>Nano-emulsión</i>	60	30	10
<i>Nano-emulsión</i>	70	20	10
<i>Nano-emulsión</i>	50	35	15
<i>Nano-emulsión</i>	60	25	15
<i>Nano-emulsión</i>	50	30	20

\*La cantidad de aceite de ricino está relacionada con la cantidad de precursor metálico en el sistema.

En cuanto al uso de microemulsiones, los componentes pueden ser añadidos en un solo paso. Sin embargo, la mezcla de: aceite, tensoactivo, co-tensoactivo y precursor metálico se realizó como primer paso para después adicionar el agente reductor (fase acuosa). Una vez adicionado el agente reductor se homogeniza utilizando un vórtex y se pone en un baño a temperatura constante durante 12 horas para garantizar que la reacción haya finalizado. Cuando las nano-emulsiones son utilizadas, se siguen las líneas de dilución de la Fig. 2.1 para alcanzar la composición deseada y especificadas en la Tabla 2.3.

### **Tratamiento estadístico**

Los resultados se reportan como el promedio de los valores obtenidos con al menos tres repeticiones y el valor de la incertidumbre se reporta como el límite de confianza de los datos, utilizando la distribución de la t de Student a un 95% de confianza.

Los perfiles obtenidos para la distribución de tamaños de partícula a partir de las micrográficas electrónicas de barrido, el tamaño resulta del promedio del conteo de

200 partículas y su incertidumbre corresponde a la desviación estándar de la población de datos.



**Capítulo 3**

**R**ESULTADOS  
Y

**D**ISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados relacionados con la caracterización del extracto de hojas de *P. hortorum* el cual es utilizado como agente reductor para la síntesis de nanopartículas, y la caracterización del sistema a emplear como medio de síntesis y el comportamiento físico del mismo. También se abordarán los resultados obtenidos de la síntesis de nanopartículas de plata al utilizar mezclas ternarias libres de tensoactivo y los distintos parámetros que intervienen en la síntesis tales como: la concentración del precursor metálico, pH, temperatura, presencia de otro agente reductor y tiempo óptimo de síntesis.

## **CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE GERANIO.**

El extracto se caracterizó de manera cualitativa, en el primer caso la cantidad de sólidos disueltos fue determinado y en el segundo se evaluó el poder reductor. La cantidad de sólidos disueltos que están presentes al evaporar el agua del extracto fue de  $51.1 \pm 0.4$  mg.

El análisis elemental de los cristales fue obtenido utilizando la espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) mediante un detector ubicado en un equipo de microscopía electrónica de barrido, sin utilizar ningún tipo de recubrimiento orgánico o metálico para tal fin. Las condiciones utilizadas fueron 15 KV a una distancia de 7.8 mm. El análisis EDS de la Figura 3.1 muestra que los cristales están compuestos mayoritariamente por carbono y oxígeno además de potasio, fósforo y magnesio en una menor proporción. Todos los elementos anteriores son debidos a la presencia de moléculas orgánicas en el extracto.

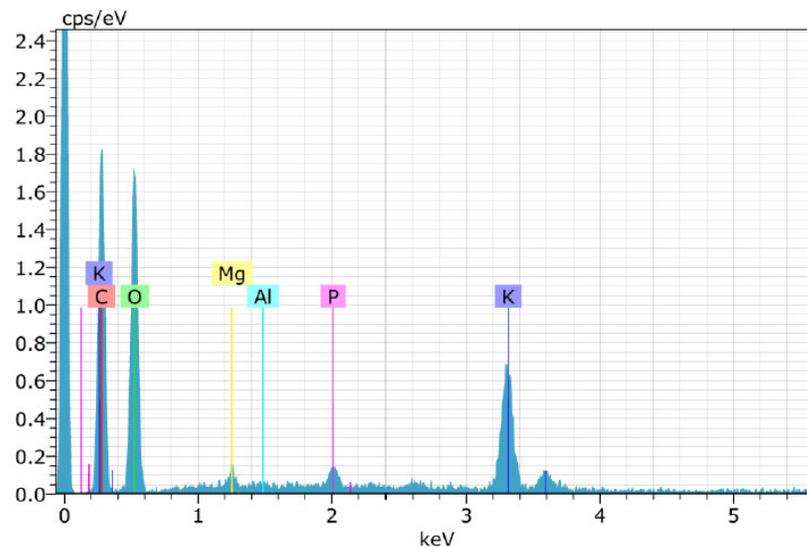


Figura 3.1. Espectro EDS de los cristales obtenidos del extracto acuoso de las hojas de *P. hortorum*.

Por otra parte, la determinación del poder reductor la técnica FRAP fue utilizada, el poder reductor del extracto fue comparado con el mostrado por el ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol. El extracto muestra una actividad reductora equivalente a  $0.38 \pm 0.04$  g de ascorbato por gramo de hoja seca y a  $2.76 \pm 0.25$  g de  $\alpha$ -tocoferol por gramo de hoja seca.

EL análisis de infrarrojo fue utilizado para complementar la caracterización del extracto (Fig. 3.2). El espectro del extracto de hojas de *P. hortorum* muestra un pico en la región de  $600 \text{ cm}^{-1}$  relacionado con haluros de alquilo, en especial de la vibración para el enlace carbono-cloro por la presencia de clorofila clorada también conocida como clorofila-RCl [217]. Las vibraciones de flexión de los enlaces carbono-hidrogeno fuera del plano para alquenos y alquinos presentan picos en la región de  $800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ . El pico observado a  $1036 \text{ cm}^{-1}$  es debido al enlace carbono-hidroxilo de residuos terminales de proteínas presentes en el extracto [218][55]. Distintas señales son observadas en la región de  $1200\text{-}1380 \text{ cm}^{-1}$  atribuidas a la presencia de grupos alcohol, éter, éster y ácido carboxílico. El pico localizado en  $1400 \text{ cm}^{-1}$  es debido a la presencia de vibraciones de estiramiento de enlaces dobles entre carbonos de compuestos aromáticos. El pico a  $1615 \text{ cm}^{-1}$  revela la presencia

de grupo carbonilo de amidas del tipo I relacionados con proteínas [219][220][218][221]. La señal de  $1720\text{ cm}^{-1}$  también es debido a grupos carbonilo. Dos picos localizados en  $2922$  y  $3315\text{ cm}^{-1}$  son atribuidos a las vibraciones de estiramiento de los enlaces N-H de aminas secundarias y O-H unido a ácidos carboxílicos y cadenas poliméricas como polifenoles y flavonoides respectivamente.

En general, se puede afirmar que los componentes que predominan en el extracto son biomoléculas polihidroxiladas como polifenoles y flavonoides, además de la presencia de proteínas al observar señales propias de éstas.

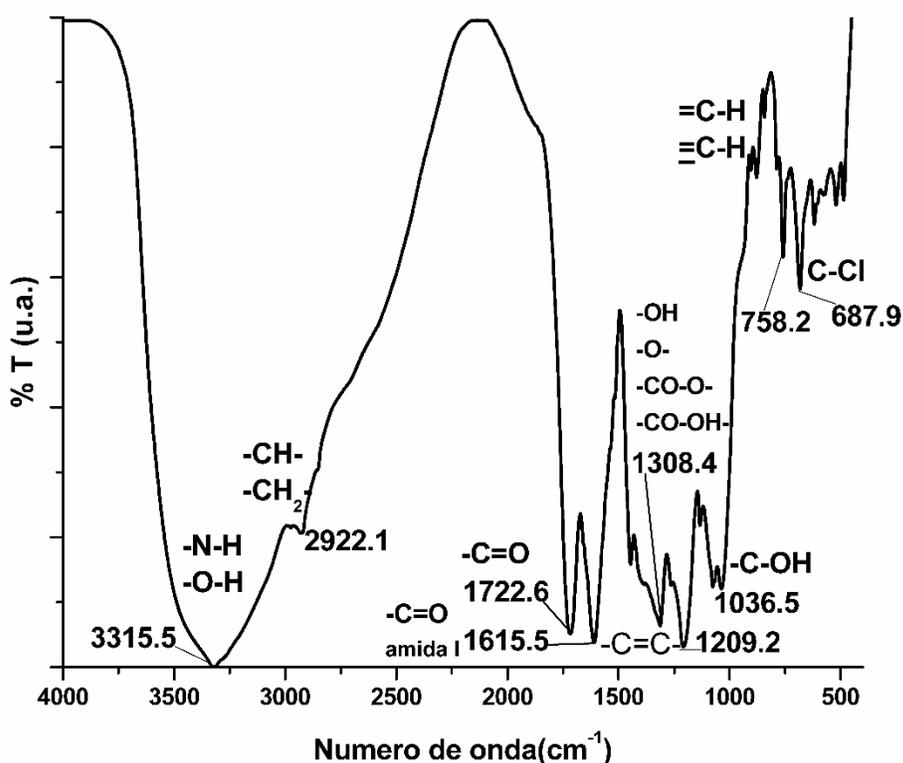


Figura 3.2. Espectro de infrarrojo del extracto de hojas de geranio obtenido mediante la técnica de pastilla de KBr.

## **MEZCLAS TERNARIAS LIBRES DE TENSOACTIVO (MICROEMULSIONES) COMO NANOREACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO EXTRACTO DE HOJAS DE *P. hortorum* COMO REDUCTOR.**

### **Comportamiento fásico.**

Varios alcoholes fueron estudiados como agentes estabilizadores en las mezclas ternarias que se utilizaron como medios de reacción en la síntesis de partículas de plata. Los alcoholes probados fueron el etanol (EtOH), propanol (1-PrOH), isopropanol (i-PrOH), butanol (BuOH) y pentanol (n-PnOH). El comportamiento fásico de las mezclas fue evaluado mediante el uso de diagramas ternarios de fase a una temperatura de 25 °C. El estudio reveló que la formulación que presenta una mayor zona monofásica es aquella en la que se utiliza al propanol (ver Figura 3.3a) como componente estabilizador. En la Fig. 3.3 se presenta el diagrama obtenido para la mezcla agua/1-propanol/aceite de ricino y extracto/1-propanol/aceite de ricino.

El cambio de fase acuosa genera cambios en los límites de fase (Fig. 3.3b). Cuando el extracto es utilizado en lugar del agua, la zona rica en aceite se incrementa, mientras que la zona rica en agua disminuye. Lo anterior probablemente debido a la presencia de saponinas de carácter hidrofóbico en el extracto, que estabilizan de mejor manera las estructuras W/O [53,222]. Por otra parte al introducir al precursor metálico disuelto en la fase acuosa, el diagrama no muestra diferencias, siendo idéntico al estudiado con agua solamente.

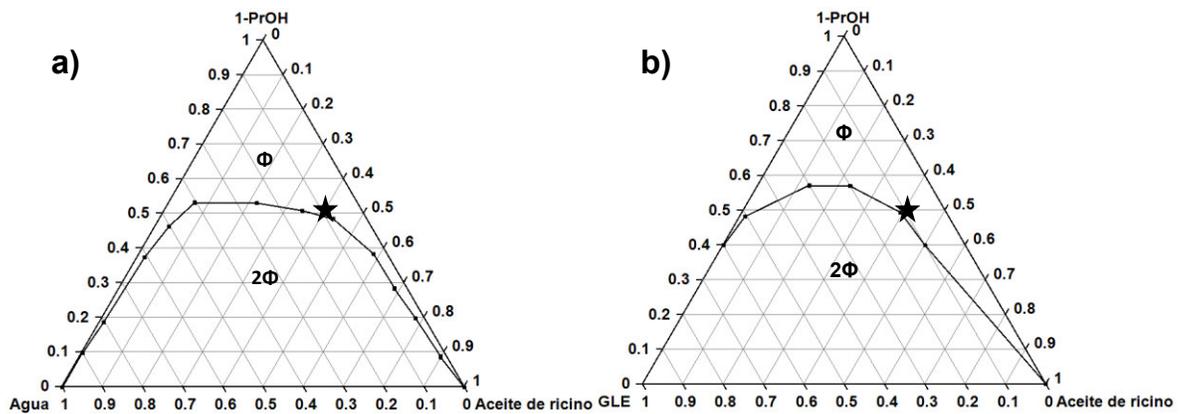


Figura 3.3. Diagrama de fases ternario de los sistemas a)  $H_2O/1-PrOH/Aceite$  de ricino y b) extracto de hojas de *P. hortorum* (GLE)/1-PrOH/Aceite de ricino a  $T=25\pm 1$  °C. La zona superior  $\Phi$  a la línea bimodal corresponde a la zona monofásica o de microemulsión y la inferior a la zona multifásica  $2\Phi$ , (★) es la composición elegida para realizar la síntesis de nanopartículas: Fase acuosa= 10 %P/P, Aceite= 40 %P/P y 1-PrOH= 50 %P/P.

De acuerdo a Horinek y col.[223], en este tipo de sistemas libres de tensoactivo las nanoestructuras o nanogotas son encontradas cerca del límite de fase (línea bimodal). Por lo anterior, la composición que será utilizada para llevar a cabo la síntesis se debe encontrar preferentemente cerca de este límite para aprovechar tales nanoestructuras como plantillas. Así, la composición seleccionada fue: aceite de ricino 40 %, 1-propanol 50 % y fase acuosa 10 %.

### Caracterización estructural.

Medidas de conductividad y del tamaño de gota, se realizaron para poder caracterizar los cambios estructurales que ocurren en el sistema.

La variación del radio hidrodinámico ( $R_h$ ) en función de la cantidad de agua en la mezcla fue determinado mediante DLS (Fig. 3.4), donde la incorporación de agua a la mezcla aceite de ricino + 1-propanol genera cambios en el tamaño de gota registrado. El tamaño se incrementa de manera discreta para contenidos pequeños de agua (menores al 6 %) y conforme la cantidad de agua aumenta el tamaño del  $R_h$  registrado también. Así, a contenidos de agua de hasta un 10 % el tamaño de gota registrado es de  $\approx 25$  nm, sin embargo al sobrepasar este porcentaje el tamaño

se incrementa de manera drástica hasta llegar a los 70 nm con un contenido de agua del 12.5 %. Lo anterior puede deberse a la formación de nano-emulsiones ya que a contenidos mayores al 10 % de agua las mezclas preparadas no son estables, existiendo separación de fases.

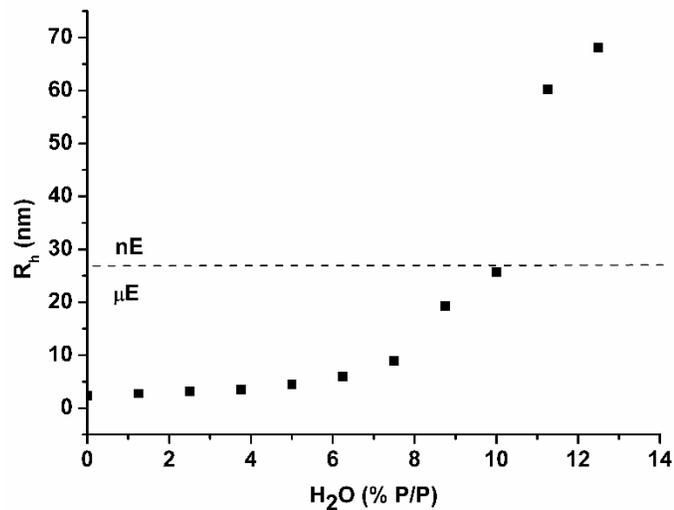


Figura 3.4. Variación del tamaño de gota ( $R_h$ ) respecto al porcentaje en peso de agua adicionada.

### **Conductividad**

La variación de la conductividad en sistemas ternarios como las microemulsiones, habla de cambios estructurales en el sistema. Varios autores señalan que estas microestructuras dependen de varios factores como la cantidad de agua presente en la microemulsión, la temperatura, los solutos disueltos, el tipo de tensoactivo utilizado, etc. [224–226]. Kunz y col. han observado que el comportamiento de éstos sistemas libres de tensoactivo es similar al encontrado en aquellos que se formulan con tensoactivos [227]. En este trabajo encontramos que el sistema compuesto por agua/1-propanol/aceite de ricino muestra diferentes microambientes. La Figura 3.5b muestra la variación de la conductividad en función de la cantidad de agua presente

en el sistema. Los cambios de pendiente en el perfil de conductividad nos sugieren un cambio estructural, así para contenidos de agua entre 5 y 19 % se encuentran estructuras del tipo W/O.

La línea de dilución “a” mostrada en el diagrama de fases de la Figura 3.5a fue utilizada para llevar a cabo las mediciones de conductividad del sistema. La primera zona distinguible se asocia a la conductividad de la mezcla de los tres componentes siendo hasta aquí posiblemente solo una disolución ternaria. Un ligero cambio de pendiente en la curva puede ser debido a la formación de pequeñas gotas dispersas en el medio oleoso, correspondientes a la formación de agregados micelares donde existe una interacción de puente de hidrógeno entre el agua y el 1-propanol (microemulsión del tipo W/O) según los estudios realizados por Smith y col. [228] y Feng y col. [229] en este tipo de sistemas. Por otra parte un pequeño cambio en la pendiente a partir del 11 % de agua en el sistema se atribuye a la formación de nano-emulsiones donde se observa el drástico aumento en el tamaño de las gotas determinado por DLS y corroborando la formación de las mismas. Finalmente la región multifásica ( $2\phi$ ) se encuentra donde la conductividad empieza a decaer drásticamente (contenido de agua >19 %) ya que los componentes empiezan a separarse.

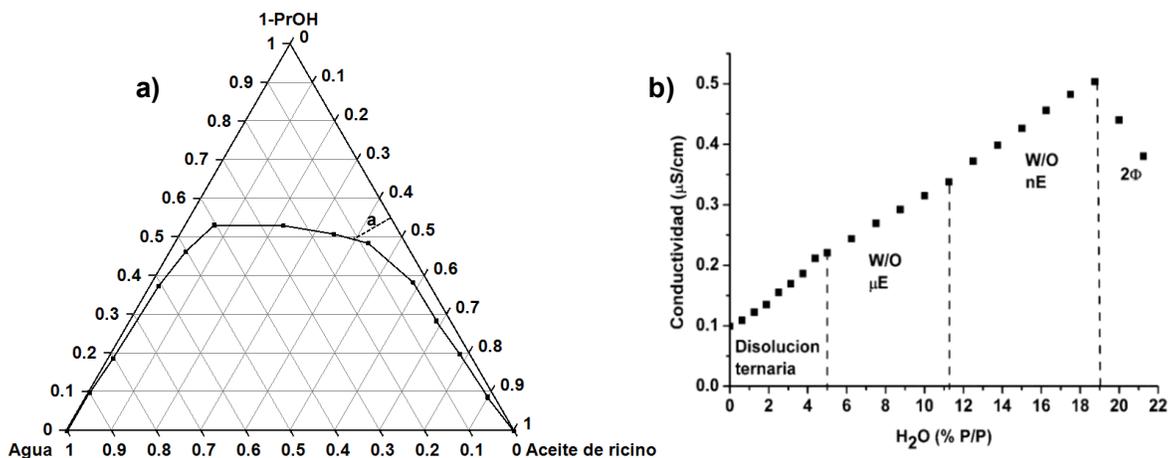


Figura 3.5. a) Diagrama ternario de fases del sistema, la letra “a” denota la línea de dilución seguida para llevar a cabo la medición de la conductividad y b) perfil de conductividad del sistema.

### Síntesis de nanopartículas de plata.

La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo utilizando una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  mol  $L^{-1}$  de nitrato de plata. Durante la síntesis existe un cambio de coloración, pasando de un amarillo ligero debido al extracto (Fig. 3.6 a) a un café-rojizo propio de las nanopartículas de plata [230]. La dispersión de nanopartículas se centrifugó para separarla de la microemulsión, el precipitado es lavado y re-suspendido en agua. El espectro de UV-vis muestra la presencia de partículas de plata al observarse el plasmón de resonancia característico de la plata a una longitud de onda de 465 nm [231][232] (Fig. 3.6).

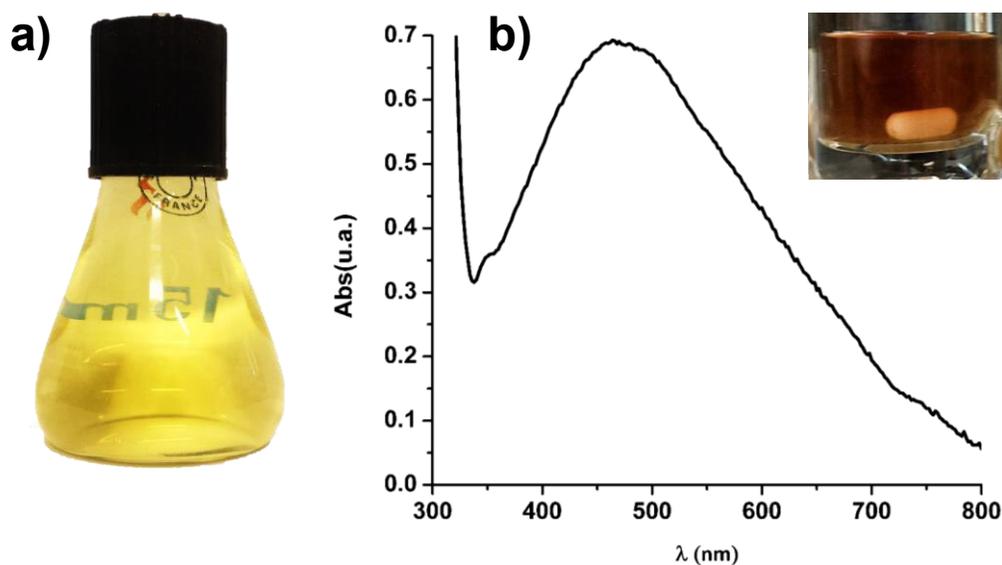


Figura 3.6. Imagen del extracto (a) y espectro UV-vis de las nanopartículas de plata obtenidas y apariencia de las nanopartículas en el medio de reacción (b).

### Caracterización

En la Figura 3.7 se muestra la distribución de tamaños obtenido mediante DLS para las nanopartículas una vez lavadas y re-suspendidas en agua. Se puede observar como se trata de una población polidispersa con un tamaño promedio de  $99.9 \pm 27.2$  nm e índice de polidispersidad de 0.65, el cual indica una baja estabilidad coloidal.

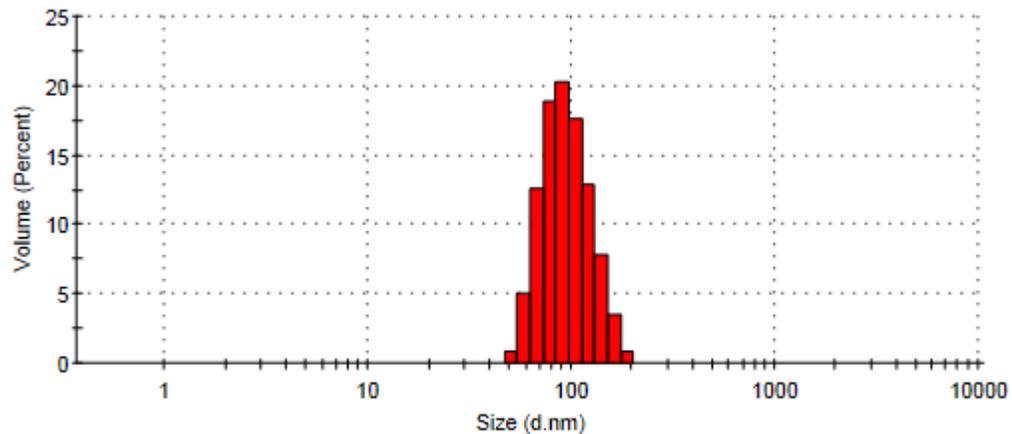


Figura 3.7. Distribución de tamaño de las nanopartículas sintetizadas en el sistema  $[Ag^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  /1-PrOH/Aceite de Ricino utilizando extracto acuoso de hojas de geranio como reductor. Tamaño promedio  $99.9 \pm 27.2 \text{ nm}$ .

Las micrográficas electrónicas de barrido (Fig. 3.8) corroboran lo observado en los análisis de DLS, ya que se encontraron varios tamaños de partícula y aglomerados en un material tipo “gelatina”. La aglomeración de las partículas es posiblemente debido al biomaterial presente en el extracto de *P. hortorum* el cual las ha embebido. El biomaterial se observa aún después de haberse realizado varios lavados con varios disolventes (acetona, etanol y agua), esto ha sido observado por demás autores al realizar síntesis de nanopartículas de oro y plata con extractos de diferentes especies de geranio [74][55] y plantas en general [233]; Mirończyk y col. [75] sugieren que el material que cubre las nanopartículas puede tratarse de flavonoides y proteínas presentes en el extracto.

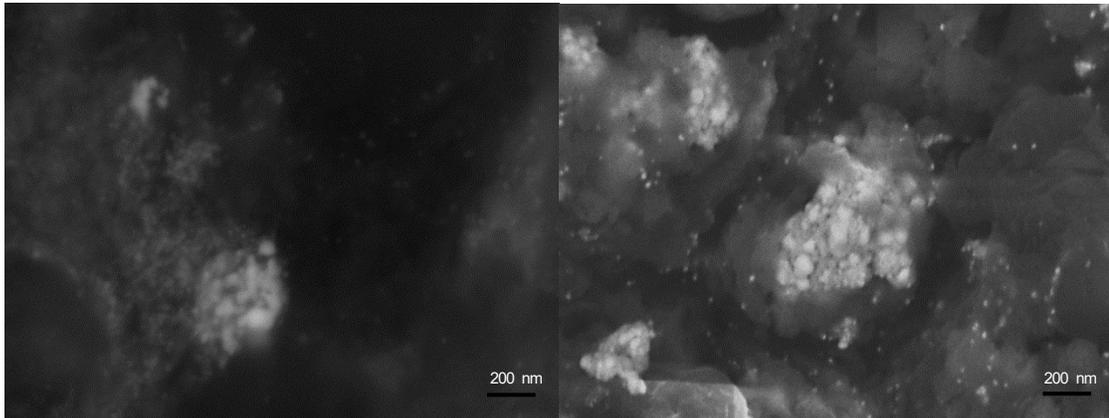


Figura 3.8. Micrografías electrónicas de barrido de las partículas de plata sintetizadas, rodeadas del biomaterial del extracto de *P. horticola*.

El análisis elemental realizado mediante EDS (Fig. 3.9) muestra señales que corresponden a la plata, señal a 3 keV [234] y C y O debidas al material orgánico el cual rodea a estas partículas.

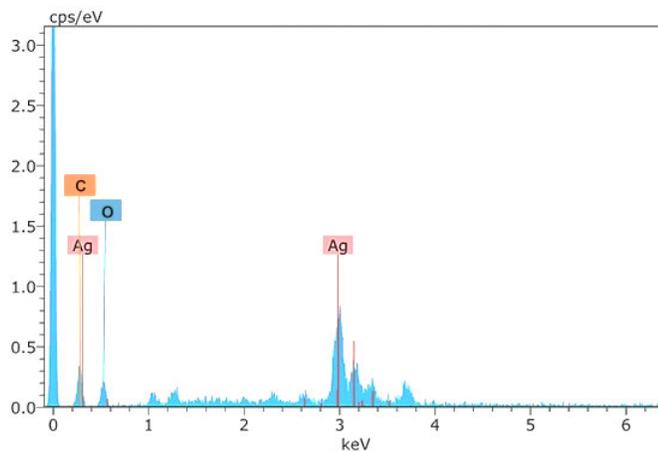


Figura 3.9. Espectro EDS de las partículas de plata obtenidas con el extracto de hojas de *P. horticola*.

Por otra parte el espectro FTIR obtenido de las partículas muestra las señales de los grupos funcionales sobre la superficie (Fig. 3.10). Es de notar que las señales que se modifican son aquellas correspondientes a los grupos hidroxilo ( $3200-3650\text{ cm}^{-1}$ ) por lo que se puede inferir que algún tipo de alcohol(es) o derivado(s) (polifenoles, flavonoides, etc.) están participando activamente en la reducción de los

iones metálicos y a su vez siendo adsorbidos sobre la superficie metálica fungiendo como agente estabilizante. Así también, la señal debida a carbonilos ( $600\text{ cm}^{-1}$ ) disminuye en intensidad. Polifenoles y flavonoides han sido asociados a la reducción de los iones metálicos al usar extracto de hojas de geranio [74][55].

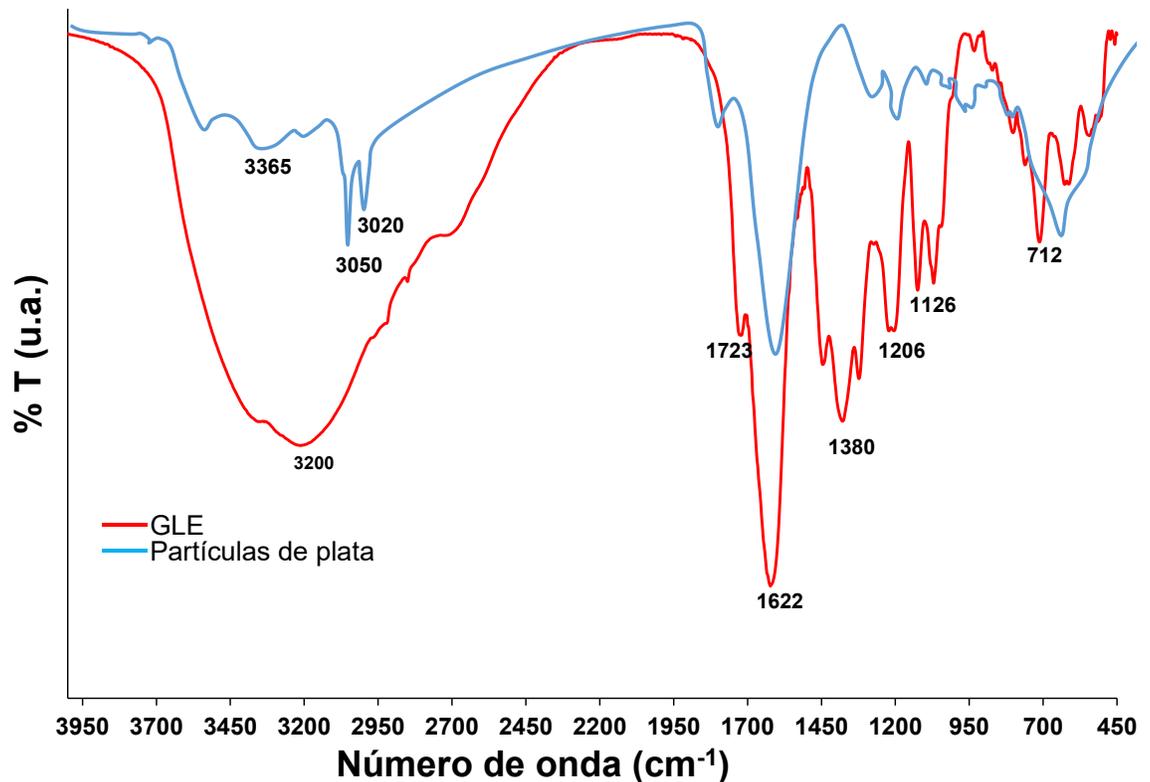
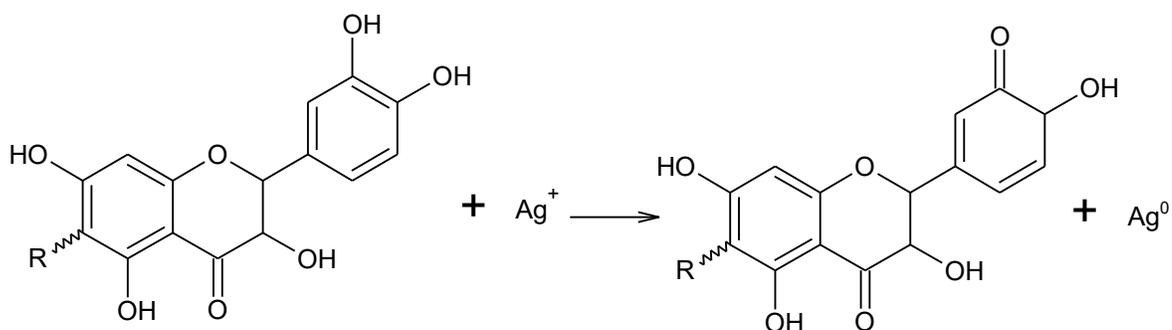


Figura 3.10. Espectros FTIR de las partículas de plata (azul) y del extracto de hojas de geranio (GLE; rojo).

Debido a lo anterior una posible reacción por la cual se lleva a cabo la formación de las partículas de plata es:



En la cual una unidad de flavonoide (polihidroxicoompuestos) reacciona con el ion plata para reducirlo a plata metálica y el grupo hidroxilo donador de electrones se oxida a carbonilo (enol-ceto).

Por otra parte el rendimiento de la reacción se trató de realizar mediante el seguimiento de la concentración de plata en disolución por espectrometría de absorción atómica de flama. El efecto de la matriz es importante en estas determinaciones por lo que usualmente se utiliza la adición de estándar para minimizarlo [235]. Sin embargo, no fue posible obtener lecturas confiables. La concentración de partida fue de  $58.06 \text{ mg L}^{-1}$  de  $Ag^+$  (equivalente a una concentración de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) y la concentración obtenida para un tiempo de reacción de 15 minutos fue de  $0.12 \text{ mg mL}^{-1}$  de  $Ag^+$ . Lo anterior indicaría que a los 15 minutos casi toda la plata se ha agotado o reducido en forma de partícula, sin tomar en cuenta que se adicionó estándar de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  para obtener lecturas cercanas a la mitad de la curva de calibración. Debido a lo anterior no fue posible determinar el rendimiento de la reacción.

En la Figura 3.11 se muestra la curva de calibración obtenida así como las lecturas a los distintos tiempos medidos.

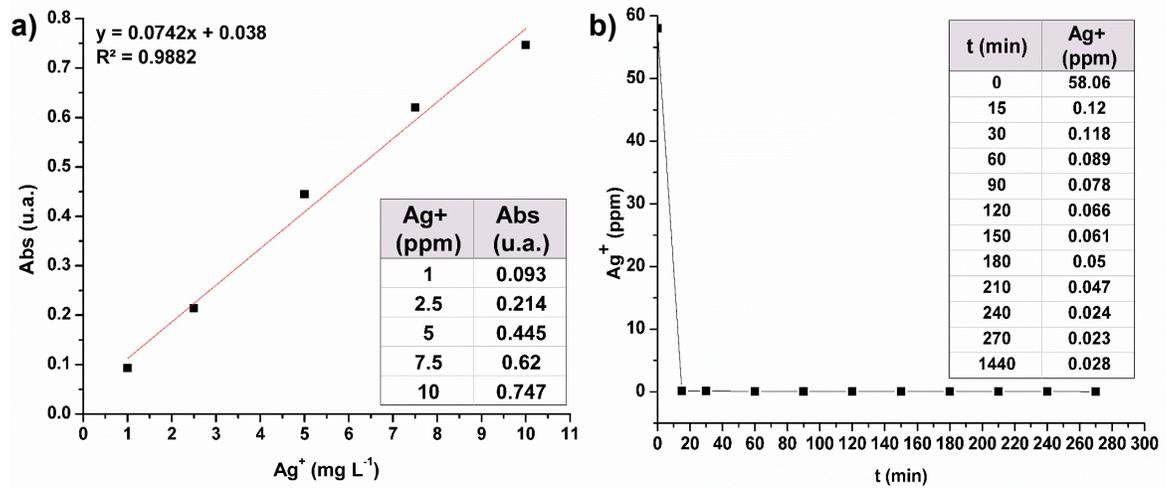


Figura 3.11. a) Curva de calibración y b) perfiles de concentración obtenidos mediante espectrometría de absorción atómica de flama para la determinación de  $Ag^+$  en disolución.

## Influencia de la concentración de plata y cinética de reacción.

La evolución de la formación y crecimiento de las partículas de plata utilizando distintas concentraciones de precursor metálico fue monitoreado por el cambio observado en su espectro de absorción UV-vis (Fig. 3.12a). La Figura 3.12 muestra la variación de la absorbancia en el espectro para una concentración de plata de  $0.2\ mol\ L^{-1}$  de  $AgNO_3$ . Un pico de absorción característico es observado cerca de 455 nm. Se puede apreciar (Fig. 3.12b) como la absorbancia incrementa rápidamente hasta un tiempo de 120 minutos, indicando la formación de nanopartículas de plata; y después de este tiempo los cambios no son significativos debido a que todas las partículas fueron formadas. Sin embargo, un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores es detectado debido al crecimiento de las partículas formadas [236][237].

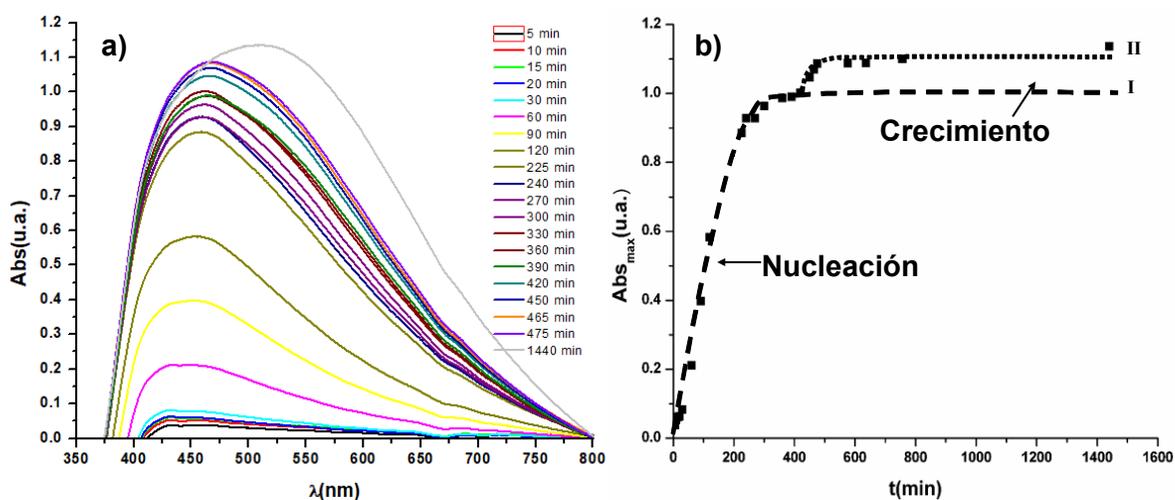


Figura 3.12. a) Evolución de la absorbancia máxima durante la formación de las partículas de plata utilizando una concentración de  $AgNO_3 = 0.2 \text{ mol L}^{-1}$  y b) variación de la absorbancia máxima en función del tiempo.

El proceso de crecimiento para las concentraciones altas probadas en este trabajo, las cuales son  $10 \times 10^{-3}$ , 0.1 y  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  presentan dos etapas como se observa en la figura anterior. De acuerdo a lo observado se puede inferir que en la etapa de crecimiento un efecto de autocatálisis y reducción de los iones  $Ag^+$  sobre la superficie de las partículas ya formadas se lleva a cabo. Esta etapa de autocatálisis se da debido al agotamiento del agente reductor y a la presencia de nanopartículas y iones plata sobre su superficie sin reducir. Este tipo de cinéticas que involucran dos pasos han sido observadas por distintos autores y han sido atribuidas a procesos de crecimiento de las partículas por el efecto de la autocatálisis [229] [230] [231]; por lo tanto el mecanismo posiblemente es similar. En la Figura 3.13 se ilustran las dos etapas involucradas en este tipo de mecanismo.

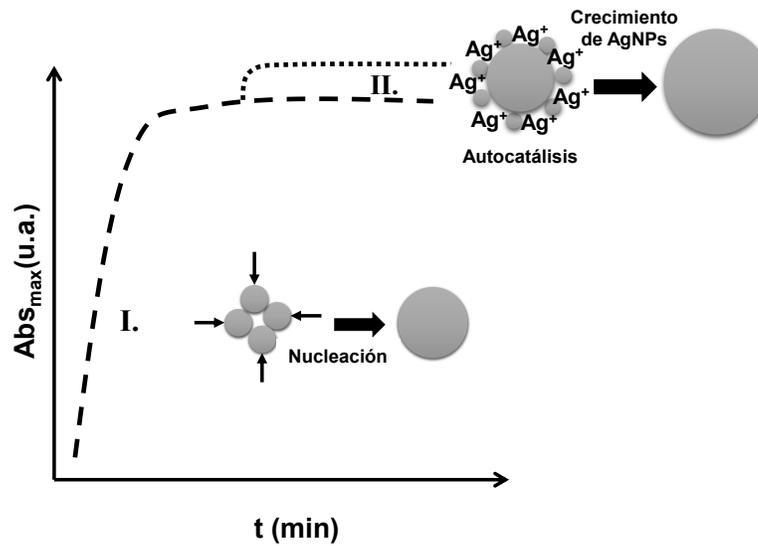


Figura 3.13. Pasos involucrados durante la formación de las nanopartículas, de acuerdo a la forma de la gráfica de la cinética obtenida.

Por otra parte al utilizar concentraciones bajas  $1 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> dos procesos bien definidos se presentan, asociados con la nucleación y crecimiento de las partículas (Fig. 3.14). Este comportamiento es similar al propuesto por Lamer y Dinegar [238] quienes estudiaron la variación de la concentración del soluto en función del tiempo. La nucleación implica un aumento en el número de centros de dispersión (número de partículas) para un sistema dado, y por lo tanto da un aumento en la intensidad de dispersión. En contraste, el crecimiento de las partículas es asociado con el decremento en la intensidad de dispersión debido a que la ventana de observación corresponde a la difracción de las partículas pequeñas que desaparecen durante el proceso de crecimiento o la disolución de núcleos inestables. Por lo anterior el mecanismo propuesto de dos pasos es consistente con aquellos que plantean la reducción de los iones Ag<sup>+</sup> y la asociación de los átomos de Ag<sup>0</sup> para producir partículas metálicas como proponen varios autores [239][240][241].

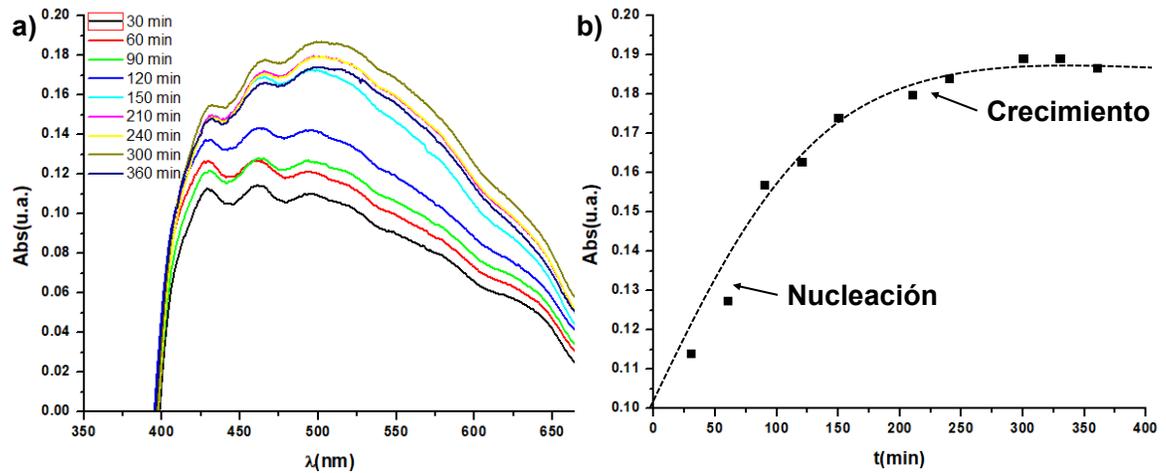


Figura 3.14. a) Evolución de la absorbancia máxima durante la formación de las partículas de plata utilizando una concentración de  $\text{AgNO}_3 = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  y b) variación de la absorbancia máxima en función del tiempo.

## Influencia de la variación del pH en la síntesis de nanopartículas de plata.

A pesar de los arduos esfuerzos de la comunidad científica y los avances en el campo de la nanotecnología aún no hay una explicación clara sobre la química involucrada en la naturaleza multifuncional de los extractos durante la síntesis de nanopartículas estables [242].

Debido a lo anterior, pocos reportes son los que proponen que especies participan en la reducción de los iones metálicos. Sin embargo, el mecanismo de conversión del grupo enol (C-OH) a cetona (C=O) en flavonoides es el más común y juega un papel importante en la reducción de los iones metálicos [243].

Los principales componentes identificados en el extracto de *P. horticola* son flavonoides y terpenoides como el geraniol [73][234][244], estas especies son reductoras durante la síntesis de nanopartículas de plata [245]. La eficacia

antioxidante de los flavonoides se ha relacionado con la cantidad de grupos hidroxilo en la molécula, y también con su capacidad de donación de electrones [246].

La quercetina es un flavonoide presente en una gran variedad de plantas que presenta propiedades ácido-base. Esta molécula tiene dos valores de pKa, 7.47 y 8.64 [247], en la Figura 3.15 se ilustra la estructura de la quercetina y sus formas desprotonadas.

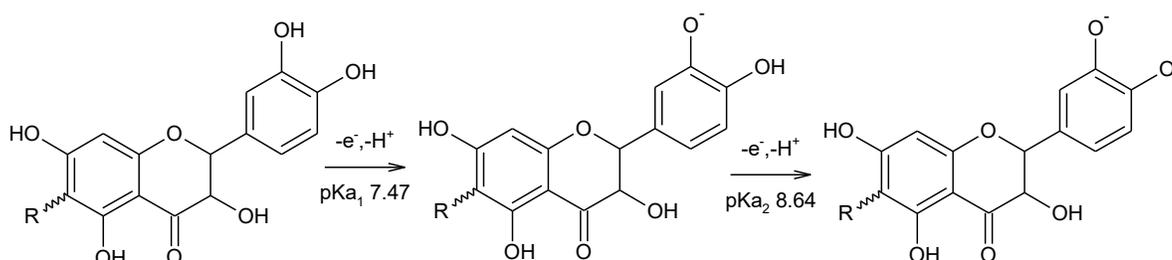


Figura 3.15. Desprotonación del grupo catecol del flavonoide quercetina, R: cualquier otra unidad.

El aumento del pH propicia la desprotonación de los hidroxilos más ácidos del compuesto. Así, la influencia de la desprotonación del grupo catecol se relaciona con la capacidad de donación de electrones/protones y por lo tanto en su actividad antioxidante [248]. A su vez se ha demostrado que a pH alto (pH 8) la materia orgánica como ácidos húmicos y fúlvicos presentan mayor afinidad para enlazarse con la plata [249]. Lo anterior ya que al aumentar el pH aumentan los sitios a los que se puede unir la plata debido a una baja disponibilidad de protones, que son los que suelen ocupar estos sitios.

Un caso similar podría estar pasando en nuestro sistema, ya que se observa un decremento en el tamaño de las partículas al incrementar el pH del extracto, además de que la quercetina presenta un potencial de reducción de 0.39V [250] con el cual la formación de plata metálica puede llevarse a cabo.

El extracto acuoso de hojas de *P. hortorum* se ajustó a pH 7 y 8, y fue probado en la síntesis de las partículas utilizando una concentración de plata de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Los resultados se muestran en la Tabla 3.2 y Figura 3.16.

Tabla 3.1. Variación del tamaño de partícula en función del pH del extracto de *P. hortorum*.

<i>pH</i>	<i>Tamaño (nm)</i>
pH sin ajustar (≈5.7)	99.1±27.2
7	30.4±3.6
8	10.7±0.8

El cambio en el pH del extracto produce variaciones en el tamaño final de la partícula obtenida, así, se tiene un tamaño de 10 nm al modificar el pH a 8 (Tabla 3.2).

En el espectro UV-vis (Figura 3.16) se observa que para pH 7 y 5.4 la RPS se localiza a una longitud de onda de 430 nm, mientras que para pH 8 se localiza a 444.5 nm. La forma e intensidad de la banda del plasmón depende del tamaño y morfología de las nanopartículas, el ambiente dieléctrico y el índice de refracción del medio en el que se encuentran [251] [252].

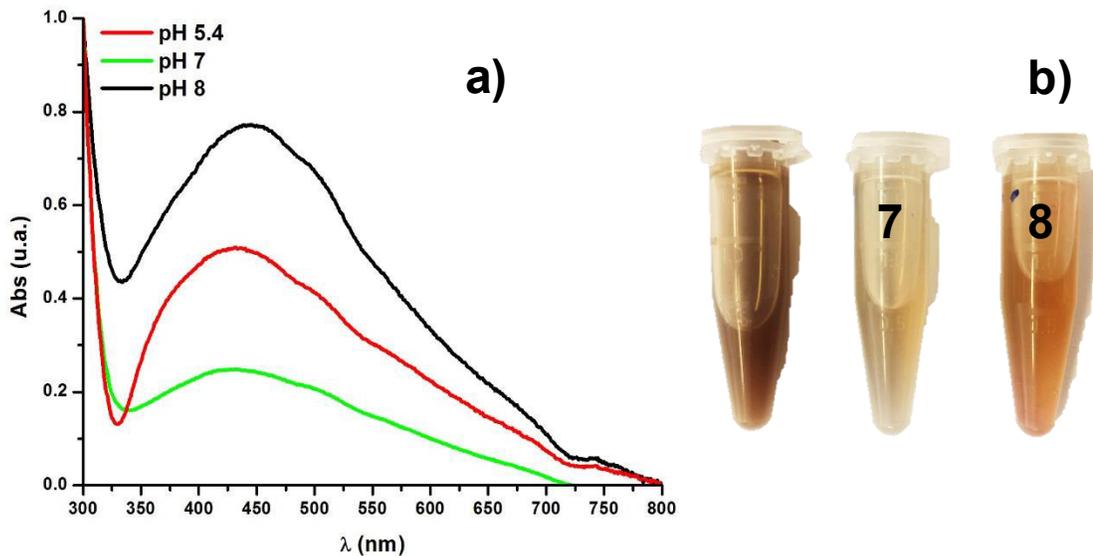


Figura 3.16. a) Espectro UV-vis de las nanopartículas obtenidas con el extracto acuoso de hojas de geranio a distintos pH e b) imágenes de los coloides. pH:5.4, 7 y 8; T=25 °C.

El aumento en el pH del extracto parece favorecer el intercambio de electrones facilitando la reacción redox. Por otro lado a pH ácido y neutro el intercambio de electrones se ve más impedido ya que las moléculas con acción antioxidante podrían encontrarse protonados o semiprotonados, disminuyendo el poder antioxidante del extracto.

Aunado a lo anterior el espectro de la Figura 3.16a, muestra una mayor absorbancia para las nanopartículas sintetizadas a pH 8 debido al tamaño y a la presencia de una mayor cantidad de éstas y lo contrario para pH 7 [253]. El color café-rojizo de los coloides puede observarse en la Fig. 3.16b.

### Conclusiones

Las caracterizaciones realizadas al extracto de hojas de *P. hortorum* revela que diversas biomoléculas están presentes, tales como polifenoles, flavonoides y proteínas. Además de presentar un poder reductor equivalente a  $0.38 \pm 0.04$  gramos de ascorbato por gramo de hoja seca y a  $2.76 \pm 0.25$  gramos de  $\alpha$ -tocoferol por gramo de hoja seca.

La caracterización del sistema muestra que estructuras de microemulsión y nanoemulsión del tipo W/O son formadas.

La concentración del precursor metálico ( $\text{AgNO}_3$ ) juega un papel importante ya que al incrementarse a valores mayores de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  el mecanismo de formación de las nanopartículas involucra dos pasos de crecimiento.

Por otra parte el pH del extracto afecta el tamaño de las partículas de plata. Al aumentar el pH a 8 el tamaño de las nanopartículas disminuye drásticamente, obteniendo valores de  $10.7 \pm 0.8 \text{ nm}$ .

## **MEZCLAS TERNARIAS LIBRES DE TENSOACTIVO (MICROEMULSIONES) COMO NANOREACTORES PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO HIDRÓXIDO DE SODIO Y EXTRACTO DE HOJAS DE *P. hortorum* COMO REDUCTORES.**

Antes de empezar con este apartado cabe recalcar que en esta sección experimental se utilizan dos diferentes tipos de reductores para la obtención de partículas de plata. Uno proveniente de la reacción de saponificación del aceite al mezclarlo con el hidróxido de sodio, es decir los ácidos grasos a los cuales nos referiremos como reductor NaOH. Y utilizando el reductor NaOH en combinación con el GLE, que es el extracto de las hojas de geranio, el cual fue denominado GLE, pero únicamente para esta parte del capítulo en donde no se utiliza tensoactivo. Las composiciones de los sistemas están definidas en la sección experimental.

A continuación se discuten los resultados obtenidos.

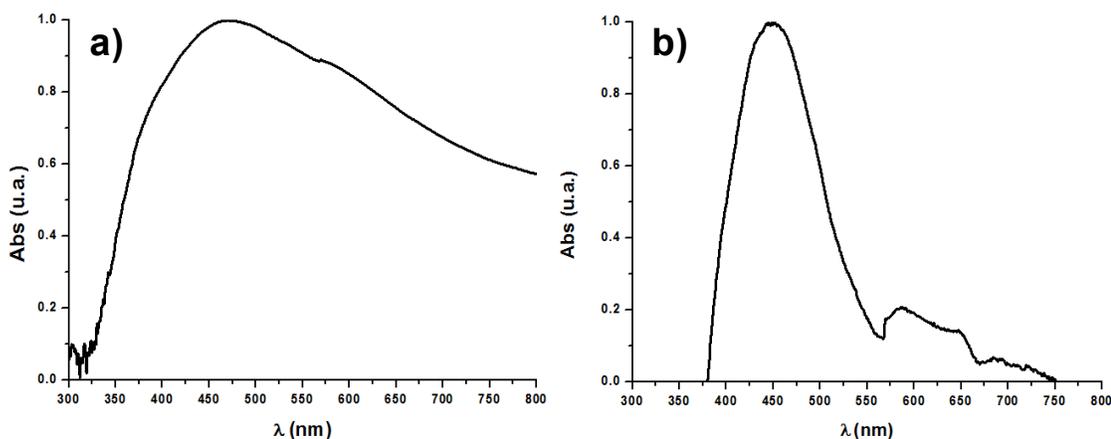
### **Efecto de la temperatura**

De acuerdo a varios autores, la presencia de hidróxido de sodio durante la síntesis de nanopartículas de plata hace más eficaz el proceso debido a la presencia de la especie  $\text{Ag}_2\text{O}$ , la cual cataliza la reducción de los iones metálicos. Da Silva y col. [254] han encontrado que el uso de aceite de ricino en conjunto con hidróxido de sodio a una concentración de  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  para la síntesis de nanopartículas de oro es un método eficaz para su obtención.

De acuerdo a lo anterior se decidió probar en el presente trabajo la influencia que presenta la adición de hidróxido de sodio en el sistema, así como el efecto de la temperatura. La síntesis se realizó a dos distintas temperaturas  $25$  y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , los resultados arrojan que a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  se favorece la formación de nanopartículas.

En la Figura 3.17 se muestra el espectro de las partículas obtenidas a 25 y 80 °C utilizando una concentración de plata de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  y  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sodio. Puede observarse claramente una diferencia entre ambas temperaturas. Al llevar a cabo la síntesis a 25 °C bandas muy anchas son obtenidas debido a la presencia de una población de partículas polidispersas [255]. Por otra parte a 80 °C las bandas obtenidas son más definidas debido a la presencia de una población menos polidispersa. Por lo anterior la temperatura de trabajo óptima, para las condiciones probadas se determinó en 80 °C.

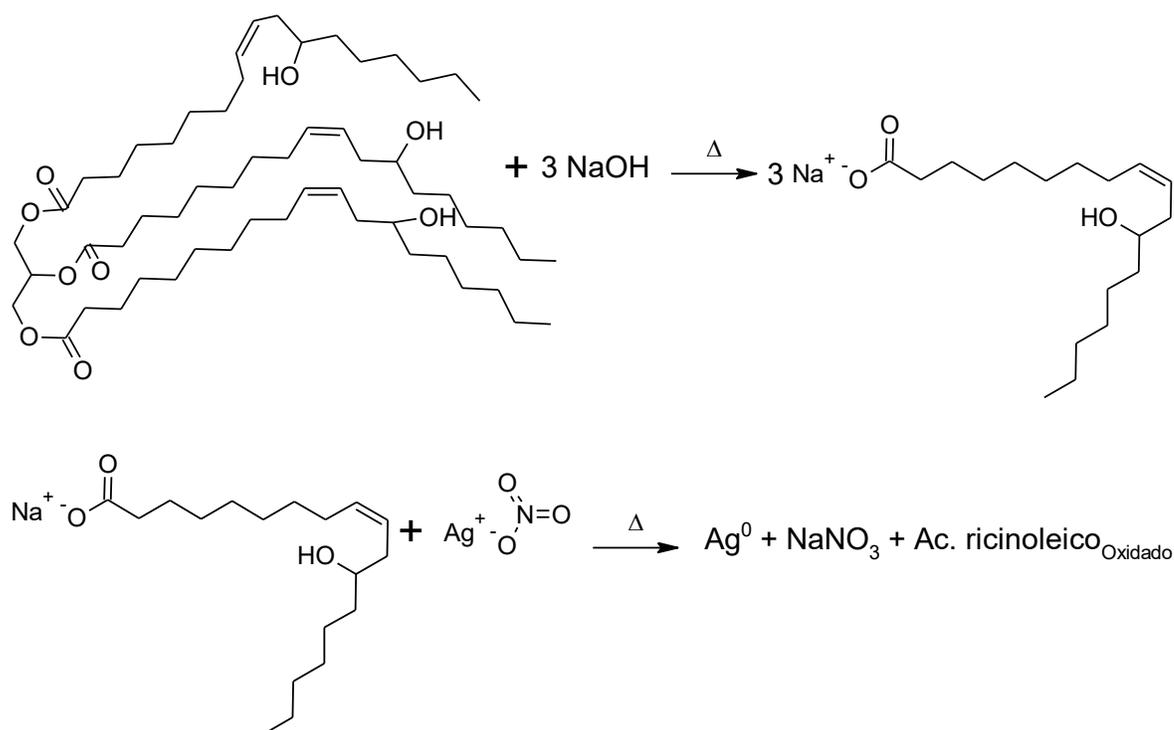
La caracterización del tamaño de partícula mediante DLS no pudo ser realizada para las partículas sintetizadas a 25 °C (Figura 3.17a). La presencia de partículas grandes que ocasionan una gran dispersión de luz [256] provoca que el análisis no sea fiable aún cuando se lleva a cabo la filtración de la muestra por una membrana con tamaño de poro de  $0.25 \mu\text{m}$ . El tamaño determinado para la nanopartículas sintetizadas a 80 °C (Fig. 3.14b) fue de  $45.1 \pm 3.6 \text{ nm}$ .



**Figura 3.17.** Espectros UV-vis de las nanopartículas sintetizadas a a) 25 °C y b) 80 °C, por acción reductora de la mezcla de hidróxido de sodio ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) y aceite de ricino.  $[\text{Ag}^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

La gran diferencia observada al comparar ambos espectros es debido a que a 80 °C se favorece la reacción de saponificación del aceite debido al hidróxido

adicionado, es decir, la formación de ácidos grasos que fungen como reductores y posiblemente el o los productos de oxidación estabilicen las partículas formadas. Otros autores han reportado el uso de ácidos grasos [257] y glicerol [258] como estabilizantes de nanopartículas de plata. Cabe mencionar que la cantidad de sosa adicionada no es suficiente para saponificar totalmente la cantidad de aceite presente en la mezcla, por lo que existe una mezcla de ácidos grasos, glicerina y el triglicérido.



Las imágenes obtenidas por la técnica de Cytoviva (Fig. 3.18) muestran la presencia de aglomerados y partículas grandes en la muestra sintetizada a 25 °C. Por otra parte al cambiar la temperatura hasta 80 °C la presencia de nanopartículas es evidente al observarse principalmente colores azules.

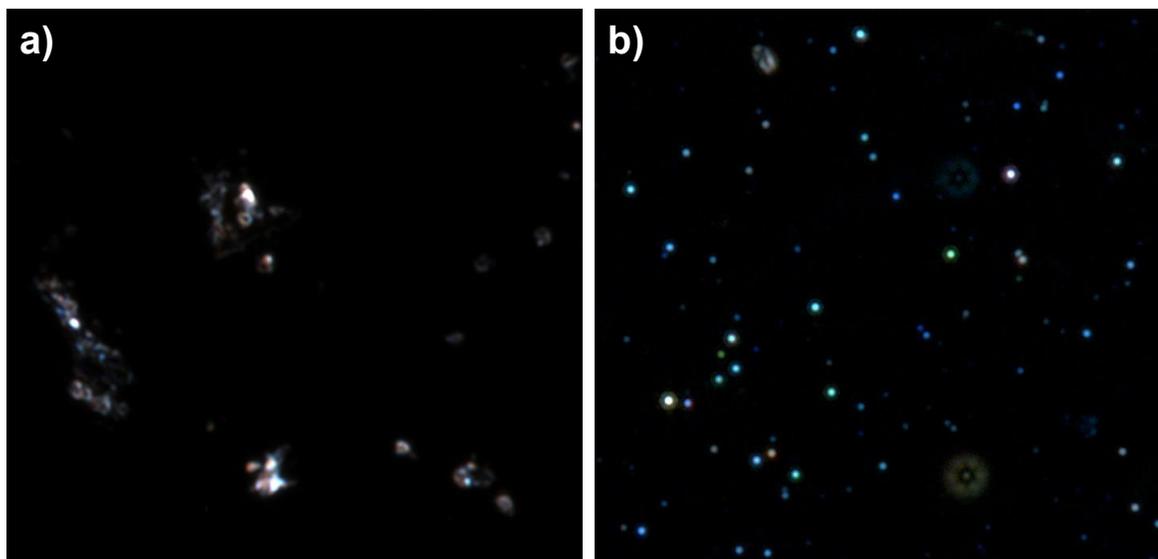


Figura 3.18. Imágenes obtenidas con el microscopio Cytoviva (100X) de las partículas sintetizadas a a) 25 °C y b) 80 °C, utilizando al aceite de ricino como reductor.

### Efecto de la concentración.

En la Figura 3.19 se muestran los espectros de las partículas sintetizadas utilizando varias concentraciones de precursor metálico desde  $1 \times 10^{-3}$  hasta  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, utilizando una concentración de sosa de 0.1 mol L<sup>-1</sup> y una temperatura de 80 °C.

El plasmón no varía en posición (450 nm) al incrementar la concentración hasta  $3.5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> lo que indica que no hay variación significativa en el tamaño y forma de las nanopartículas [259]. Sin embargo, para una concentración de plata de  $5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> las partículas formadas son tan grandes que no se pueden medir en DLS.

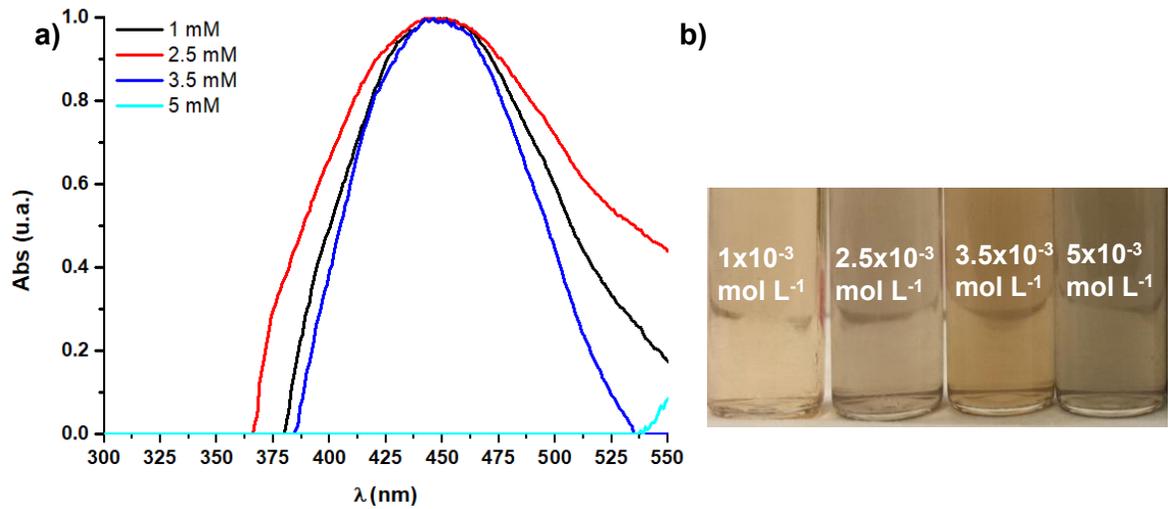


Figura 3.19.a) Espectros UV-vis y b) apariencia física de los coloides obtenidos de las partículas sintetizadas a distintas concentraciones ( $1\text{-}5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  y con  $[\text{NaOH}] = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .

El tamaño de partícula obtenido por DLS se muestra en la tabla 3.3, comprobando que efectivamente el tamaño no varía entre las distintas concentraciones utilizadas.

Tabla 3.2. Tamaños de partícula para las distintas concentraciones de plata probadas.

$[\text{Ag}^+] \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$R_h \text{ (nm)}$
$1 \times 10^{-3}$	$45.1 \pm 3.6$
$2.5 \times 10^{-3}$	$58.9 \pm 4.4$
$3.5 \times 10^{-3}$	$44.9 \pm 4.8$
$5 \times 10^{-3}$	*

\*No se puede medir con DLS.

En las fotografías obtenidas por el microscopio Cytoviva (Fig. 3.20), se puede observar claramente el efecto de la concentración de plata durante la síntesis. Los colores que presentan las partículas son similares, por lo tanto los tamaños también lo son como se vio anteriormente. En cuanto a las partículas obtenidas a una

concentración de  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  se puede ver que son muy brillantes lo que significa presencia de partículas grandes.

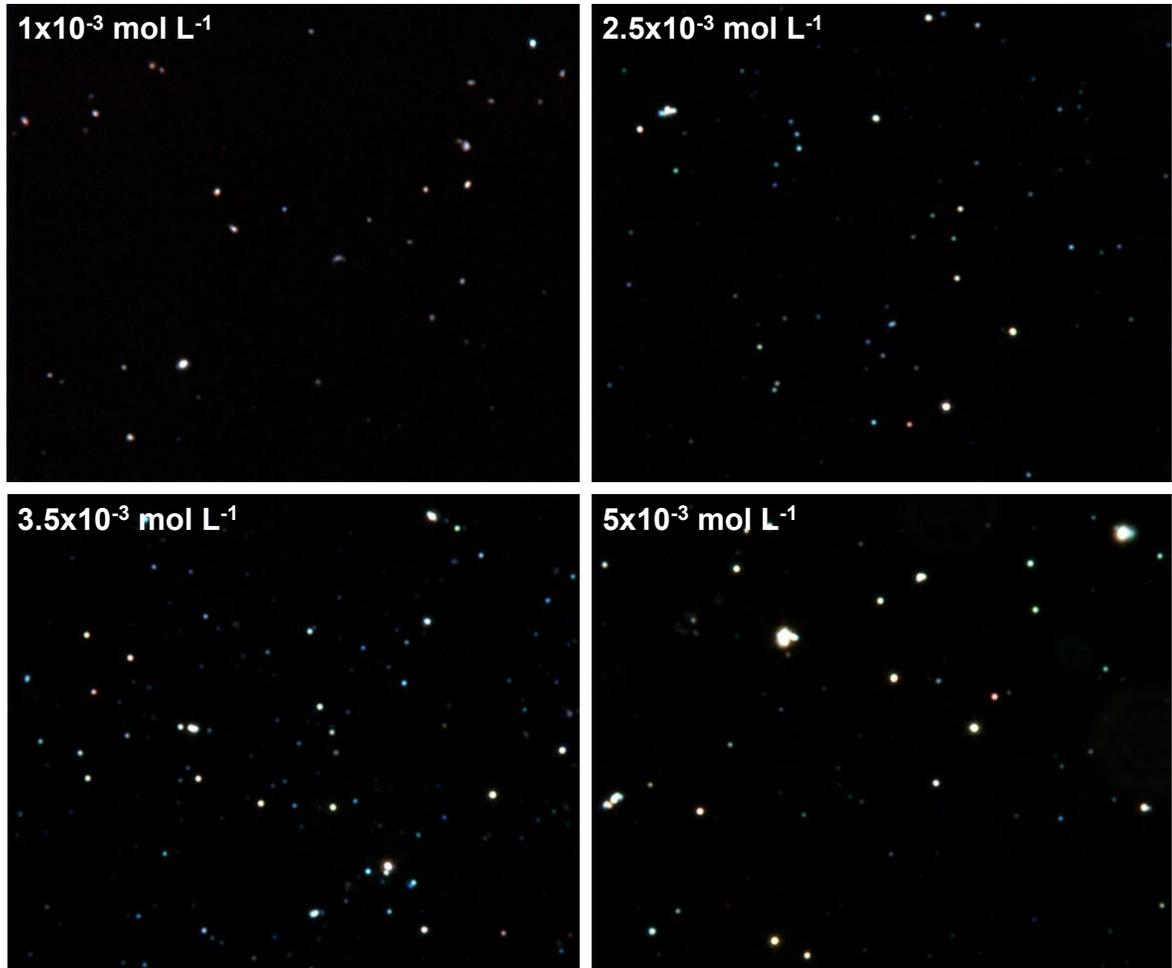


Figura 3.20. Imágenes de las partículas obtenidas con el microscopio Cytoviva (100X) al utilizar diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ .

### Variación de la concentración de hidróxido de sodio.

En el espectro UV-vis de la Figura 3.21 se aprecia el efecto que tiene la concentración del hidróxido de sodio en la obtención de partículas cuando la concentración de plata es de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . A partir de una concentración de sosa

de  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  los cambios en el espectro obtenido son prácticamente nulos y existe un ligero desplazamiento a longitudes de onda mayores del plasmón.

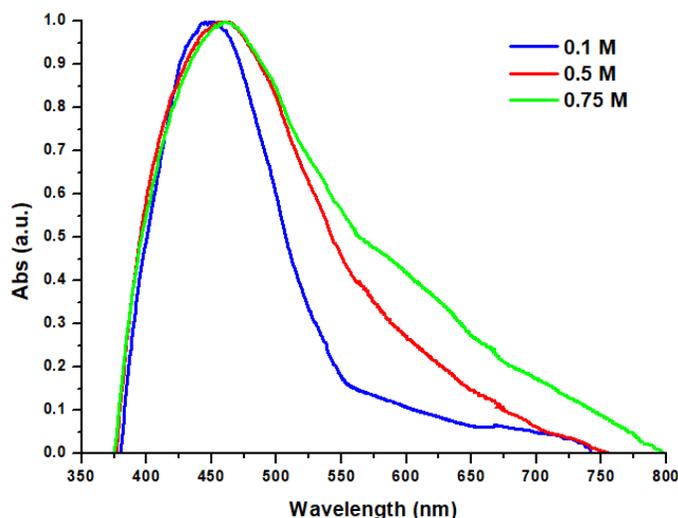


Figura 3.21. Espectro UV-vis de las AgNPs obtenidas a una  $[\text{Ag}^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $T = 80^\circ\text{C}$  y  $[\text{NaOH}] = 0.1, 0.5$  y  $0.75 \text{ mol L}^{-1}$ .

Las mediciones de DLS (ver Tabla 3.3) nos muestran, que a pesar de no haber un desplazamiento significativo en el máximo de absorción del espectro UV-vis de las muestras, el tamaño y polidispersidad de las mismas aumenta al incrementarse la concentración de hidróxido de sodio.

Por otra parte, las microscopías electrónicas muestran la medida real de las nanopartículas. Se observa una tendencia contraria a la observada con los tamaños obtenidos mediante DLS, es decir, al utilizar la mayor concentración de hidróxido de sodio el tamaño obtenido es menor y viceversa.

Las lecturas de DLS son gobernadas por la dispersión de la luz, es por ello que en las partículas obtenidas con una concentración de hidróxido de sodio de  $0.75 \text{ mol L}^{-1}$  el tamaño registrado es mayor y dista del valor real obtenido con las micrografías. Es decir, la señal de las nanopartículas pequeñas se ve opacada por la dispersión de luz ocasionada por las más grandes.

En la Figura 3.22 se muestran las micrográficas electrónicas de barrido de las nanopartículas obtenidas con las distintas concentraciones de hidróxido de sodio, así como el perfil de distribución obtenido después del conteo de 200 partículas en las micrográficas.

En general se puede observar que la morfología de las nanopartículas es casi esférica, en cuanto a la influencia de la concentración de hidróxido de sodio en el sistema se puede decir que a mayor concentración incrementa el poder de reducción incrementándose las nanopartículas de menor tamaño. Los ácidos grasos liberados por la acción de la sosa fungen como reductores y estabilizantes obteniendo un menor tamaño de partícula al haber una mayor cantidad de estos disponible.

A continuación se muestran las imágenes y la tabla comparativa de los tamaños de partícula obtenida con MEB y con DLS.

Tabla 3.3. Tamaños de partículas obtenidos con DLS y MEB.

[NaOH] (mol L <sup>-1</sup> )	MEB	DLS
<b>0.1</b>	53.5±2.4 nm	43.4±5.2 nm
<b>0.5</b>	50.2±3.7 nm	80.1±7.2 nm
<b>0.75</b>	19.9±2.4 nm	98.8±14.5 nm

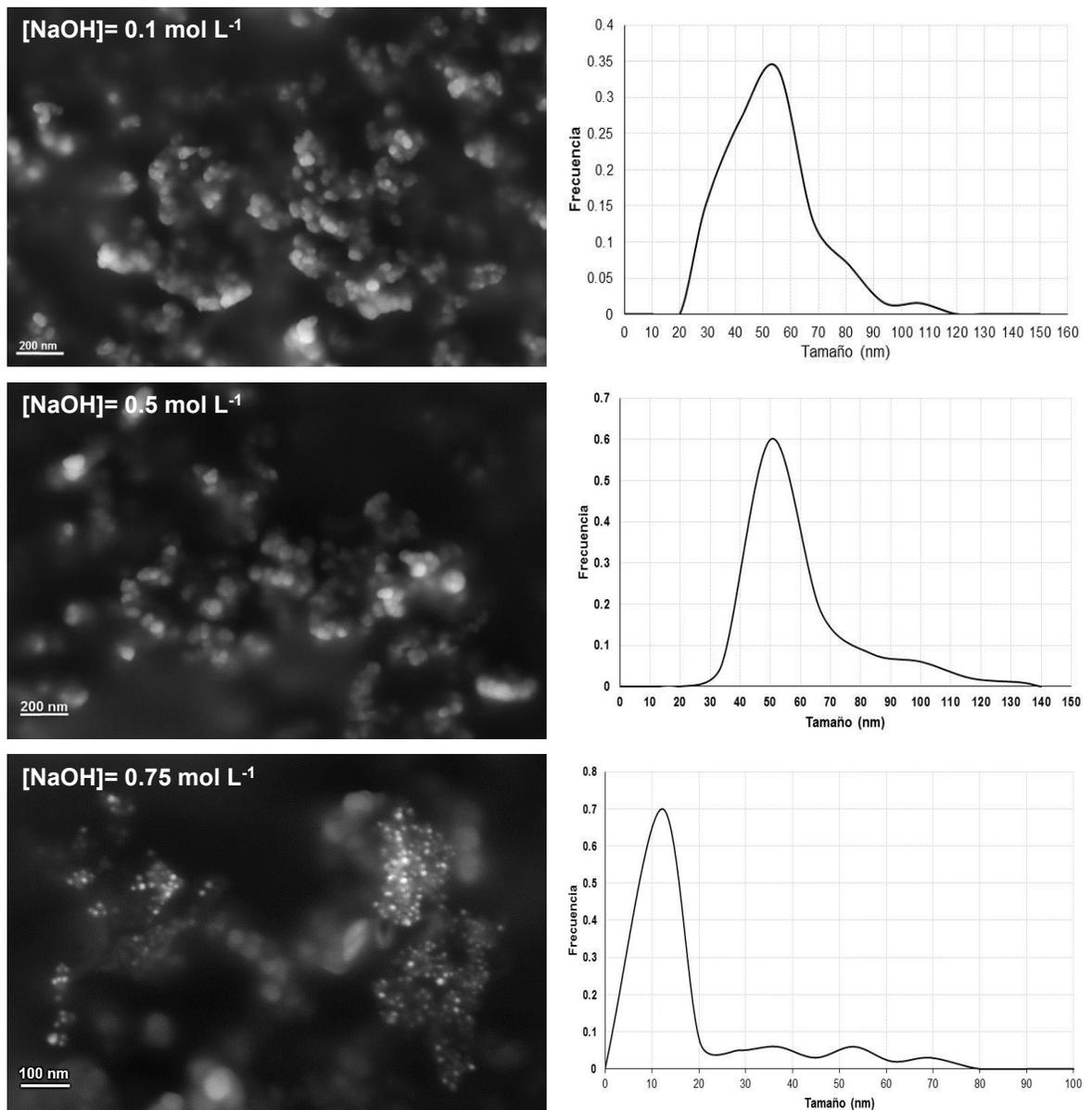
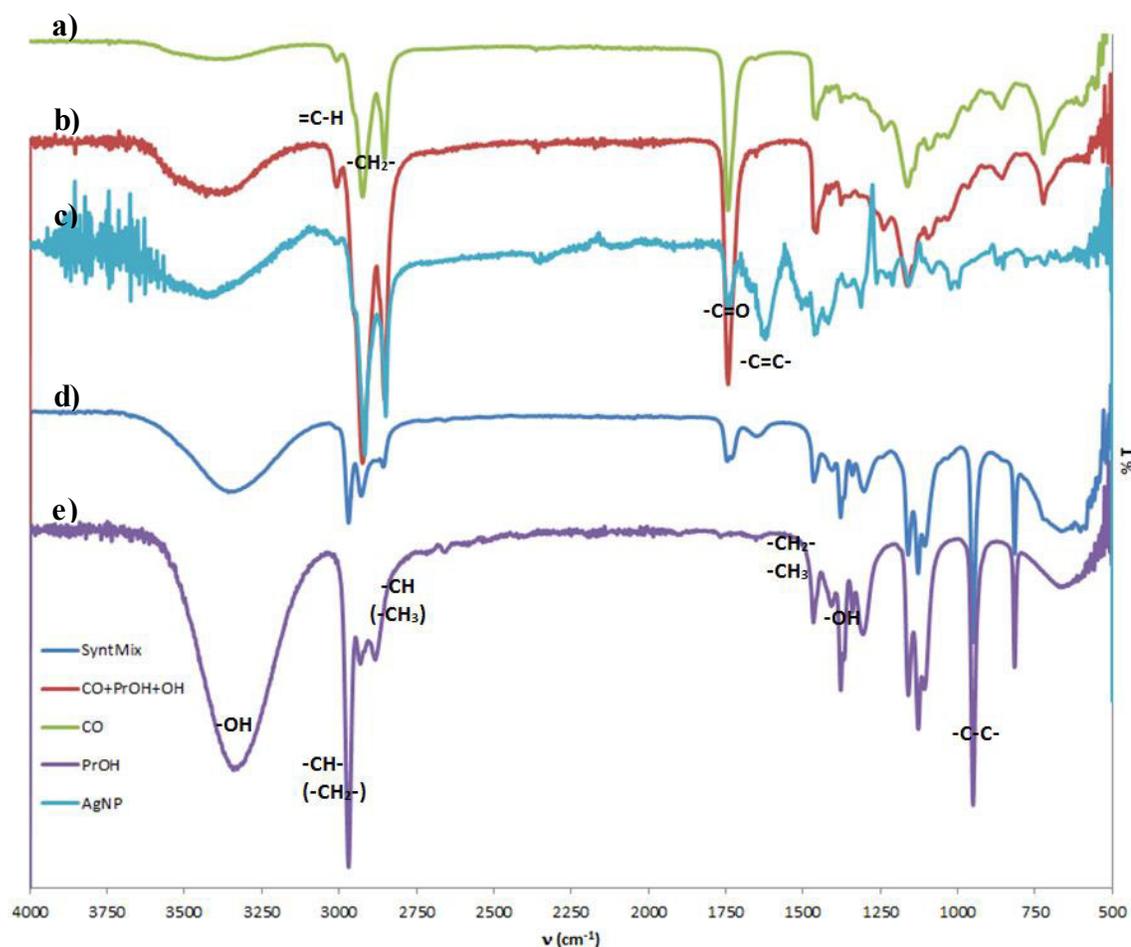


Figura 3.22. Microscopías electrónicas de barrido (izq.) y perfiles de tamaño obtenidos de las fotografías (der.) de las nanopartículas sintetizadas con diferente concentración de hidróxido de sodio.  $[AgNO_3] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $Ag^+$ ,  $T = 80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Caracterización FTIR.

En la Figura 3.23 se muestran los espectros de infrarrojo de los compuestos por los cuales está formada la mezcla de reacción y las nanopartículas de plata obtenidas. Las señales que sufren un cambio importante en el espectro son las señales propias

del aceite de ricino, por lo que se puede aseverar que éste es el compuesto que está participando principalmente en la reducción de los iones metálicos al estar presente el hidróxido de sodio.



**Figura 3.23.** Espectros FTIR-ATR de la mezcla de reacción antes y después de llevada a cabo la síntesis de nanopartículas, así como del espectro de las nanopartículas de plata; a) Aceite de ricino, b) Mezcla antes de la síntesis compuesta de aceite de ricino, 1-Propanol e hidróxido de sodio  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , c) nanopartículas de plata, d) Mezcla después de la síntesis con  $[\text{Ag}^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  y e) 1-Propanol.

Al comparar las mezclas de síntesis antes (Fig. 3.23b) y después de llevar a cabo la síntesis (Fig. 3.23d) se puede observar como las señales ubicadas en aproximadamente  $1000\text{ cm}^{-1}$  cambian considerablemente. Las señales que presenta la mezcla antes de llevar a cabo la síntesis son muy similares a las que presenta el espectro del aceite de ricino (Fig. 3.23a) debido a que este es el compuesto que se encuentra en mayor proporción en la mezcla. Después de llevar a cabo la síntesis las señales se asemejan a las propias del espectro del 1-PrOH (Fig.3.23e) lo que indica un agotamiento o transformación del aceite una vez obtenidas las partículas de plata.

Una disminución en intensidad de la señal del carbonilo ( $\approx 1750\text{ cm}^{-1}$ ) decrece de manera significativa, probablemente debido a que este grupo se esté uniendo a la nanopartícula, ya que este carbonilo (que forma parte de un grupo ácido carboxílico) no puede oxidarse y la disminución en intensidad de la señal indica una interacción con el metal. Un posible acomodo de los ácidos grasos se muestra en la Figura 3.24. El espectro de las nanopartículas es muy parecido al del aceite de ricino por lo que los ácidos grasos por los que está compuesto deben estar cubriendo la superficie de la nanopartícula.

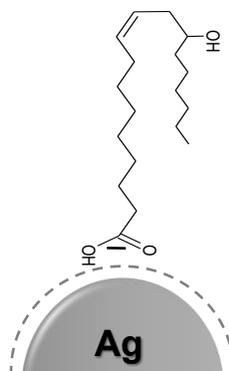


Figura 3.24. Posible acomodo de las moléculas de ácido ricinoleico adsorbidas sobre la superficie de las nanopartículas.

### Variación de la cantidad de hidróxido de sodio en la síntesis.

El aumento en la cantidad del hidróxido de sodio (aumento en el porcentaje en peso que ocupa en la formulación) en el sistema favorece la formación de partículas de plata en el intervalo de tamaños de 70 a 110 nm cuando la síntesis se lleva a cabo a 80 °C y utilizando una concentración de sosa de 0.1 mol L<sup>-1</sup>. Este aumento se refiere a duplicar la cantidad de fase acuosa que contiene hidróxido de sodio, es decir, si hasta ahora se utilizaba un 1 % de fase acuosa esta se duplica hasta un 2 %.

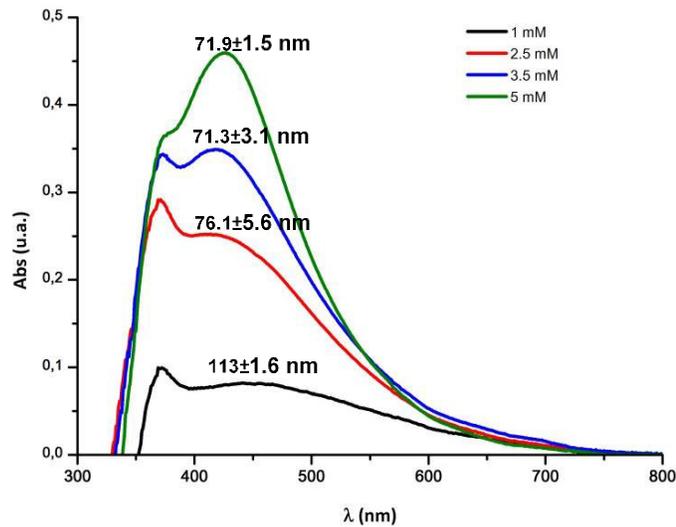


Figura 3.25. Espectro UV-vis y tamaños obtenidos mediante DLS de las AgNPs obtenidas al incrementar la cantidad de [NaOH]= 0.1 mol L<sup>-1</sup> adicionada al sistema de 10 % al 15 % utilizando una [Ag<sup>+</sup>]= 1 x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> y T= 80 °C.

Las micrografías de MEB (Fig. 3.26) muestran el tamaño verdadero de las nanopartículas, además del perfil de distribución obtenido a partir del análisis de tamaños de varias partículas. El tamaño de partícula obtenido por DLS y MEB se enlista en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tamaños de partículas obtenidos con DLS y MEB.

<b>[Ag<sup>+</sup>] (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>MEB</b>	<b>DLS</b>
<b>1</b>	49.9±13.4 nm	113.3±11.6
	76.5±6.1	
<b>2.5</b>	13.4±10.2nm	76.1±15.6
	57.1±25.7 nm	
<b>3.5</b>	11.1±8.9	71.3±13.1
	42.4±16.8 nm	
<b>5</b>	59.7±25.7	71.9±11.5
	89.0±18.8	

Las micrografías evidencian que, en general se obtienen tamaños promedios entre los 50 y 60 nm y morfología esférica. Las distribuciones muestran 2 poblaciones de nanopartículas una de menor tamaño (aproximadamente de 10 nm) y una mayor, por lo que la forma de la banda en el espectro UV-vis se debe a la interacción de las partículas pequeñas con las grandes tal como lo reporta Chumanov y Evanoff [251].

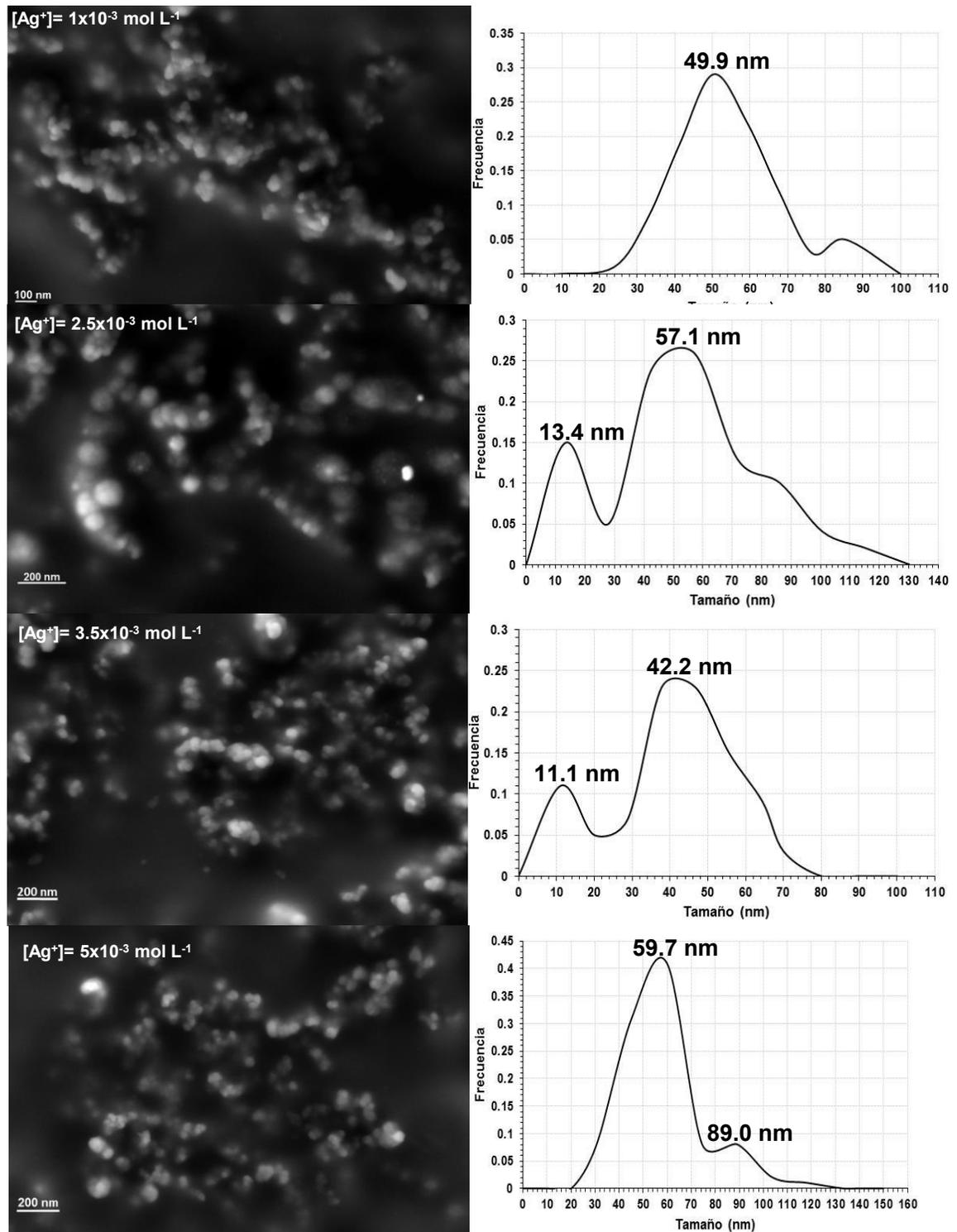


Figura 3.26. Microscopías electrónicas de barrido y perfil del tamaño de las partículas sintetizadas con el incremento en el porcentaje de hidróxido de sodio 0.1 mol L $^{-1}$  y  $1 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$  de  $Ag^+$  a 80 °C.

### Síntesis utilizando el extracto de hojas de *P. hortorum* (GLE) e hidróxido de sodio.

Al introducir el extracto en el sistema se observa que la longitud de onda donde se sitúa la resonancia del plasmón se desplaza a longitudes de onda menores, pasando de 460 nm a 440 nm lo que indica un decremento en el tamaño de las partículas, ver Figura 3.27. Además se define mejor la banda del plasmón indicando una distribución de nanopartículas menos polidispersa.

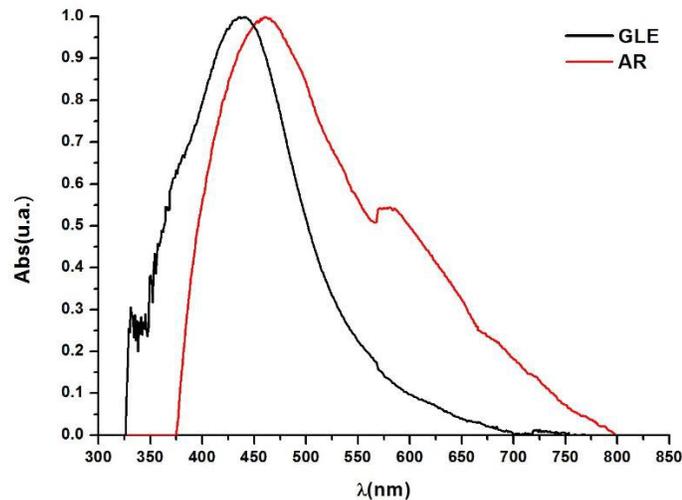


Figura 3.27. Espectro UV-vis de las nanopartículas obtenidas a 80 °C con el aceite de ricino (AR) y con la mezcla aceite de ricino y extracto de hojas de geranio (GLE).  $[Ag^+] = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $T = 80 \text{ °C}$  y  $[NaOH] = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ; GLE= 5 %; NaOH=5 %.

Nos referimos como reductor NaOH  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a los ácidos grasos liberados por la acción de la sosa sobre el aceite y con reductor GLE a la mezcla de los ácidos grasos con el extracto de hojas de geranio. Por lo anterior la mezcla de ácidos grasos con el extracto contiene un mayor número de especies reductoras las cuales ayudan a la obtención de partículas de menor tamaño como se observa en el espectro de la Fig. 3.27.

A pesar de lo mostrado anteriormente, las medidas de DLS no muestran una diferencia significativa en tamaño al obtener un tamaño de  $43.4 \pm 5.2 \text{ nm}$  al utilizar

como reductor al “NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>” y 45.5±3.6 nm al utilizar como reductor al “GLE”.

La micrografía MEB obtenida, muestra que la población de partículas obtenidas al utilizar como reductor al GLE, es polidispersa (Fig. 3.28). Así también corrobora el desplazamiento a longitudes de onda menores del espectro UV-vis ya que la proporción de nanopartículas de menor tamaño es mayor en comparación con las de mayor tamaño.

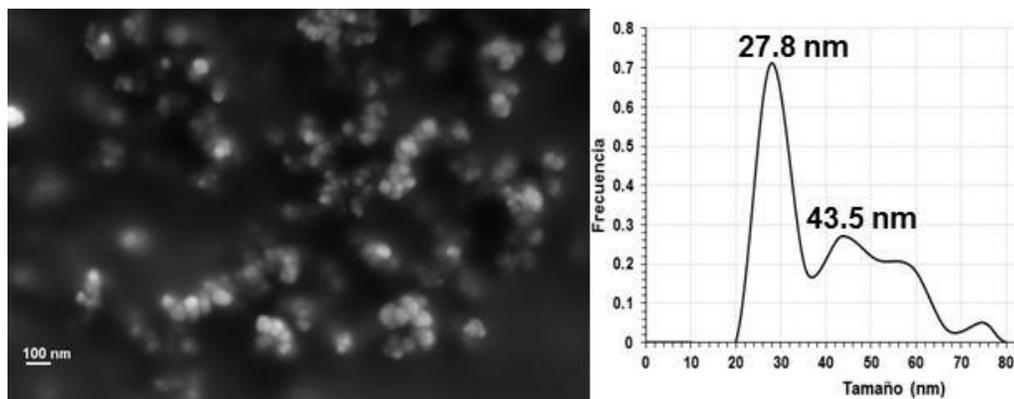


Figura 3.28. Micrografía MEB y perfil de tamaño de las nanopartículas sintetizadas bajo la acción del reductor GLE. [Ag<sup>+</sup>]= 1x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>; T=80 °C.

## Conclusiones

La mezcla compuesta por aceite de ricino e hidróxido de sodio exhibe una buena acción reductora en la obtención de nanopartículas de plata a una temperatura de 80 °C.

El uso de la mezcla de extracto de hojas de geranio, aceite de ricino e hidróxido de sodio produce nanopartículas menos aglomeradas comparado con los sistemas donde solo se utiliza al aceite de ricino como componente reductor.

Las propiedades de las nanopartículas dependen del control de los parámetros de síntesis más que de la plantilla (SFME) utilizada.

La caracterización FTIR de las nanopartículas revela que estas están cubiertas por moléculas del aceite de ricino, aún cuando el extracto de geranio es utilizado para la síntesis, debido a la presencia de una mayor cantidad de éste.

Este método de síntesis con mezclas libres de tensoactivo o microemulsiones libres de tensoactivo (SFME) no son adecuadas para controlar el tamaño y forma de las partículas de plata en comparación con las microemulsiones comunes formuladas con tensoactivos “comunes”. Lo anterior probablemente a una alta flexibilidad de la interfase [209] formada entre el 1-PrOH-Aceite de ricino, sin embargo, el uso de estos sistemas para generar nanopartículas de distintos tamaños es factible.

**MICROEMULSIONES Y NANO-EMULSIONES FORMULADAS CON TENSOACTIVOS NO IÓNICOS DE BAJA/NULA TOXICIDAD PARA EL MEDIO AMBIENTE UTILIZADOS COMO NANOREACTORES EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO EXTRACTO DE HOJAS DE *P. hortorum* COMO REDUCTOR.**

**COMPORTAMIENTO FÁSICO DE LOS SISTEMAS FORMULADOS CON TENSOACTIVOS NO IÓNICOS.**

El estudio del comportamiento fásico de los distintos sistemas formulados se llevó a cabo utilizando los diagramas ternarios de fase a 25 °C, los sistemas de microemulsión obtenidos fueron con tensoactivos no iónicos debido a la versatilidad que estos presentan en diversas aplicaciones y a la baja o nula toxicidad de los mismos. Es así como se probaron distintos tensoactivos y co-tensoactivos para la obtención de microemulsiones del tipo W/O y O/W. Cabe mencionar que el uso del co-tensoactivo es indispensable ya que la viscosidad que los sistemas presentan sin la adición del mismo es grande, obteniéndose de tal forma geles y cristales líquidos, además el co-tensoactivo ayuda a disminuir la viscosidad del aceite haciendo que las mezclas sean más manejables.

Los tensoactivos probados fueron el Tween 80, Brij 96V, Synperonic 13/6.5, Synperonic 10/6, Cremophor RH60 y Cremophor EL y co-tensoactivos alcanoles de cadena corta como etanol (EtOH), 1-propanol (PrOH), 1-butanol (BuOH), 1-pentanol (PnOH), 1,2-hexanodiol y 2-fenoxietanol.

En la Figura 3.29 se muestran los diagramas de fase pseudo-ternarios realizados a una temperatura de 25°C para los distintos co-tensoactivos probados y utilizando como tensoactivo al Tween 80 la zona de microemulsión O/W fue estudiada ya que es de especial interés en este trabajo debido a que conlleva el uso de una baja cantidad de fase oleosa al estar compuesta mayormente por agua. Se encontró que con el butanol (BuOH) y 1,2-hexanodiol se extiende la zona rica en agua, sin embargo, se optó por utilizar el 1,2-hexanodiol debido a la baja toxicidad que presenta además de ser empleado en distintas formulaciones cosméticas.

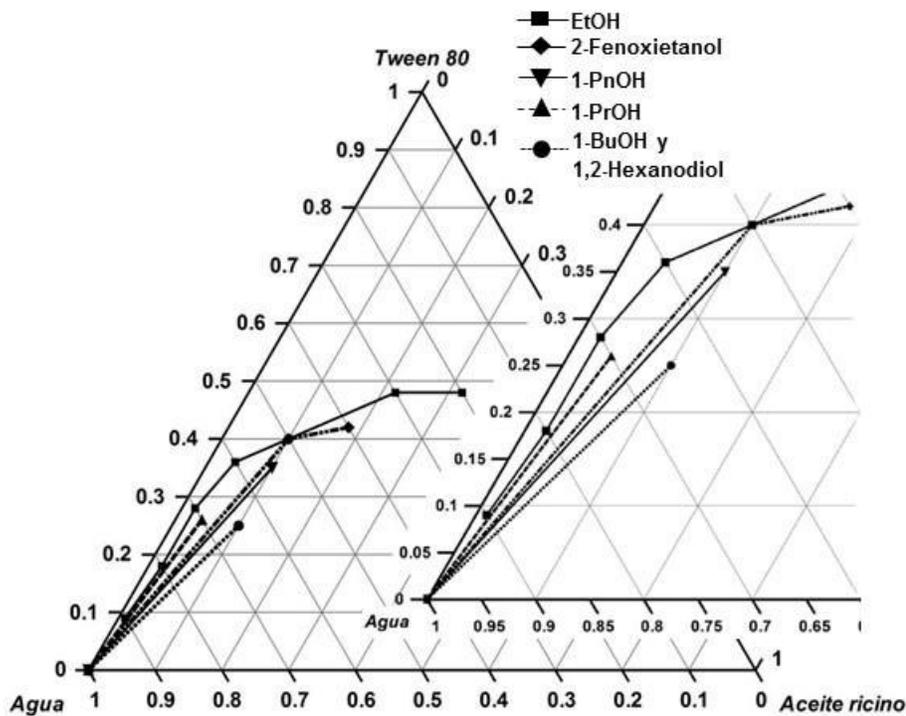


Figura 3.29. Diagrama de fase pseudo-ternario para los distintos co-tensoactivos probados con el tensoactivo Tween 80, la parte de la derecha muestra una ampliación de la zona rica en agua. Agua/Tween 80: Co-tensoactivo (1:1) /Aceite de ricino.

Una vez visto que el 1,2-hexanodiol dio buenos resultados extendiendo la zona O/W al ser probado con el Tween 80 se decidió realizar el estudio con los demás tensoactivos, ya que con este tensoactivo la zona de interés, que es la zona rica en agua aún es muy estrecha. Se llevó a cabo el estudio sistemático del

comportamiento fásico del tensoactivo que mejor solubiliza al aceite de ricino y usando como co-tensoactivo al 1,2-hexanodiol.

El comportamiento fásico registrado con los distintos tensoactivos demuestra el gran reto que supone formular microemulsiones del tipo O/W utilizando triglicéridos de alto peso molecular como lo es el aceite de ricino (Figura 3.30). Sin embargo, el Brij 96V en conjunto con el 1,2-hexanodiol en una relación 1:1 (peso/peso) es el que presenta una zona monofásica mayor en comparación con los demás tensoactivos incluyendo a los derivados del mismo aceite de ricino Cremophor EL y Cremophor RH60.

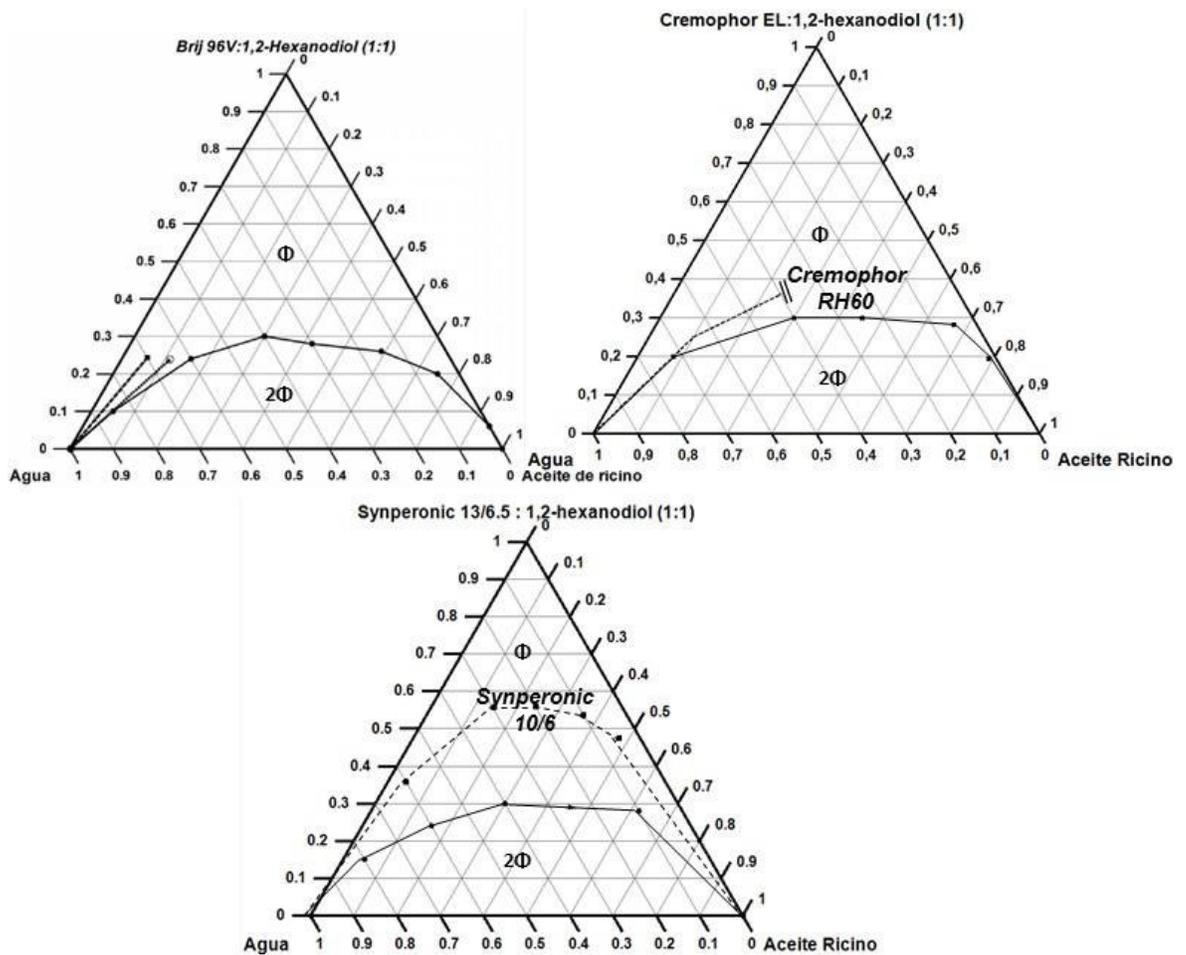


Figura 3.30. Diagramas pseudo-ternarios de fase para los distintos tensoactivos seleccionados utilizando el 1,2-hexanodiol como co-tensoactivo en una relación 1:1 (w/w). Las líneas punteadas dentro de los diagramas se refieren al comportamiento de otro tensoactivo. Φ: monofase; 2φ: multifase.

Los sistemas estudiados han mostrado solubilizar hasta un 20 % de aceite con un contenido de agua de 45 % (microemulsión) y un 10 % de aceite con 70 % de agua (nano-emulsión) al utilizar al 1,2-hexanodiol como co-tensoactivo y a una temperatura de 25 °C. Cabe mencionar que aquellas composiciones con un contenido mayor al 45-50 % de agua se tratan de nano-emulsiones, sin embargo, presentan la estabilidad adecuada para poder llevar a cabo la síntesis de nanopartículas sin que el sistema se modifique significativamente, es decir, sin aumento en el tamaño de gota y desestabilización del sistema (rompimiento de fases).

Distintas condiciones (parámetros de ajuste) se probaron para aumentar la solubilización del aceite de ricino en la fase acuosa, así como la modificación de la flexibilidad de la película formada por el tensoactivo en la interfase. Una de ellas fue la disminución de la viscosidad del aceite de ricino al mezclarlo con etanol en distintas proporciones, esto debido a que las mezclas con una cantidad pequeña de agua formaban un gel traslúcido o blanquecino no fluido (al aumentar la cantidad de agua). El estudio anterior nos mostró un aumento en la zona monofásica, sin embargo, estos sistemas son sensibles a cambios en la composición de la fase acuosa. Por lo que al adicionar el extracto de hojas de geranio se reduce la zona monofásica, así se decidió no utilizar estos sistemas.

***Estudio fásico del sistema Agua/Brij 96V/Aceite ricino.***

De acuerdo a lo observado anteriormente el Brij 96V fue elegido para llevar a cabo el estudio a fondo y ser la formulación a utilizar para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de plata. En la Figura 3.31 se muestra el diagrama ternario de fases para el sistema sin co-tensoactivo. Es notable como la formación de cristales líquidos, geles y emulsiones no fluidas, así como zonas multifásicas predominan en el diagrama dejando una pequeña zona de microemulsión localizada principalmente en la zona rica en aceite donde microemulsiones del tipo W/O y del tipo bicontinua se forman. De lo anterior es que surge la necesidad de utilizar un co-tensoactivo el cual ayudará a ampliar la zona de microemulsión disminuyendo las interacciones entre el aceite y el tensoactivo, evitando la formación de agregados como cristales líquidos y formación de geles y/o cremas. De estudios preliminares se tiene que el 1,2-hexanodiol presenta buenos resultados al encontrarse con este la mayor zona monofásica.

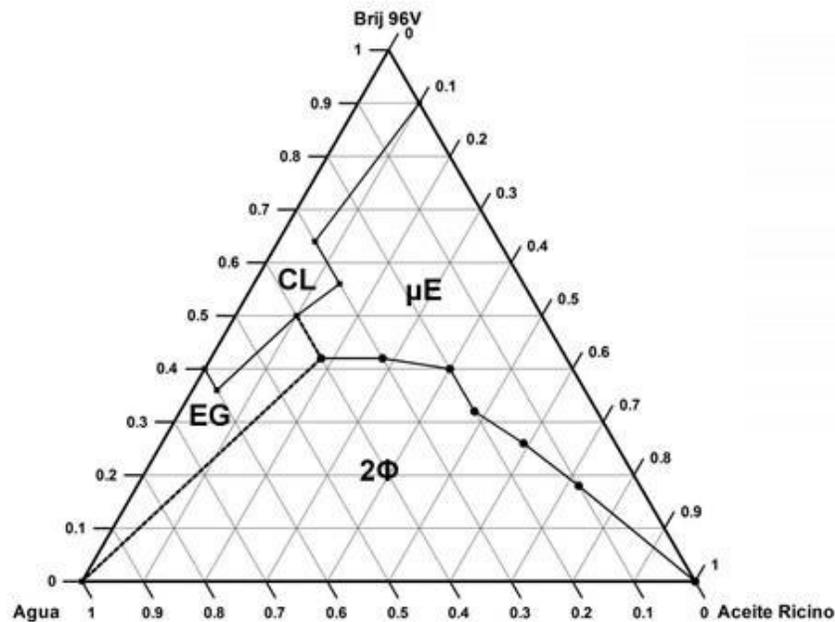


Figura 3.31. Diagrama de fases ternario del sistema Agua/Brij 96V/Aceite ricino a 25 °C donde se muestran las diferentes zonas encontradas. CL: Cristal líquido; EG: Emulsión/Gel;  $\mu E$ : microemulsión;  $2\phi$ : multifase.

#### ***Variación de la cantidad de co-tensoactivo en el sistema.***

La adición del co-tensoactivo al sistema ayuda a conectar las zonas de microemulsión y a extenderla. El 1,2-hexanodiol es el que mejores resultados arroja en la extensión de la zona de microemulsión al utilizar el Brij 96v como tensioactivo, cabe resaltar que ambos compuestos son utilizados en la formulación de productos cosméticos, por lo que poseen una toxicidad de moderada a baja [260][261].

La cantidad de 1,2-hexanodiol en el sistema causa variaciones como se aprecia en la Figura 3.32, principalmente extendiendo la zona monofásica. Así, se tiene que para una relación 1:1 de tensioactivo: co-tensoactivo, se obtiene la mayor zona monofásica, mientras que al disminuir a la mitad la cantidad de co-tensoactivo la zona monofásica también disminuye. La disminución es más apreciable principalmente en la zona rica en aceite donde se da la formación de agregados del tipo O/W los cuales son de interés en esta investigación. Mayores cantidades de co-

tensoactivo no fueron probadas ya que se consideró que una relación 1:1 es adecuada para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas.

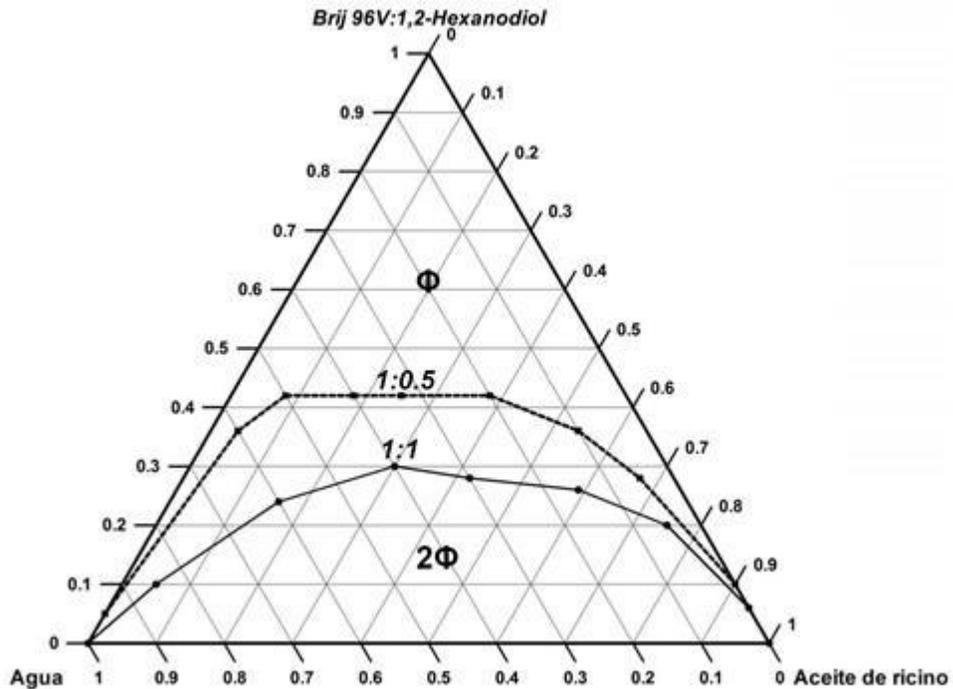


Figura 3.32. Diagrama de fases pseudoternario de fases con distintas relaciones (w/w) tensoactivo: co-tensoactivo. 2 $\phi$ : multifase;  $\phi$ : una sola fase.

El estudio fásico del sistema agua/Brij 96v:1,2-hexanodiol/aceite de ricino reveló la presencia de zonas de nano-emulsión (Fig. 3.33.) sobre todo en la zona rica en contenido de agua (porcentajes mayores al 50 %) y las cuales pueden ser sometidas a dilución infinita, pudiendo solubilizar hasta un 20 % de aceite.

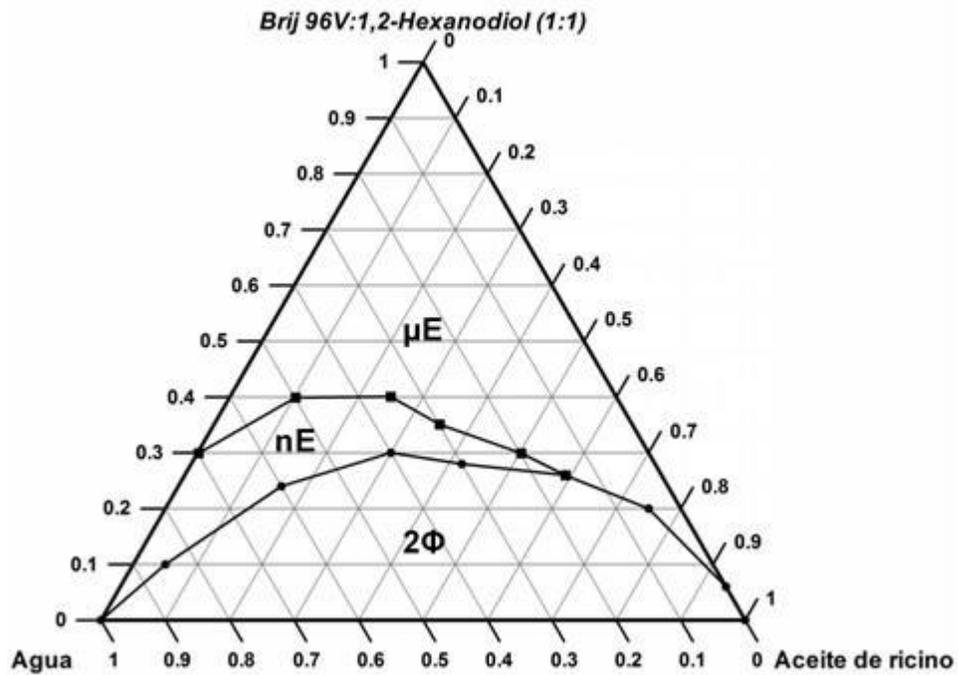


Figura 3.33. Diagrama de fases pseudoternario que muestra las distintas zonas del sistema Agua/Brij 96V:1,2-hexanodiol (1:1)/Aceite ricino.  $\mu E$ : microemulsión; nE: nanoemulsión;  $2\phi$ : multifase.

Las microestructuras presentes fueron determinadas por conductividad eléctrica a lo largo de la línea de dilución DL35/65 (35 % de aceite y 65 % de tensoactivo) indicada en la Figura 3.34a para los sistemas con agua (Fig. 3.34b) y GLE (Fig. 3.34c) como componentes acuosos. Se observan tres pendientes y por lo tanto se pueden inferir tres diferentes estructuras que se encuentran presentes a lo largo de la zona monofásica del diagrama de fases.

A contenidos de fase acuosa inferiores al 15-25 % en peso (dependiendo de la naturaleza de la fase acuosa) están presentes microemulsiones inversas. Un aumento adicional de la fase acuosa conduce a un cambio en la pendiente de la curva de conductividad entre 25 y 55 %. Cuando más del 55 % de fase acuosa se añade en el sistema, se registra otro cambio en la pendiente, asociado a un cambio en la microestructura. Los cambios en la pendiente sugieren una transición desde agua-en-aceite (W / O) hasta bicontinuo (BC) y luego a estructuras aceite-en-agua (O / W) [262][260].

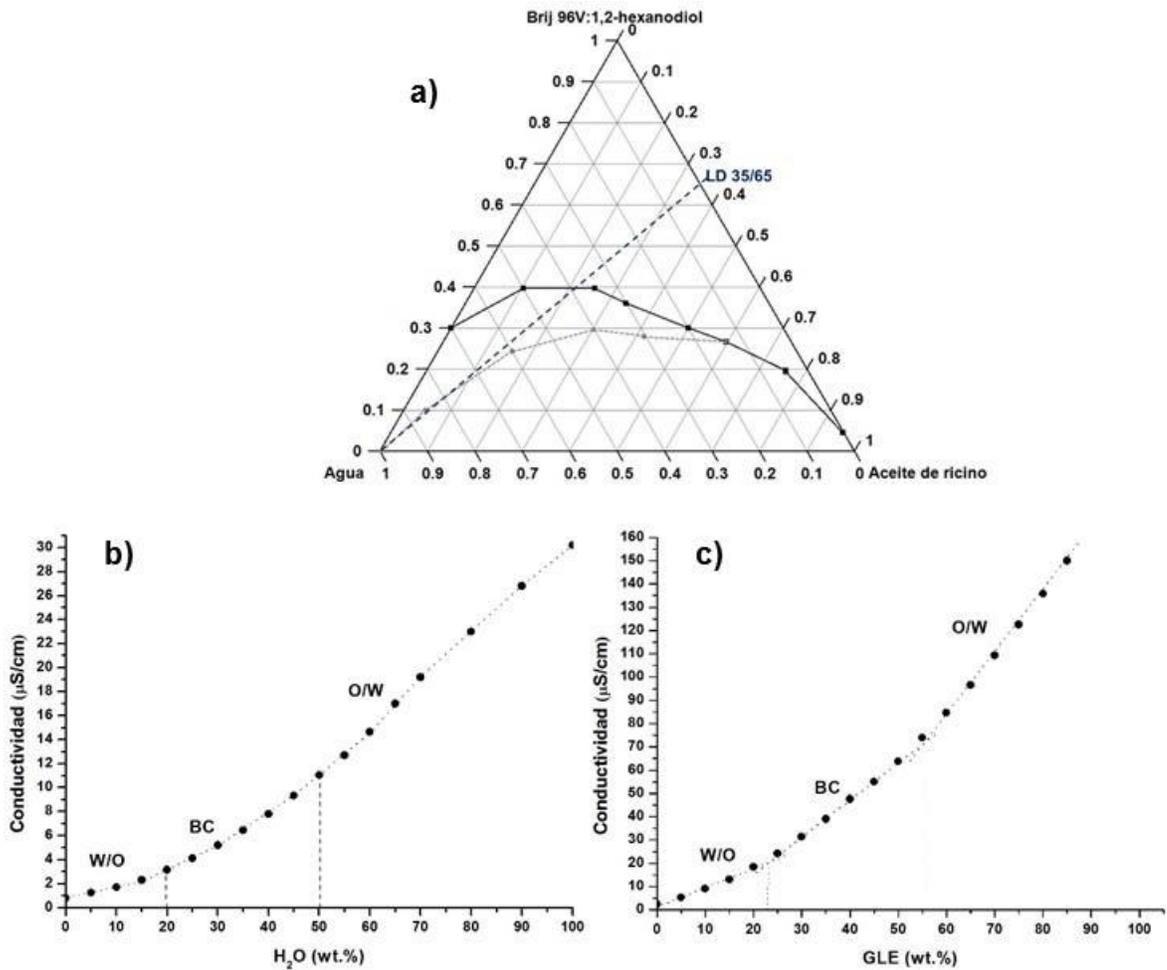


Figura 3.34. Figura donde se indica la a) línea de dilución utilizada para el análisis de conductividad (LD 35/65), b) y c) graficas de conductividad obtenidas para cuando la fase acuoso es agua y el extracto de hojas de geranio respectivamente.

Para corroborar, mediante esta técnica que la zona bicontinua se encuentra en el intervalo de 20 a 50 % de fase acuosa, se realizó la titulación de la mezcla aceite/tensioactivo 50/50 con agua y la titulación de la mezcla tensioactivo/agua 15/85 con aceite y se determinó en las curvas de conductividad la zona bicontinua. Al determinar esta zona, también quedaron determinadas las demás. En la Figura 3.35 se encuentran las curvas obtenidas, donde se aprecia que la zona bicontinua cae en un intervalo de contenido de fase acuosa que encaja con los resultados obtenidos anteriormente.

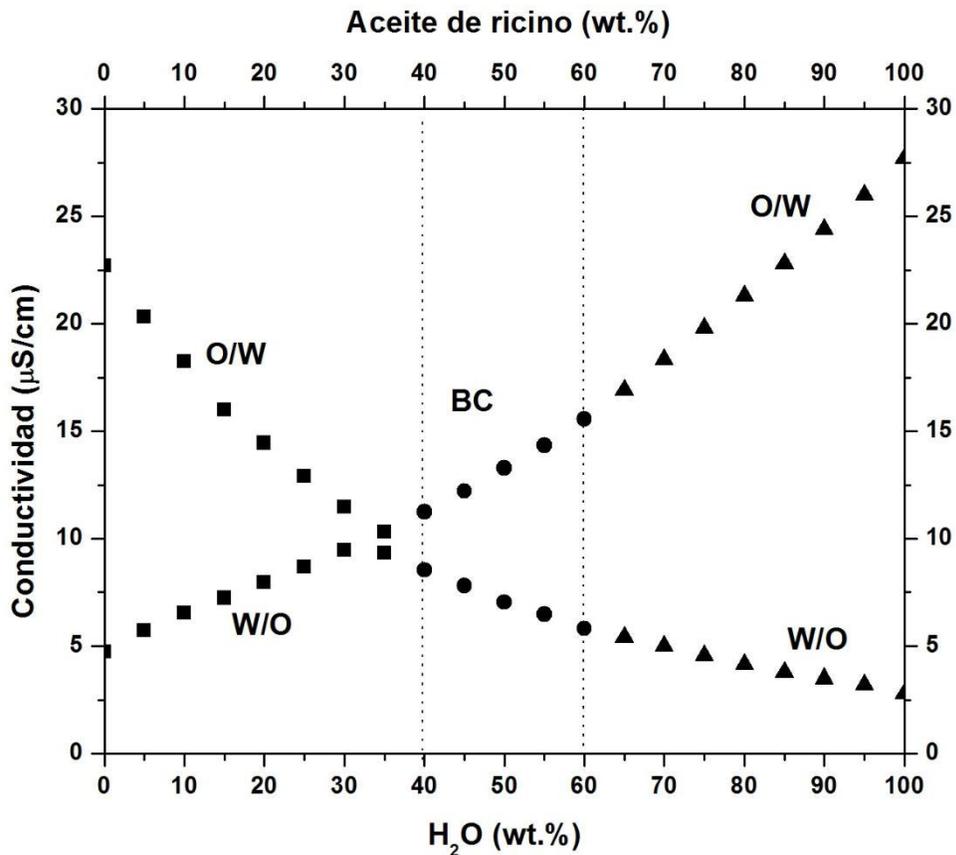


Figura 3.35. Curvas de conductividad obtenidas para distintas líneas de dilución.

Una vez determinados los intervalos donde las microestructuras pueden ser encontradas en función de la cantidad de fase acuosa adicionada en el sistema, se procedió a verificar la reactividad y diferencias que presentan las nanopartículas durante la síntesis llevada a cabo en las distintas microestructuras presentes en el sistema.

Como dato complementario el tamaño de gota obtenido en la zona bicontinua fue de 18 nm aproximadamente, a pesar de que la técnica de DLS no es la mejor para llevar a cabo la medición de estos sistemas puede ofrecer un acercamiento al tamaño de gota promedio.

**Reactividad a lo largo de distintas líneas de dilución.**

La reactividad a lo largo de la línea de dilución LD25/75 (Figura 3.36) utilizando como precursor metálico al estearato de plata a una concentración de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  y como reductor el extracto de hojas de geranio fue estudiada. Las nanopartículas obtenidas con las microemulsiones agua en aceite incrementan su tamaño de 10 a 12.3 nm al aumentarse el contenido de fase acuosa. Por otra parte, la síntesis en nano-emulsiones aceite en agua evidenció que el tamaño de la nanopartícula también puede ser modulado dependiendo del contenido de fase acuosa en el sistema, así tamaños que van desde los 9 hasta los 13 nm fueron obtenidos. En la Tabla 3.7 se muestran los tamaños obtenidos para las diferentes cantidades de fase acuosa utilizada a lo largo de esta línea de dilución. Nanopartículas de mayor tamaño (33.7 y 22.1 nm), se encontraron en las composiciones que corresponden a la zona de estructuras bicontinuas de acuerdo a lo determinado por las mediciones de conductividad y mientras que los tamaños de nanopartículas más pequeños fueron obtenidos en los sistemas de nano-emulsiones, esto debido al mayor contenido en reductores favoreciendo la nucleación (mayor cantidad de fase acuosa) y producción de partículas pequeñas.

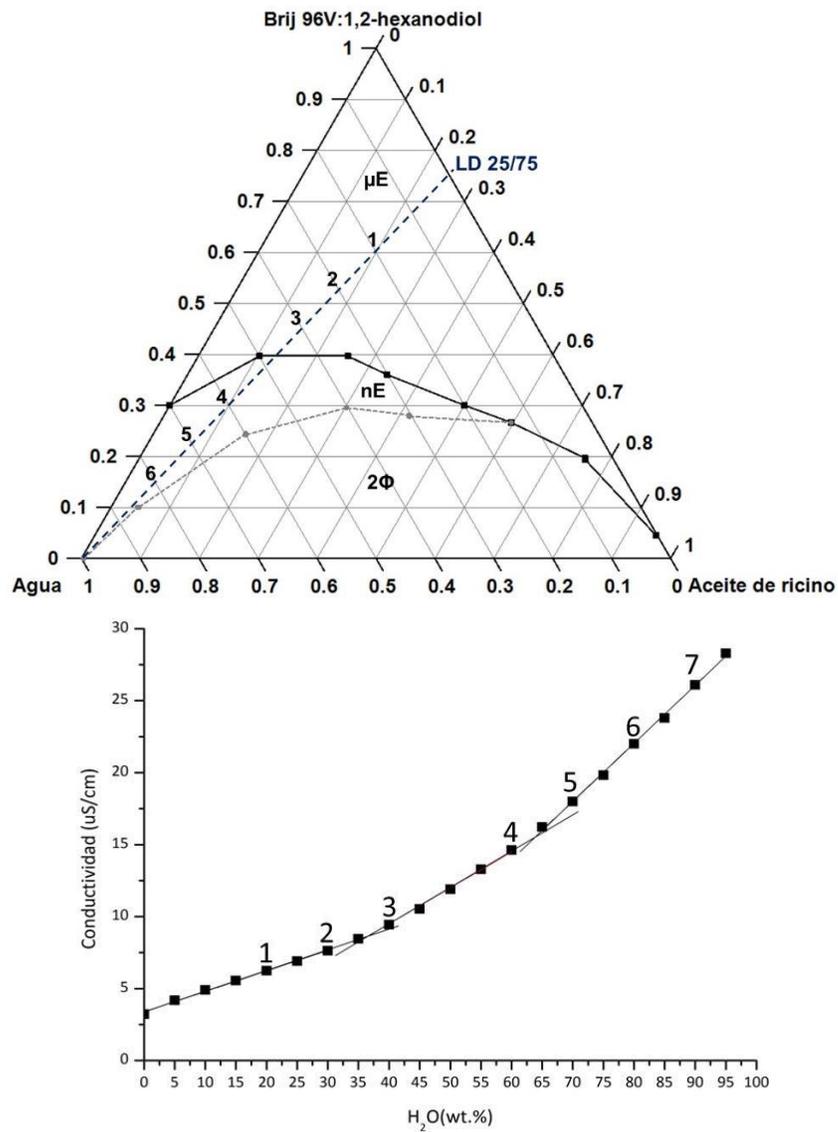


Figura 3.36. Diagrama de fase pseudo-ternario y curva de conductividad de la línea de dilución usada para la síntesis de nanopartículas de plata utilizando el extracto de hojas de geranio como reductor, los números indican las composiciones utilizadas para la síntesis.  $\mu E$ : microemulsión,  $nE$ : nano-emulsión,  $2\Phi$ : zona multifásica.

Tabla 3.5. Radios hidrodinámicos obtenidos para las diferentes composiciones usadas a lo largo de la LD25/75 para la síntesis de nanopartículas de plata.

<b>Composición</b>	<b>GLE (wt. %)</b>	<b>R<sub>h</sub> gota(nm)</b>	<b>R<sub>h</sub> AgNPs(nm)</b>
1	20	8.2±1.2-	10.0±2.6
2	30	17.8±1.1-	12.3±2.5
3	40	25.5±1.1	33.7±2.0
4	60	32.7±1.9	22.1±2.7
5	70	42.7±1.5	13.4±0.1
6	80	45.6±1.2	9.4±1.8

Una vez demostrado que este sistema puede ser utilizado en la síntesis de nanopartículas de plata con tamaño controlado se estudió la influencia de la concentración y cantidad de precursor metálico en la síntesis, así como la variación de la cantidad de fase acuosa en el sistema.

En síntesis al aumentar la cantidad de fase acuosa en las estructuras W/O, el tamaño de gota aumenta también y se refleja en el tamaño final de las nanopartículas, las cuales deben tener un tamaño muy similar al tamaño de la gota evidenciando el control que ejerce la plantilla durante la síntesis (ver Tabla 3.7). En cambio, en nano-emulsiones O/W la interfase suele ser más flexible y no siempre el tamaño de gota corresponde al tamaño de la partícula. Así, en este caso el tamaño final es debido a la cantidad de reductor presente en el sistema, el cual al incrementarse promueve el decremento en el tamaño de la partícula.

### Influencia del contenido de GLE en el sistema.

Mediante el incremento de GLE en el sistema el tamaño de partícula obtenido tiende a disminuir, sin embargo, es solo válido cuando un 5 % del precursor metálico es utilizado en la síntesis. De la misma manera se observó que al incrementar este porcentaje de precursor metálico el tamaño final tiende a incrementarse (ver Fig.3.37). Lo anterior puede ser explicado debido a que, a bajo porcentaje de precursor metálico, el número de iones plata a reducir es menor, lo que ocasiona que las nanopartículas formadas no puedan crecer más en comparación con las concentraciones más altas.

El espectro UV-vis de las nanopartículas obtenidas cuando el 5 % de precursor metálico es utilizado se muestra en la Figura 3.37. El color de las dispersiones de nanopartículas de plata en agua para las diferentes composiciones, varía en intensidad desde un amarillo hasta café-rojizo debido al incremento en tamaño de las nanopartículas [263].

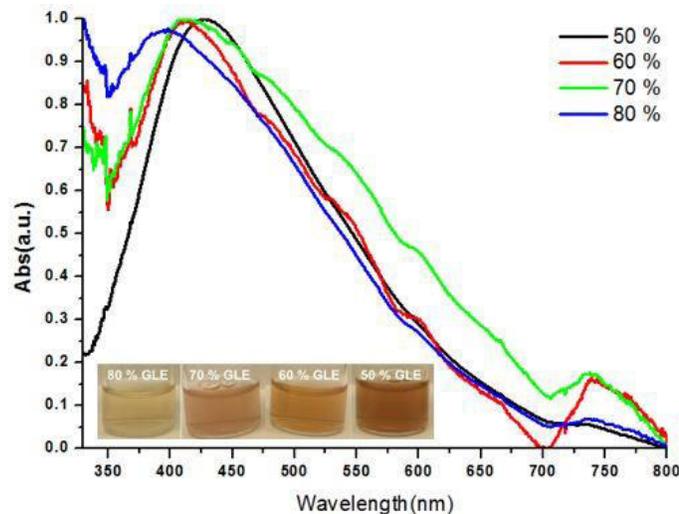
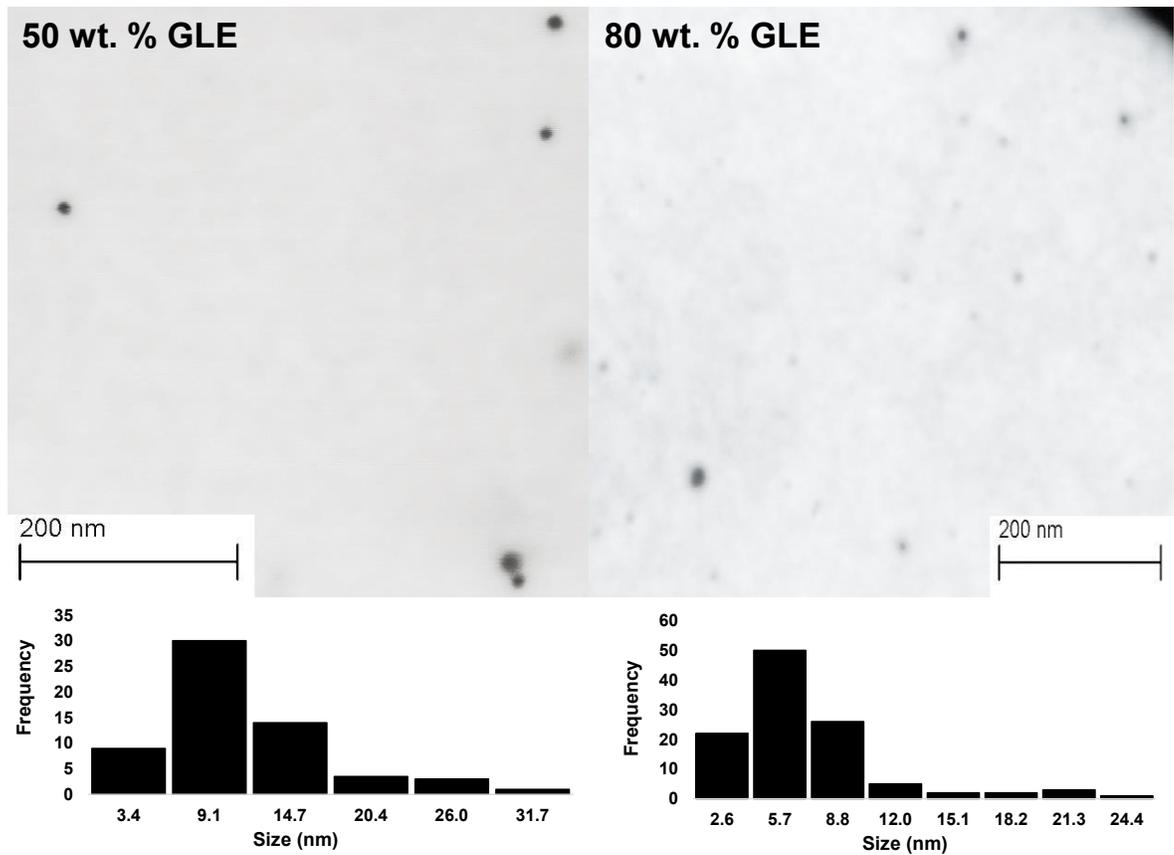


Figura 3.37. Espectros UV-vis de las nanopartículas sintetizadas utilizando diferentes contenidos de fase acuosa.



**Figura 3.38.** Imágenes de STEM de las nanopartículas sintetizadas con 5 % De AgSt y 50 % (Izquierda) y 80 % (Derecha) de GLE. En la parte inferior de la imagen se muestran las distribuciones de tamaño de partícula obtenido del conteo de las mismas en las micrografías obtenidas.

La longitud de onda máxima de absorción y la forma de la banda del espectro UV-vis está relacionado el tamaño y forma de las nanopartículas [264]. De tal forma se puede observar que los espectros obtenidos corresponden a una forma esférica y diferentes tamaños de nanopartículas. El espectro sufre desplazamiento a longitudes de onda menores cuando el porcentaje de fase acuosa aumenta en el sistema, lo cual habla de tamaños de nanopartículas pequeños. Las imágenes de la Figura 3.38 muestran la forma esférica de las nanopartículas y también la influencia del contenido de GLE, lo que concuerda con los espectros UV-vis obtenidos. Además, es evidente que las nanopartículas sintetizadas con un 50 % de GLE (microemulsión) muestran tamaños y formas más homogéneos en comparación con los obtenidos con un 80 % de GLE (nano-emulsión). Los tamaños

obtenidos de las micrografías son  $15.7 \pm 7.3$  nm y  $8.6 \pm 4.3$  nm, respectivamente. Sin embargo, es posible controlar el tamaño usando ambos sistemas.

### Influencia de la concentración de estearato de plata.

Cuando la concentración del AgSt incrementa a  $2.5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> una tendencia muy similar a la observada anteriormente es obtenida para todas las microemulsiones y nano-emulsiones evaluadas, desde un 5 a un 20 % de precursor metálico y variando de igual manera el porcentaje de fase acuosa de 50 a 70 %. El tamaño de las nanopartículas incrementa cuando el porcentaje de AgSt y GLE lo hace también, por lo tanto un desplazamiento del espectro de absorción UV-vis hacia longitudes de onda mayores se lleva a cabo (Fig. 3.39). También se puede observar que las nanopartículas sintetizadas en microemulsiones presentan los tamaños más pequeños y menor índice de polidispersidad en comparación con las obtenidas con las nano-emulsiones (Fig. 3.40), lo anterior probablemente debido a una diferencia en la flexibilidad de la interfase de las nano-emulsiones y las microemulsiones.

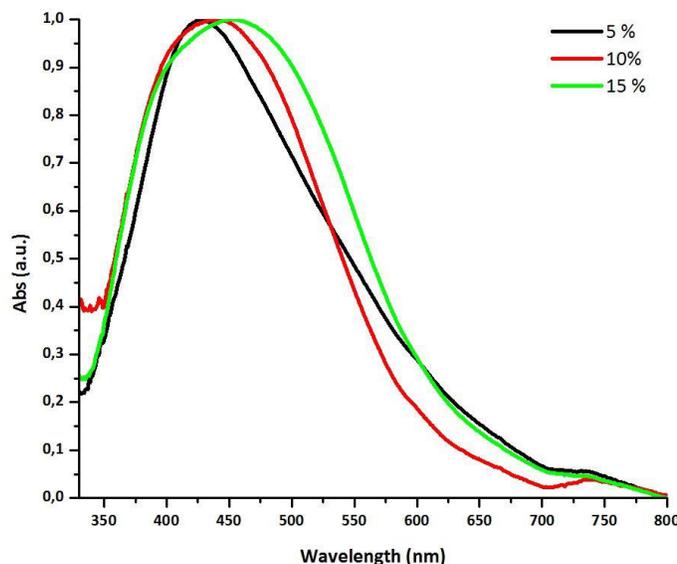


Figura 3.39. Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata sintetizadas con diferentes cantidades de AgSt a una concentración de  $2.5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> en el sistema usando 50 % de GLE.

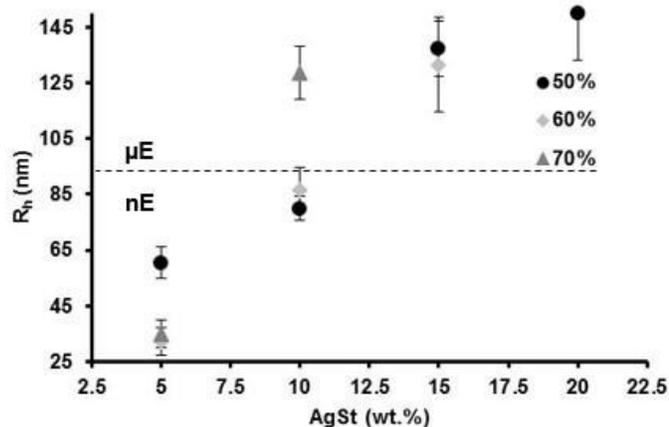


Figura 3.40. Radio hidrodinámico de las nanopartículas de plata sintetizadas con diferentes contenidos de GLE en función del contenido del precursor metálico AgSt presente en el sistema.

### Caracterización por FTIR

En los extractos de hojas de geranio los compuestos encontrados en mayor proporción son geraniol y citronelol [265]. Estas moléculas presentan un alto poder antioxidante y han sido descritas en la literatura como responsables de la reducción de los iones metálicos [234]. La Figura 3.41 muestra los espectros FTIR de las AgNPs sintetizadas y del GLE. Los espectros exhiben las mismas bandas a 3327, 2934, 2857, 1723 y 1607  $\text{cm}^{-1}$ ; que se asignaron a un hidroxilo (-OH) unido a una cadena polimérica tal como polifenol y flavonoide y amina de proteínas (-NH) a 3327  $\text{cm}^{-1}$ . Las vibraciones de metilo y metileno de las cadenas hidrocarbonadas están situadas en 2857 y 2934  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente; las señales a 1723 y 1607  $\text{cm}^{-1}$  proceden de grupos carbonilo de diferentes compuestos. La banda a 1723  $\text{cm}^{-1}$  se asignó a un grupo de ácido carboxílico y la señal a 1607  $\text{cm}^{-1}$  a un carbonilo de amida I. El cambio principal entre los espectros se produce en las señales del grupo carbonilo a 1723  $\text{cm}^{-1}$  debido a que está implicado en la reacción de reducción[266][267] o es adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas [218][268][269]. La otra señal del carbonilo de la amida I determina la presencia de

proteínas en el extracto que están también en la superficie de las nanopartículas, lo más probable es que actúen como agentes estabilizadores.

Del análisis anterior y según la literatura, las moléculas responsables de la reducción de los iones plata podrían ser los flavonoides y polifenoles presentes en el extracto acuoso y las proteínas que cubren la superficie de las nanopartículas.

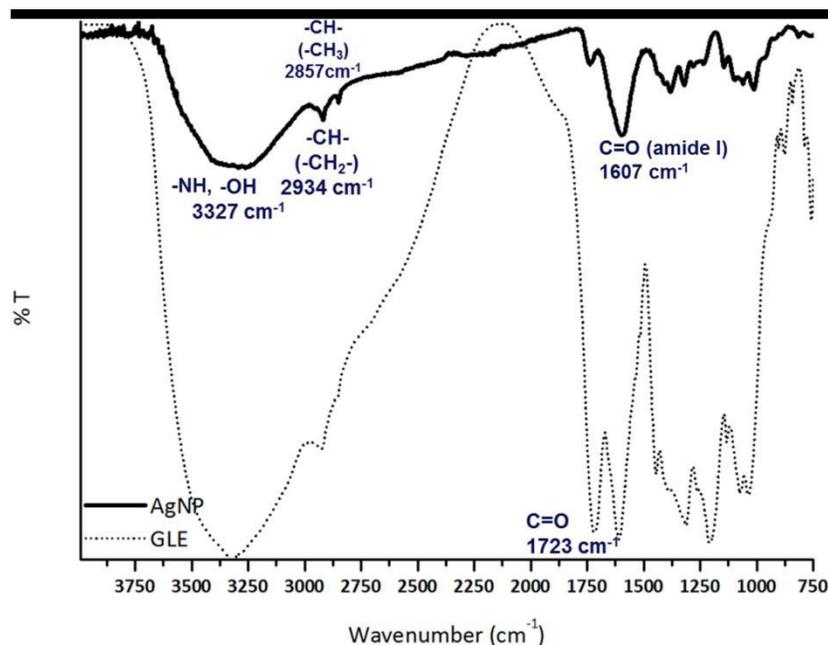


Figura 3.41. Espectros FTIR de las AgNPs sintetizadas y espectros del GLE utilizados para la síntesis de nanopartículas.

### Potencial zeta.

Se realizaron mediciones de potencial zeta para confirmar que la superficie de la nanopartícula estaba cubierta por biomoléculas del GLE y que estas conferían una carga eléctrica que propicia la estabilidad de las nanopartículas en suspensión coloidal. Se encontró que el potencial Zeta de las AgNPs (Figura 3.42) decrece a medida que aumenta el contenido de GLE, por lo que cuanto mayor es el contenido

de biomoléculas debidas al GLE, más cargadas negativamente estarán las nanopartículas. Estas cargas negativas dan estabilidad a las nanopartículas, impidiendo la agregación y la aglomeración.

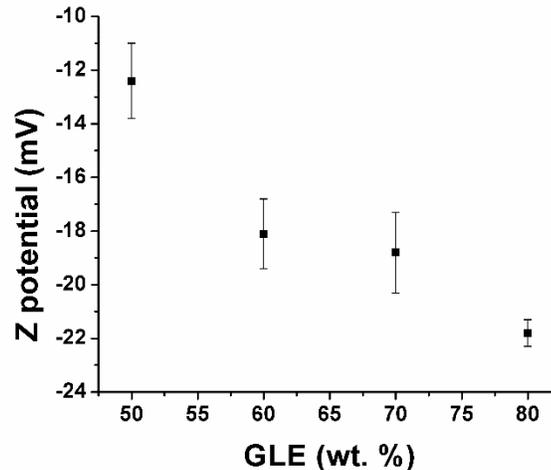


Figura 3.42. Potencial zeta de las AgNPs sintetizadas con 5% de AgSt y diferentes contenidos de GLE en el sistema.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que este método verde puede ser utilizado en la preparación de nanopartículas de plata de tamaño controlado. El tamaño de las nanopartículas está relacionado con las microemulsiones o nano-emulsiones utilizadas como plantilla.

Se obtienen nanopartículas de tamaño más grande en la zona bicontinua pero también usando porcentajes de precursor metálico superiores a 5 %; las microestructuras encontradas con la medición de la conductividad están de acuerdo con los resultados obtenidos.

Las nano-emulsiones O/W son una buena alternativa para preparar diferentes tamaños de nanopartículas, pero el sistema de microemulsión controla mejor el

tamaño de las nanopartículas de plata. El método de síntesis O/W también es más respetuoso con el medio ambiente porque la fase continua es agua.

Contenidos bajos de precursor metálico forman nanopartículas con tamaños menores, el análisis infrarrojo y de potencial zeta arrojan que las biomoléculas se adsorben sobre la superficie metálica de la nanopartícula confiriéndoles carga negativa lo cual hace que sean estables en suspensión coloidal.

# Capítulo 4 CONCLUSIONES GENERALES

Diversos sistemas fueron empleados para llevar a cabo la síntesis de partículas de plata, utilizando componentes de baja toxicidad.

El extracto de hojas de *P. hortorum* muestra ser eficaz en la reducción de los iones metálicos, debido a la presencia de polifenoles y flavonoides. Además la presencia de proteínas permite estabilizar a las nanopartículas sintetizadas.

Las mezclas ternarias libres de tensoactivo no permiten controlar el tamaño de las partículas de plata, sin embargo, dependiendo de las condiciones de síntesis se pueden obtener distintos tamaños.

La adición de hidróxido de sodio causa cambios en el tamaño de las partículas, mostrando que al variar la concentración de este el tamaño también se modifica. Aunado a lo anterior, el reductor GLE+NaOH genera nanopartículas del orden de 10 nm.

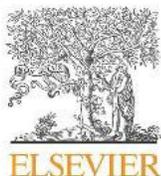
El uso de tensoactivos mejora el control sobre la forma y tamaño de las nanopartículas. Así, al variar la cantidad de reductor el tamaño de las nanopartículas puede ser modulado. Se obtienen nanopartículas de plata con mayores tamaños al utilizar nano-emulsiones que cuando se utilizan microemulsiones como medios de reacción.

Las estrategias sintéticas mostradas en este trabajo resultan ser fáciles de realizar y eficaces para la obtención de distintos tamaños de partículas de plata de una manera amigable con el ambiente. En comparación con otros métodos químicos

como la reducción con borohidruro en donde la humedad, temperatura, agitación, pH y demás parámetros necesitan ser controlados para obtener poblaciones de nanopartículas monodispersas.

# ANEXO

**Artículo publicado en la revista: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.**



## Green synthesis of silver nanoparticles in oil-in-water microemulsion and nano-emulsion using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent

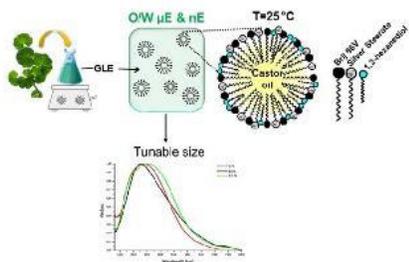
Ruben Dario Rivera-Rangel<sup>a</sup>, M. Pilar González-Muñoz<sup>a,\*</sup>, Mario Avila-Rodriguez<sup>a</sup>,  
Teresa Alejandra Razo-Lazcano<sup>a</sup>, Conxita Solans<sup>b</sup>

<sup>a</sup> University of Guanajuato, Department of Chemistry, Cerro de la Venada s/n, 36040, Guanajuato, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034, Barcelona, Spain



### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Plant extract  
Silver nanoparticles  
Microemulsion  
Nano-emulsion  
Green synthesis

### ABSTRACT

A green synthesis of silver nanoparticles was developed, using a low-toxic system of microemulsion and nano-emulsion with castor oil as the oily phase, Brij 96 V and 1,2-hexanediol as the surfactant and co-surfactant respectively. Geranium (*P. hortorum*) leaf aqueous extract was employed as a reducing agent. The content and concentration of a metallic precursor and geranium leaf extract (GLE) in the systems used makes it possible to obtain different sizes of silver nanoparticles from 25 to 150 nm. The characterization by FTIR and Z potential shows that the biomolecules of the plant extract act as a reducing and capping agent, giving negative charges to the nanoparticle surface. The present study represents a contribution to the green synthesis of silver nanoparticles that can be extended to other metals.

### 1. Introduction

Several methods for noble metal (Au, Ag, Pt and Pd) nanoparticle synthesis are reported in the literature [1]. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most popular materials among noble metal nanoparticles due to their unique chemical and physical properties and versatile applications in many fields (medicine, electronic devices, catalysis, antimicrobial agent, inks, sensors and many others [2,3]). Usually AgNPs are prepared by physical or chemical methods, ultrasound-assisted

processes, laser ablation, electrochemical and thermal decomposition, chemical reduction, etc. [2]. One of the easiest and lowest-cost processes is the chemical method, which is based on a redox reaction. The right choice of the reducing agent and control in synthesis parameters guarantees the production of nanoparticles. However, alternatives to these chemical methods have been developed recently, substituting the common reducing agents with natural antioxidant compounds. These methods are called “green synthesis” because they follow the green chemistry principles.

\* Corresponding author.

E-mail address: [gomupí@ugto.mx](mailto:gomupí@ugto.mx) (M.P. González-Muñoz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.051>

Received 29 October 2016; Received in revised form 12 July 2017; Accepted 14 July 2017

Available online 22 July 2017

0927-7757/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Green synthesis of silver nanoparticles using microorganisms and plant extracts has been studied, the latter method being the best alternative to obtain these nanomaterials due to the ease and efficacy in the reduction of metal ions by the biomolecules present in plant extracts [4]. Consequently, the process involves no chemicals that are hazardous for the environment and living organisms. The *Pelargonium hortorum* plant, better known as geranium or storksbill, is widely distributed around the world due to its adaptability to different climates. For this reason, *P. hortorum*, is an excellent option for consideration as a source of reducing agents for silver nanoparticle synthesis. Jafarizad et al. [5] reported the use of mint and *P. hortorum* extracts for producing gold nanoparticles with sizes in the interval of 10–100 nm. The characterization of these extracts showed that the main reducing agents are Isoeugenol and Spathulenol, present in mint; and flavonoids, phenols and tannins from the *Pelargonium* extract. Sastry et al. [6] report the use of *Pelargonium graveolens* for synthesizing silver nanoparticles, with sizes ranging from 16 to 40 nm. Mirończyk et al. [7] obtained gold nanoparticles (2–80 nm) by using extract of *P. hortorum* leaves, but multiple morphologies were obtained (spherical, triangular and hexagonal particles). When the sonocatalytic effect is added to the reducing effect of the *P. hortorum* extract, gold nanoparticles measuring between 8 and 20 nm, can be obtained [8]. Thus, extracts obtained from *Pelargonium* species have proven effective in obtaining nanomaterials. However, one of the great disadvantages is the polydispersity of sizes of the nanoparticles obtained because the dependency of the medium conditions [9]. Emulsion systems have been reported as template for nanoparticle production. Sivakumar et al. [10,11] formulated a W/O emulsion composed by natural oil (rapeseed oil) without the use of surfactants using the ultrasound assisted emulsification method, in the case of the synthesis of nanocrystals of zinc and manganese ferrites. The use of microemulsions as nano-reactors has proven to be an effective method to avoid or diminish the polydispersity in the size of nanoparticles synthesized [12]. This method presents advantages compared with the emulsion system since low energy input is needed for the nanoparticle formation. Reports indicate that the concentration of the metallic precursor, the reducing power of the reducing agent, and the amount of phase dispersed in these systems are the keys to controlling size and obtaining monodisperse nanoparticle populations [13]. Water-in-oil (W/O) and oil-in-water (O/W) microemulsions are used for production of metal nanoparticles [14,15] and interestingly it has been reported that O/W microemulsions are advantageous in obtaining stable nanoparticle dispersions and also represent a more eco-friendly way for nanoparticle production because the aqueous phase is the major component [16]. In recent years, nano-emulsions have shown their effectiveness as templates for the production of nanoparticles [17], solid lipid nanoparticles [18], polymeric nanoparticles [19], metallic nanoparticles [20–23] and other nanomaterials [24]. Nevertheless, to the best of our knowledge this paper is the first report where a plant extract is used as a reducing agent in a microemulsion and nano-emulsion system to synthesize silver nanoparticles, because the systems used up to now for preparing metallic nanoparticles have been composed mostly of organic solvents with high volatility and surfactants that are not environmentally friendly [3]. New studies are emerging in which these petroleum-based oils are replaced by vegetable oils and surfactants with low or no toxicity for the environment, thus offering new options in microemulsion formulation [25,26]. Vegetable oils are made up of mixtures of long-chain triglycerides, and until now it has been a challenge to find systems with a large microemulsion zone due to the structural complexity of natural oils compared with common microemulsion systems where linear hydrocarbons are used as the oil phase; because the interphases are stabilized better due to a greater structural compatibility between the surfactant and the oil. De Castro Dantas et al. [27] have reported the formation of microemulsions using vegetable oils as oily phases. The microemulsion zone reported in the corresponding phase diagram is very small, due mainly to the structural complexity of oils used. The study of microemulsion formation in

systems with vegetable oils and plant extracts is important for the development of new and green reaction media for the production of metal nanoparticles with controlled size in an ecofriendly way and using soft reaction conditions.

This paper proposes a new methodology for producing silver nanoparticles in a greener way using microemulsions and nano-emulsions formulated with low-toxic components for the environment and living organisms. Thus, in the present research a new microemulsion and nano-emulsion system was used as a nano-reactor for synthesizing silver nanoparticles, with castor oil, Brij 96 V and 1,2-hexanediol as the surfactant and con-surfactant respectively and geranium leaf aqueous extract as the reducing agent. Microemulsion and nano-emulsion formation was determined by means of phase diagrams. The nanoparticles obtained were characterized by UV-vis, FT-IR, zeta potential and dynamic light scattering (DLS). The sizes of the nanoparticles obtained have been related to those of the template microemulsions and nano-emulsions, taking into account the amount of aqueous phase in the system.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

Castor oil (commercial sample), silver stearate from MP Biomedicals, 1–2 hexanediol (purity  $\geq 98.0\%$ ) and Brij 96V<sup>®</sup> were obtained from Sigma Aldrich. Dry leaves of *Pelargonium hortorum* (geranium) were used to prepare the extract. The aqueous phases were prepared using Milli-Q water from a Millipore system with a resistivity of  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2. Ternary phase diagram

The phase behavior was studied by means of a ternary phase diagram to determine the monophasic zone of the system corresponding to microemulsions and also a delimited zone in the multiphasic zone corresponding to nano-emulsions. The titration of defined mixtures of oil and surfactant with the aqueous phase was performed using vortex mixing. All the samples were kept in a bath at a temperature of 25 °C. The aqueous phases used contained Milli-Q water and geranium leaf extract (GLE).

### 2.3. Conductivity

Conductivity measurements were performed with a Crison conductometer GLP31 with a cell constant of  $1 \text{ cm}^{-1}$  and with controlled temperature. The conductivity was measured along the dilution line of surfactant:oil (S:O) weight ratio of 35/65 adding the aqueous phase drop by drop to the mixture S:O in order to study the microstructure of the system (Water/1,2-hexanediol:Brij 96 V 1:1/castor oil).

### 2.4. Preparation of *P. hortorum* leaf aqueous extract

*P. hortorum* plant was purchased in a local market. The leaves were rinsed with deionized water and then put in the oven to dry at 60 °C for 12 h. 2 g of dry geranium leaves were put in contact with 50 mL of boiling Milli-Q water for five minutes. Once the mixture reached room temperature, it was centrifuged at 5000 rpm for 15 min and then filtered with a nylon membrane with a pore size of 0.22  $\mu\text{m}$  to obtain a cell free aqueous extract. The GLE was stored in a freezer (0 °C) until use.

### 2.5. Nanoparticle synthesis and characterization

The syntheses were carried out in oil-in-water (O/W) microemulsions and nano-emulsions by mixing the right amounts of the reagents to obtain the desired composition. The silver stearate was used at 1 and 2.5 mM. This compound was solubilized in oil. The nano-emulsions were made by a low-energy emulsification method [28] consisting of

the slow addition of the aqueous phase to a surfactant/oil mixture with constant agitation and temperature.

To synthesize the silver nanoparticles in O/W microemulsions, the geranium leaf extract (aqueous component) was added to a mixture of the surfactant, co-surfactant, oil and metallic precursor until completing 2 g of the right composition (see Table 1 with the amounts for the compositions used). When nano-emulsions were used as a template, the mixture (oil, co-surfactant and surfactant) was titrated with the GLE until the desired amount of aqueous phase was added under vortex agitation (see Table 1). The reaction mixture was kept at 25 °C during 24 h to be sure that the reaction was complete. After the synthesis was finished, the nanoparticles were separated by centrifugation and subjected to several washings with acetone, ethanol and water.

### 2.5.1. DLS

The hydrodynamic radius of nano-emulsion droplets and silver nanoparticles was measured by dynamic light scattering using a spectrometer (LS instruments, 3D cross correlation multiple-scattering) equipped with a He-Ne laser (632.8 nm) at a scattering angle of 90° and at a temperature of 25 °C. The data were treated by cumulant analysis.

### 2.5.2. Zeta potential

The zeta potential of the nanoparticles was determined with a Zetasizer NanoZS instrument from Malvern Co. Ltd., UK equipped with a He-Ne laser. Zeta potential values are determined from the electrophoretic mobility of the particles with the laser Doppler technique. The samples were dispersed in milli Q water with a pH of 5.7.

### 2.5.3. UV-vis spectrophotometry

The UV-vis spectra were measured in a spectrophotometer Cary300 from Agilent equipped with a double channel and using a cell with a 1 cm path length, to determine the production of silver nanoparticles.

### 2.5.4. FTIR spectrophotometry

The FTIR spectra were recorded on a Nicolet spectrometer equipped with an ATR.

### 2.5.5. Scanning transmission electron microscopy (STEM)

STEM measurements of the AgNPS were performed using a ZEISS electron microscope, operating at 10 kV. A drop of the sample was placed on a copper grid coated with a carbon film. The sample was then air-dried and its electron micrograph was recorded.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phase behavior

In order to obtain a low-toxic system for nanoparticle synthesis, a variety of non-ionic surfactants and co-surfactants used in pharmacy,

**Table 1**

Compositions used for the synthesis of silver nanoparticles in O/W microemulsions and nano-emulsions.

System	Aqueous phase (wt.%)	Surfactant (wt.%)	Castor oil (wt.%) <sup>*</sup>
Microemulsion	50	45	5
Microemulsion	60	35	5
Nano-emulsion	70	25	5
Nano-emulsion	80	15	5
Microemulsion	50	40	10
Nano-emulsion	60	30	10
Nano-emulsion	70	20	10
Nano-emulsion	50	35	15
Nano-emulsion	60	25	15
Nano-emulsion	50	30	20

\* The amount of castor oil is also related to the amount of metallic precursor in the system.

cosmetics and food applications were tested. The system selected was Aqueous phase/Brij 96 V:1,2-hexanediol (1:1)/Castor oil; the aqueous phases used were Milli-Q water and GLE. The addition of the GLE and metallic precursor do not produce any change in the phase behavior of the zone used for nanoparticle synthesis. A nano-emulsion zone was found in the system when the aqueous phase percentages were higher than 50 wt.% and the amount of surfactant was less than 40 wt.%. This zone of nano-emulsion was differentiated because some energy (vortex agitation) was needed for the preparation, also because nano-emulsions cannot be prepared as microemulsions are, by mixing the components of a desired composition in one step. The nano-emulsions used in this study showed a high degree of stability, with no phase separation or any important changes in droplet size over seven days. Therefore, this system is suitable for nanoparticle synthesis and could also be used for other applications as the components present low toxicity to the environment.

Compared with other systems with different natural oils and ionic liquids in their compositions [26,29–31], this system appears to present a larger monophasic microemulsion zone (Fig. 1).

### 3.1.1. Conductivity measurements

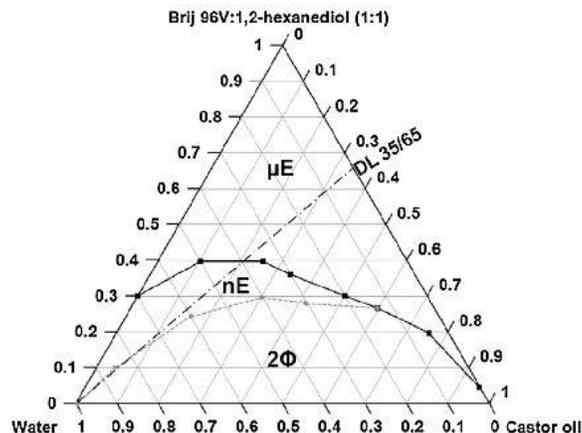
The microstructures present in the system were studied along the dilution line DL35/65. The results of the electrical conductivity measurements are shown in Fig. 2. According to the results of Fig. 2, it can be seen that there are 3 different slopes (3 zones). W/O microemulsions are formed with aqueous phase contents lower than 15–25 wt.% depending on the nature of the aqueous phase. A further content of aqueous phase leads to a change in the slope of the conductivity curve between 25 and 55 wt.%. When more than 55 wt.% of water phase is added to the system, another change in the slope is registered, associated with a change in the microstructure. The change in the slope suggests a transition from a water-in-oil (W/O) to a bicontinuous (BC) structure and then to an oil-in-water (O/W) structure [32,33].

### 3.2. Synthesis of silver nanoparticles and characterization

This study looked at the formation of silver nanoparticles by microemulsion and nano-emulsion media using geranium leaf aqueous extract as a reducing agent. The results indicate that the nanoparticles have the properties of the nano-template used during the synthesis, meaning size and shape. The change in color from pale yellow to a reddish color and a band near 450 nm in the UV-vis spectrum demonstrate the production of silver nanoparticles of different sizes.

### 3.2.1. Reactivity in the system

The reactivity was measured along the dilution line of the oil/



**Fig. 1.** Pseudo-ternary phase diagram of the system Water/Brij 96 V:1,2-hexanediol (1:1)/Castor oil at 25 °C.  $\mu$ E: microemulsion zone, nE: nano-emulsion zone, 2 $\Phi$ : multi-phasic zone.

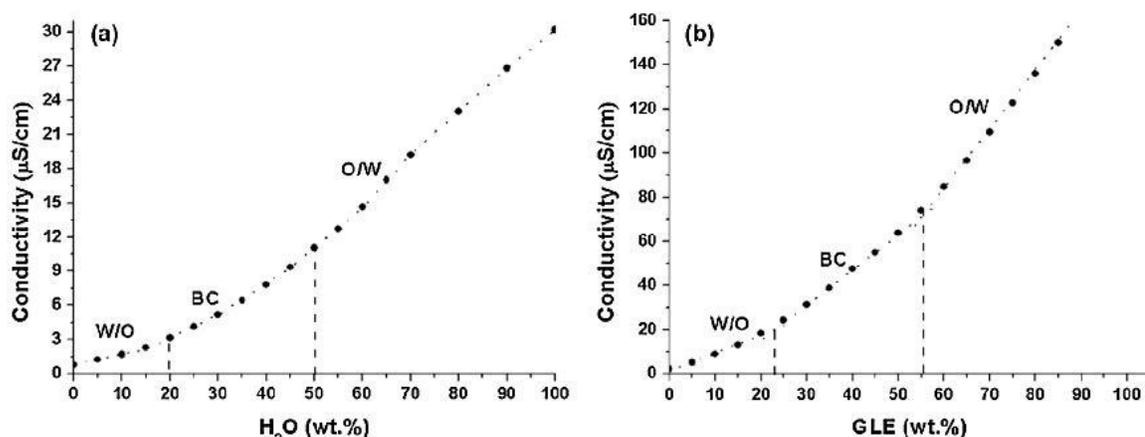


Fig. 2. Conductivity of the system along the dilution line DL35/65 as a function of aqueous phase content, (a) using water as the aqueous phase and (b) GLE as the aqueous phase.

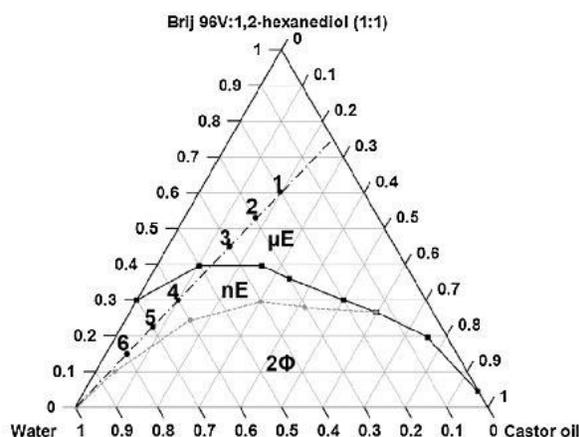


Fig. 3. Pseudo ternary phase diagram of the system used for AgNps synthesis using GLE as a reducing agent; the numbers indicate the compositions used for nanoparticle production.  $\mu$ E: microemulsion, nE: nano-emulsion, 2 $\Phi$ : multiphasic zone. The numbers indicate the compositions used for the synthesis.

**Table 2**  
Hydrodynamic radius of the nanoparticle obtained for the different compositions used for nanoparticle production.

Composition	GLE (wt.%)	$R_h$ (nm)
1	20	$10 \pm 2.6$
2	30	$12.3 \pm 2.5$
3	40	$33.7 \pm 2$
4	60	$22.1 \pm 2.7$
5	70	$13.4 \pm 0.1$
6	80	$9.4 \pm 1.8$

surfactant ratio of 0.33 (Fig. 3) using silver stearate at a concentration of 1 mM and GLE. This experiment shows that the size of the nanoparticles is related to the synthesis template. The nanoparticles obtained with water-in-oil microemulsions increased their size from 10 to 12.3 nm as the amount of aqueous phase increased. On the other hand, the synthesis in oil-in-water nano-emulsions revealed that the size could also be modulated, obtaining sizes from 22 to 9 nm, by changing the aqueous phase content, as seen in Table 2. The larger size (33.7 nm) was found in the region where bicontinuous structures were detected with conductivity measurements (composition 3). The small sizes were found when nano-emulsion media were used due to a significant content of GLE and consequently a large number of biomolecules that can reduce the silver ions, which accelerated the reaction and produced small particles [34].

The variation of the nanoparticles' surface resonance plasmon

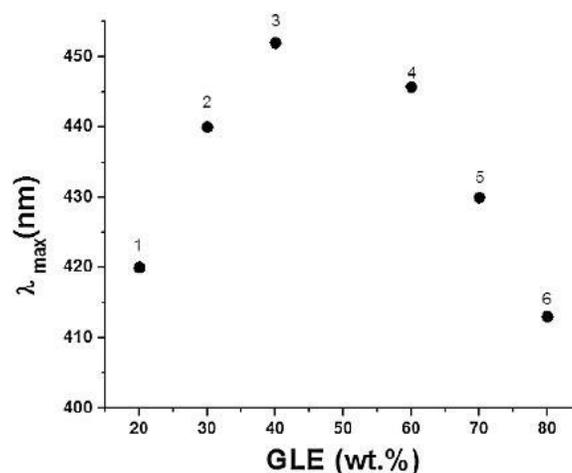


Fig. 4. Graph of the maximum absorbance variation corresponding to the surface plasmon resonance of the silver nanoparticles obtained as a function of the amount of aqueous phase (GLE wt.%) used in each of the compositions 1–6.

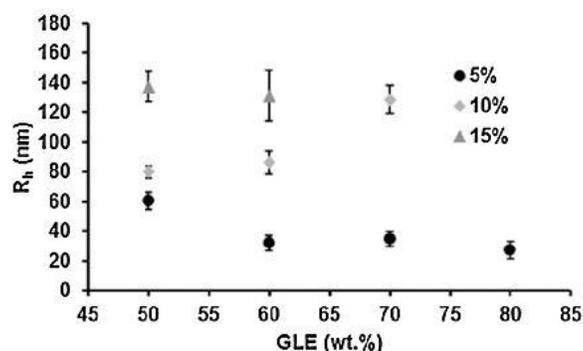


Fig. 5. Hydrodynamic radius of silver nanoparticles synthesized with different metallic precursor contents as a function of the content of aqueous phase present in the system.

position (maximum wavelength of the UV–vis spectrum) (Fig. 4) along the line indicated in Fig. 3 gives evidence of the different microstructures present there. It is important to note that according to the graph in Fig. 4 and the particle sizes obtained through DLS (Table 2), the largest-sized nanoparticles are obtained in the bicontinuous zone (25–55 wt.% of GLE), due to the absence of compartmentalized structures such as W/O drops (GLE content up to 25 wt.%) and O/W drops (GLE content greater than 55 wt.%).

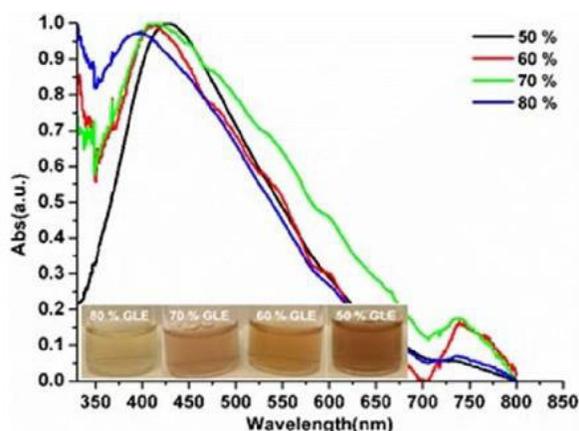


Fig. 6. UV-vis spectra and photographs of silver nanoparticles synthesized with different amounts of aqueous phase in the system using 5 wt.% of metallic precursor at a concentration of 1 mM.

3.2.2. Influence of GLE content on the system

By increasing the amount of GLE in the system, the particle size obtained decreases; however this is only valid when 5 wt.% of metallic precursor is used in the system. Yet if the percentage of silver stearate is gradually increased in the system, the size also increases, as can be seen in Fig. 5. The small sizes are due to a lower content of silver atoms (less than 5 wt.% of AgSt) so the nanoparticles cannot increase their size; the opposite applies for the higher concentrations used (10 and 15 wt.%).

Fig. 6 shows the spectra when 5 wt.% of metallic precursor is used; it also presents the color of dispersions of silver nanoparticles in water for the different compositions used for their synthesis and the STEM images in Fig. 7. The color of the dispersions of the smallest sizes of

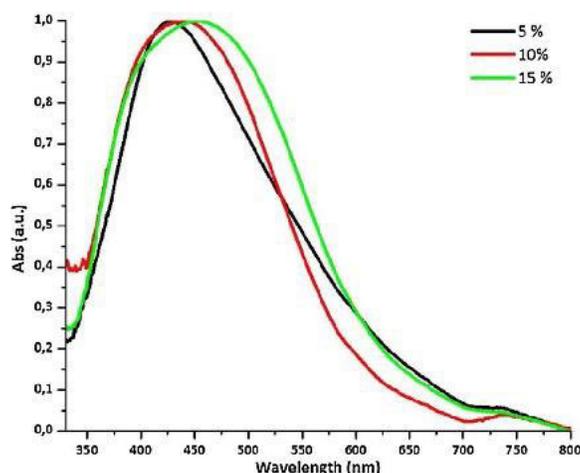


Fig. 8. UV-vis spectra of silver nanoparticles synthesized with different amounts of AgSt at a concentration of 2.5 mM in the system using 50 wt.% of GLE.

silver nanoparticles is light yellow while the bigger sizes present a reddish color [35].

It is well known that the size and shape of the nanoparticles are related to the wavelength of absorption and the form of the band of the UV-vis spectrum due to the resonance of the surface plasmon [36]. As can be seen in Fig. 6, these spectra correspond to the spherical-like shape of the different-sized nanoparticles. The spectrum undergoes a displacement towards shorter wavelengths as the aqueous phase percentage in the system increases. The images of Fig. 7 reveal the spherical shape of the nanoparticles and also the influence of the GLE content, which agrees with the UV-vis spectra obtained. In addition, it

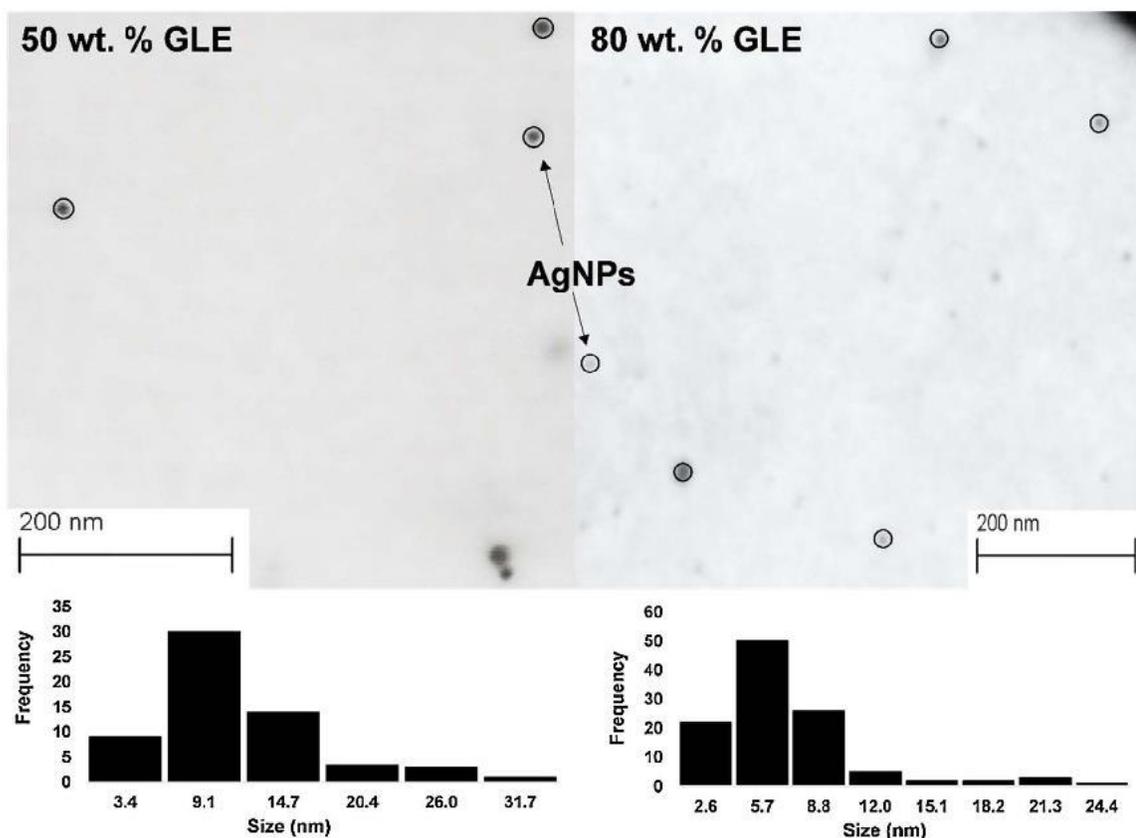


Fig. 7. STEM images for the nanoparticles synthesized with 5 wt.% of AgSt and 50 wt.% (left) and 80 wt.% (right) of GLE. In circles are covered the AgNPs and in the bottom part of the image the particle size distributions are shown.

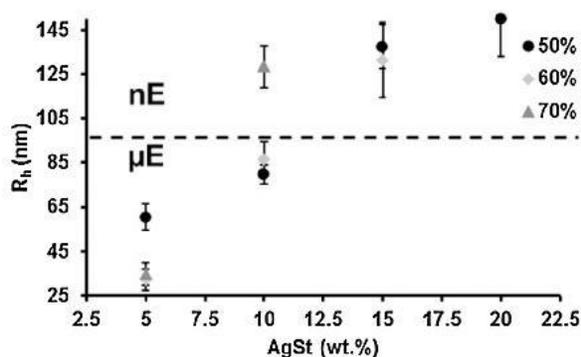


Fig. 9. Hydrodynamic radius of silver nanoparticles synthesized with different GLE contents as a function of the content of the metallic precursor AgSt present in the system.

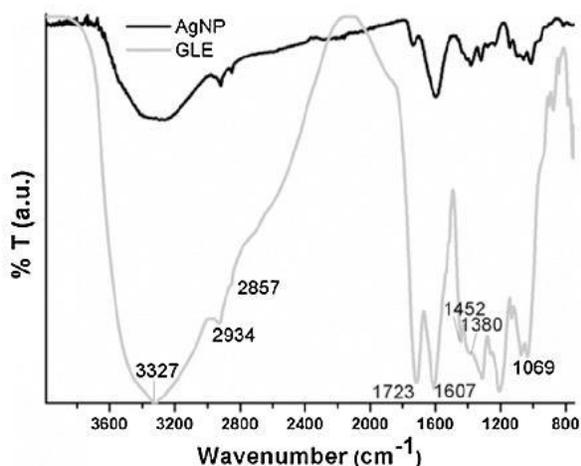


Fig. 10. FTIR spectra of the synthesized AgNPs and spectra of the GLE used for nanoparticle synthesis.

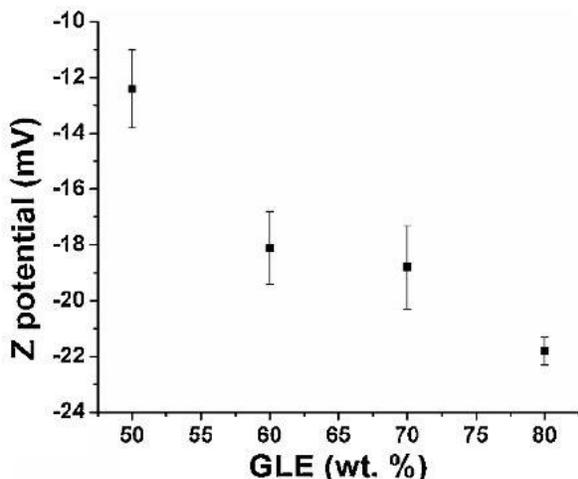


Fig. 11. Zeta potential of the AgNPs synthesized with 5 wt.% of AgSt and different GLE contents in the system.

is evident that the nanoparticles synthesized with a 50 wt.% of GLE (microemulsion) show more homogeneous sizes and shapes when compared to those obtained with an 80 wt.% of GLE (nano-emulsion). The sizes obtained from the micrographs are  $15.7 \pm 7.3$  nm and  $8.6 \pm 4.3$  nm respectively. It is possible, however, to control the size using both systems.

### 3.2.3. Influence of silver stearate (AgSt) concentration

When the concentration of AgSt increases to 2.5 mM, a very similar trend in the synthesis of nanoparticles was observed for all tested microemulsions and nano-emulsions from 5 to 20 wt.% of metallic precursor and 50–70 wt.% of aqueous phase present in the compositions. The obtained particle size increases with the increase of content of metallic precursor and also by increasing the amount of GLE, so a displacement to longer wavelengths is observed in the UV–vis spectrum absorption of the nanoparticles synthesized with a higher content of metallic precursor (see Fig. 8). It can also be seen that the nanoparticles obtained in microemulsion media present the smallest particle sizes and less size dispersion in comparison with those obtained with nano-emulsions as the template (see Fig. 9), probably due to the difference in the flexibility of the interfacial film of the nano-emulsions and micro-emulsions.

### 3.3. FTIR analysis

*P. hortorum* extract is composed primarily of polyphenols, flavonoids and monoterpenes [7]. It has been found that the major components in geranium leaf extracts are geraniol and citronellol [37]. These molecules exhibit high antioxidant power and have been described in the literature as responsible for the reduction of the metal ions. Fig. 10 shows the FTIR spectra of synthesized AgNPs and GLE. The spectrum of GLE and AgNPs exhibits the same bands at 3327, 2934, 2857, 1723 and 1607  $\text{cm}^{-1}$ ; these bands were assigned to a hydroxyl (-OH) bounded to a polymeric chain such as polyphenol and flavonoid and amine from proteins (-NH) at 3327  $\text{cm}^{-1}$ . The vibrations of methyl and methylene of the hydrocarbon chains are located at 2857 and 2934  $\text{cm}^{-1}$  respectively; the signals at 1723 and 1607  $\text{cm}^{-1}$  are from carbonyl groups from different compounds. The band at 1723  $\text{cm}^{-1}$  was assigned to a carboxylic acid group and the signal at 1607  $\text{cm}^{-1}$  to a carbonyl of amide I. The major change between the spectra occurs in the signals of the carbonyl group at 1723  $\text{cm}^{-1}$ , maybe because it is involved in the reduction reaction or is adsorbed onto the nanoparticle surface. The other signal of carbonyl of amide I determines the presence of proteins in the extract that are also on the nanoparticle surface, most likely acting as stabilizing agents.

From the analysis above and according to the literature, the molecules responsible for the reduction of the silver ions could be the flavonoids and polyphenols present in the aqueous extract and the proteins covering the nanoparticle surface.

### 3.4. Zeta potential

Zeta potential measurements were performed to confirm that the surface of the nanoparticle was covered by biomolecules from the GLE, and that these conferred an electrical charge that let the nanoparticles remain in colloidal suspension. It was found (Fig. 11) that the Zeta potential of the AgNPs increases as the content of GLE increases, so the higher the content of GLE biomolecules present in the system, the more negatively charged are the nanoparticles. These negative charges give stability to the nanoparticles, preventing aggregation and agglomeration.

## 4. Conclusions

The results obtained demonstrate that this green method could be used in the preparation of controlled-sized silver nanoparticles. The size of the nanoparticles is related to the template microemulsions or nano-emulsions. Larger-sized nanoparticles are obtained in the bicontinuous zone but also using percentages of metallic precursor higher than 5 wt. %; the microstructures found with the measurement of the conductivity are in agreement with the results obtained.

O/W nano-emulsions are a good alternative for preparing different sizes of nanoparticles, but the microemulsion medium controls the size

of the silver nanoparticles better. The O/W synthesis method is also more ecofriendly because the continuous phase is water.

Low contents of metallic precursor form nanoparticles with smaller sizes and the nanoparticle surface is modified with biomolecules of the geranium leaf extract.

## Acknowledgements

Ruben Dario Rivera-Rangel wants to thank to CONACyT for the Ph.D scholarship and C. Solans and their group for the support during the realization of this work. The authors want to thank LACAPFEM-UG- UAA-CONACyT National Laboratory for the STEM analysis.

## References

- [1] K. Jiang, A.O. Pinchuk, Noble metal nanomaterials: synthetic routes, fundamental properties, or promising applications, *Solid State Phys.—Adv. Res. Appl.* (2015) 131–211, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ssp.2015.02.001>.
- [2] K.M.M. Abou El-Nour, A. Eftaiba, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arab. J. Chem.* 3 (2010) 135–140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabj.2010.04.008>.
- [3] A. Schröfel, G. Kratošová, I. Šafařík, M. Šafaříková, I. Raška, L.M. Shor, Applications of biosynthesized metallic nanoparticles—a review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4023–4042, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.022>.
- [4] D. Hebbalalu, J. Lalley, M.N. Nadagouda, R.S. Varma, Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1 (2013) 703–712, <http://dx.doi.org/10.1021/sc4000362>.
- [5] A. Jafarizad, K. Safaee, S. Gharibian, Y. Omid, D. Ekinci, Biosynthesis and in-vitro study of gold nanoparticles using mentha and pelargonium extracts, *Procedia Mater. Sci.* 11 (2015) 224–230, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mspro.2015.11.113>.
- [6] S.S. Shankar, A. Ahmad, M. Sastry, Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1627–1631, <http://dx.doi.org/10.1021/bp034070w>.
- [7] A. Mirończuk, A. Timoszyk, J.J. Koziol, Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using pelargonium zonale extract, *Jökull J.* 65 (2015) 300–309 <http://www.jokulljournal.com/issue.php?v=65&t=2>.
- [8] M. Franco-Romano, M.L.A. Gil, J.M. Palacios-Santander, J.J. Delgado-Jaén, I. Naranjo-Rodríguez, J.L. Hidalgo-Hidalgo De Cisneros, L.M. Cubillana-Aguilera, Sonosynthesis of gold nanoparticles from a geranium leaf extract, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 1570–1577, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ulsonch.2014.01.017>.
- [9] O.V. Kharissova, H.V.R. Dias, B.I. Kharisov, B.O. Pérez, V.M.J. Pérez, The greener synthesis of nanoparticles, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 240–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>.
- [10] M. Sivakumar, T. Takami, H. Ikuta, A. Towata, K. Yasui, T. Tuziuti, T. Kozuka, D. Bhattacharya, Y. Iida, Fabrication of zinc ferrite nanocrystals by sonochemical emulsification and evaporation: observation of magnetization and its relaxation at low temperature, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 15234–15243, <http://dx.doi.org/10.1021/jp055024c>.
- [11] M. Sivakumar, A. Towata, K. Yasui, T. Tuziuti, T. Kozuka, Y. Iida, M.M. Maiorov, E. Blums, D. Bhattacharya, N. Sivakumar, M. Ashok, Ultrasonic cavitation induced water in vegetable oil emulsion droplets—a simple and easy technique to synthesize manganese zinc ferrite nanocrystals with improved magnetization, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 652–658, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ulsonch.2011.10.015>.
- [12] J. Eastoe, M.J. Hollamby, L. Hudson, Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 128–130 (2006) 5–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.009>.
- [13] J.N. Solanki, Z.V.P. Murthy, Controlled size silver nanoparticles synthesis with water-in-oil microemulsion method: a topical review, *Ind. Eng. Chem. Res.* 50 (2011) 12311–12323, <http://dx.doi.org/10.1021/ie201649x>.
- [14] M. Sanchez-Dominguez, M. Boutonnet, Synthesis of nanostructured catalytic materials from microemulsions, *Catalysts* (2015), <http://dx.doi.org/10.3390/catal610004>.
- [15] M. Sanchez-Dominguez, K. Pemartin, M. Boutonnet, Preparation of inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: a soft and versatile approach, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.007>.
- [16] M. Sanchez-Dominguez, K. Pemartin, M. Boutonnet, Preparation of inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: a soft and versatile approach, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 297–305, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.06.007>.
- [17] N. Anton, J.P. Benoit, P. Saulnier, Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review, *J. Control. Release* 128 (2008) 185–199, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>.
- [18] L. Montenegro, F. Lai, A. Offerta, M.G. Sarpietro, L. Micicché, A.M. Maccioni, D. Valenti, A.M. Fadda, From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: a relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32 (2016) 100–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.003>.
- [19] C. Fornaguera, A. Dols-Perez, G. Calderó, M.J. García-Celma, J. Camarasa, C. Solans, PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier, *J. Control. Release* 211 (2015) 134–143, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.002>.
- [20] R. Schiller, C.K. Weiss, K. Landfester, Phase stability and photocatalytic activity of Zr-doped anatase synthesized in miniemulsion, *Nanotechnology* 21 (2010) 405603, <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/21/40/405603>.
- [21] Z.H. Han, B. Yang, Y. Qi, J. Cumings, Synthesis of low-melting-point metallic nanoparticles with an ultrasonic nanoemulsion method, *Ultrasonics* 51 (2011) 485–488, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2010.11.015>.
- [22] H. Liu, P. Hou, W. Zhang, J. Wu, Synthesis of monosized core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au multifunctional nanoparticles by PVP-assisted nanoemulsion process, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 356 (2010) 21–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.12.023>.
- [23] Z. Cao, H. Chen, S. Zhu, Z. Chen, C. Xu, D. Qi, U. Ziener, Inverse miniemulsion-based preparation of raspberry-like Au/SiO<sub>2</sub> nanocomposite particles with high catalytic activity towards reduction of p-nitrophenol, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 489 (2016) 223–233, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.11.001>.
- [24] P. Riachy, M.J. Stébé, B. Lebeau, A. Pasc, L. Vidal, J.L. Blin, Nano-emulsions as imprints for the design of hierarchical porous silica through a dual templating mechanism, *Microporous Mesoporous Mater.* 221 (2016) 228–237, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.09.048>.
- [25] A. Wang, L. Chen, D. Jiang, Z. Yan, Phase behavior of vegetable oil-based ionic liquid microemulsions, *J. Chem. Eng. Data* 59 (2014) 666–671, <http://dx.doi.org/10.1021/je400595k>.
- [26] A. Wang, L. Chen, D. Jiang, Z. Yan, Vegetable oil-based ionic liquid microemulsions and their potential as alternative renewable biolubricant basestocks, *Ind. Crops Prod.* 51 (2013) 425–429, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.039>.
- [27] T. Neuma De Castro Dantas, A.C. Da Silva, A.A.D. Neto, New microemulsion systems using diesel and vegetable oils, *Fuel* 80 (2001) 75–81, [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-2361\(00\)00068-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-2361(00)00068-5).
- [28] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. García-Celma, Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 102–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>.
- [29] N. Lidich, A. Aserin, N. Garti, Structural characteristics of oil-poor dilutable fish oil omega-3 microemulsions for ophthalmic applications, *J. Colloid Interface Sci.* 463 (2016) 83–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.10.024>.
- [30] A. Wang, L. Chen, D. Jiang, H. Zeng, Z. Yan, Vegetable oil-based ionic liquid microemulsion biolubricants: effect of integrated surfactants, *Ind. Crops Prod.* 62 (2014) 515–521, <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.031>.
- [31] A. Wang, L. Chen, F. Xu, Z. Yan, Phase behavior of epoxidized soybean oil-based ionic liquid microemulsions: effects of ionic liquids, surfactants, and co-surfactants, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 481 (2015) 500–505, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.042>.
- [32] H. Zhang, M. Taxipalati, F. Que, F. Feng, Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques, *Food Chem.* 141 (2013) 3050–3055, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.141>.
- [33] N. Garti, M. Avrahami, A. Aserin, Improved solubilization of celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 352–365, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2006.01.060>.
- [34] A. Henglein, M. Giersig, Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 9533–9539, <http://dx.doi.org/10.1021/jp9925334>.
- [35] D. Steinigeweg, S. Schlücker, Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol-water mixtures, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8682, <http://dx.doi.org/10.1039/c2cc33850e>.
- [36] T. Huang, X.N. Xu, S.T. Huang, Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 9867–9876, <http://dx.doi.org/10.1039/C0JM01990A>.
- [37] B.R.R. Rao, Chemical composition and uses of indian rose-scented geranium (Pelargonium species) essential oil—a review, *J. Essent. Oil Bear. Plants* 12 (2009) 381–394, <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643735>.

## Glossary

- Abs: Absorbance  
 Ag: Silver  
 Au: Gold  
 AgSt: Silver stearate

*AgNPs*: Silver nanoparticles  
*ATR*: Attenuated total reflectance  
*BC*: Bicontinuous  
*DLS*: Dynamic light scattering  
*FTIR*: Fourier transform infrared spectroscopy  
*g*: Gram  
*GLE*: Geranium leaf extract  
*h*: Hour  
*mL*: Milliliters  
*mM*: Millimolar  
*MΩ*: Mega-ohms  
*nE*: Nano-emulsion  
*nm*: Nanometers

*O/W*: Oil-in-water  
*Pt*: Platinum  
*Pd*: Palladium  
*rpm*: Revolutions per minute  
*R<sub>h</sub>*: Hydrodynamic radius  
*S:O*: Surfactant:oil ratio  
*STEM*: Scanning transmission electron microscopy  
*UV-vis*: Ultraviolet-Visible spectrophotometry  
*W/O*: Water-in-oil  
*°C*: Celsius degrees  
*μE*: Microemulsion  
*2φ*: Multiphasic  
*wt. %*: Weight percent

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Bréchnignac, P. Houdy, M. Lahmani, *Nanomaterials and nanochemistry*, 2007. doi:10.1007/978-3-540-72993-8.
- [2] A. Pacioni, N. Borsarelli, C. Rey, V. Veglia, *Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles*, in: E.I. Alarcon (Ed.), *Silver Nanoparticles Appl.*, Springer International Publishing, Switzerland, 2015: pp. 13–46. doi:10.1007/978-3-319-11262-6\_2.
- [3] T.J. Merkel, K.P. Herlihy, J. Nunes, R.M. Orgel, J.P. Rolland, J.M. Desimone, Scalable, shape-specific, top-down fabrication methods for the synthesis of engineered colloidal particles, *Langmuir*. 26 (2010) 13086–13096. doi:10.1021/la903890h.
- [4] M. Aliofkhazraei, *Handbook of Mechanical Nanostructuring*, 2015. doi:10.1002/9783527674947.
- [5] R. Kumar, S. Lal, *Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review*, *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.* 3 (2014) 1–11. doi:10.4172/2324-8777.1000150.
- [6] C.I.C. Crucho, M.T. Barros, *Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods*, *Mater. Sci. Eng. C*. 80 (2017) 771–784. doi:10.1016/j.msec.2017.06.004.
- [7] P. Pandey, M. Dahiya, *A BRIEF REVIEW ON INORGANIC NANOPARTICLES*, *J. Crit. Rev.* 3 (2016) 18–26.
- [8] C.P. Poole, F.J. Owens, *Introduction To Nanotechnology - Poole , Owens.pdf*, *Collect. Manag.* 21 (2003) 1–2. doi:10.1300/J105v21n01\_01.
- [9] G. Schmid, *Nanoparticles: From Theory to Application*, Wiley-VCH, 2005. doi:10.1002/3527602399.
- [10] C. Kästner, A.F. Thünemann, *Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol Using Silver Nanoparticles with Adjustable Activity*, *Langmuir*. 32 (2016) 7383–7391.

- doi:10.1021/acs.langmuir.6b01477.
- [11] Z. Cheng, G. Li, N. Zhang, H. Liu, A novel functionalized silver nanoparticles solid chemosensor for detection of Hg(ii) in aqueous media, *Dalt. Trans.* 43 (2014) 4762. doi:10.1039/c3dt52540f.
- [12] G. Doria, J. Conde, B. Veigas, L. Giestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa, P. V. Baptista, Noble metal nanoparticles for biosensing applications, *Sensors*. 12 (2012) 1657–1687. doi:10.3390/s120201657.
- [13] Y. Zhang, R. Huang, X. Zhu, L. Wang, C. Wu, Synthesis, properties, and optical applications of noble metal nanoparticle-biomolecule conjugates, *Chinese Sci. Bull.* 57 (2012) 238–246. doi:10.1007/s11434-011-4747-x.
- [14] A.J. Wilson, K.A. Willets, Surface-enhanced Raman scattering imaging using noble metal nanoparticles, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 5 (2013) 180–189. doi:10.1002/wnan.1208.
- [15] S. Kokura, O. Handa, T. Takagi, T. Ishikawa, Y. Naito, T. Yoshikawa, Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 570–574. doi:10.1016/j.nano.2009.12.002.
- [16] F.K. Alanazi, A.A. Radwan, I.A. Alsarra, Biopharmaceutical applications of nanogold, *Saudi Pharm. J.* 18 (2010) 179–193. doi:10.1016/j.jsps.2010.07.002.
- [17] J.B. Raoof, R. Ojani, E. Hasheminejad, S. Rashid-Nadimi, full-text, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 2788–2795. doi:10.1016/j.elsecon.2015.10.022.
- [18] R. Galindo, E. Mazario, S. Gutiérrez, M.P. Morales, P. Herrasti, Electrochemical synthesis of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Characterization and their catalytic applications, *J. Alloys Compd.* 536 (2012) S241–S244. doi:10.1016/j.jallcom.2011.12.061.
- [19] M.Z. Hu, C.E. Easterly, A novel thermal electrochemical synthesis method for production of stable colloids of “naked” metal (Ag) nanocrystals, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 726–736. doi:10.1016/j.msec.2009.01.018.
- [20] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M.P. Morales, P. Herrasti, Magnetite

- nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 3436–3441. doi:10.1016/j.electacta.2007.12.006.
- [21] R. a. Khaydarov, R.R. Khaydarov, O. Gapurova, Y. Estrin, T. Scheper, Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2008) 1193–1200. doi:10.1007/s11051-008-9513-x.
- [22] Z. Jian, Z. Xiang, W. Yongchang, Electrochemical synthesis and fluorescence spectrum properties of silver nanospheres, *Microelectron. Eng.* 77 (2005) 58–62. doi:10.1016/j.mee.2004.08.005.
- [23] X.-K. Wang, L. Shao, W.-L. Guo, J.-G. Wang, Y.-P. Zhu, C. Wang, Synthesis of dendritic silver nanostructures by means of ultrasonic irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 16 (2009) 747–751. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.03.005.
- [24] Y. Zhu, X. Wang, W. Guo, J. Wang, C. Wang, Sonochemical synthesis of silver nanorods by reduction of silver nitrate in aqueous solution, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 675–679. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.01.003.
- [25] J. Park, C.H. Hwang, W.Y. Lee, Y. Kim, H. Kim, I.-W. Shim, Preparation of size-tunable SnS nanoparticles by a sonochemical method under multibubble sonoluminescence conditions, 2014. doi:10.1016/j.matlet.2013.11.115.
- [26] R. Ferrando, J. Jellinek, R.L. Johnston, Nanoalloys: From theory to applications of alloy clusters and nanoparticles, *Chem. Rev.* 108 (2008) 845–910. doi:10.1021/cr040090g.
- [27] Y. Mizukoshi, K. Okitsu, Y. Maeda, T.A. Yamamoto, R. Oshima, Y. Nagata, Sonochemical Preparation of Bimetallic Nanoparticles of Gold/Palladium in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B.* 101 (1997) 7033–7037. doi:10.1021/jp9638090.
- [28] N. Misra, J. Biswal, A. Gupta, J.K. Sainis, S. Sabharwal, Gamma radiation induced synthesis of gold nanoparticles in aqueous polyvinyl pyrrolidone solution and its application for hydrogen peroxide estimation, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 195–200. doi:10.1016/j.radphyschem.2011.10.014.
- [29] M. Mostafavi, G.R. Dey, L. François, J. Belloni, Transient and Stable Silver Clusters Induced by Radiolysis in Methanol, *J. Phys. Chem. A.* 106 (2002)

- 10184–10194. doi:10.1021/jp014257a.
- [30] A. Henglein, Colloidal Silver Nanoparticles: Photochemical Preparation and Interaction with O<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, and Some Metal Ions, *Chem. Mater.* 10 (1998) 444–450. doi:10.1021/cm970613j.
- [31] Y.A. Krutyakov, A.A. Kudrinskiy, A.Y. Olenin, G. V Lisichkin, Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects, *Russ. Chem. Rev.* 77 (2008) 233–257. doi:10.1070/RC2008v077n03ABEH003751.
- [32] X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, W. Yang, Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 6573–6576. doi:10.1021/jp900775b.
- [33] J. Turkevich; P.C. Stevenson; J. Hiller, Synthesis of Gold Nanoparticles Turkevich method, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [34] M. Doyen, K. Bartik, G. Bruylants, UV–Vis and NMR study of the formation of gold nanoparticles by citrate reduction: Observation of gold–citrate aggregates, *J. Colloid Interface Sci.* 399 (2013) 1–5. doi:10.1016/j.jcis.2013.02.040.
- [35] S. Rastegarzadeh, F. Hashemi, A surface plasmon resonance sensing method for determining captopril based on in situ formation of silver nanoparticles using ascorbic acid, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 122 (2014) 536–541. doi:10.1016/j.saa.2013.11.074.
- [36] F. Iram, M.S. Iqbal, M.M. Athar, M.Z. Saeed, A. Yasmeen, R. Ahmad, Glucosylated-mediated green synthesis of gold and silver nanoparticles and their phyto-toxicity study, *Carbohydr. Polym.* 104 (2014) 29–33. doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.002.
- [37] N. Roy, A. Gaur, A. Jain, S. Bhattacharya, V. Rani, Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 (2013) 807–812. doi:10.1016/j.etap.2013.07.005.
- [38] J. Wang, H.F.M. Boelens, M.B. Thathagar, G. Rothenberg, In Situ Spectroscopic Analysis of Nanocluster Formation, *ChemPhysChem.* 5 (2004) 93–98. doi:10.1002/cphc.200300859.

- [39] A. Henglein, M. Giersig, Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 9533–9539. doi:10.1021/jp9925334.
- [40] S. Nishimura, D. Mott, A. Takagaki, S. Maenosono, K. Ebitani, Role of base in the formation of silver nanoparticles synthesized using sodium acrylate as a dual reducing and encapsulating agent, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 9335–9343. doi:10.1039/C0CP02985H.
- [41] J. Polte, X. Tuaev, M. Wuithschick, A. Fischer, A.F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert, F. Emmerling, Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles, *ACS Nano.* 6 (2012) 5791–5802. doi:10.1021/nn301724z.
- [42] J. Palomo, M. Filice, Biosynthesis of Metal Nanoparticles: Novel Efficient Heterogeneous Nanocatalysts, *Nanomaterials.* 6 (2016) 84. doi:10.3390/nano6050084.
- [43] N. Kulkarni, U. Muddapur, Biosynthesis of metal nanoparticles: A review, *J. Nanotechnol.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/510246.
- [44] V. Kumar, S.K. Yadav, Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (2009) 151–157. doi:10.1002/jctb.2023.
- [45] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract., *Biotechnol. Prog.* 22 577–83. doi:10.1021/bp0501423.
- [46] P.P. Gan, S.F.Y. Li, Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* 11 (2012) 169–206. doi:10.1007/s11157-012-9278-7.
- [47] M. Dubey, S. Bhadauria, B.S. Kushwah, Green synthesis of nanosilver particles from extract of Eucalyptus hybrida (Safeda) leaf, *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 4 (2009) 537–543.
- [48] H. Huang, X. Yang, Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: A green method, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2627–2631.

- doi:10.1016/j.carres.2004.08.005.
- [49] B. Ajitha, Y.A.K. Reddy, P.S. Reddy, Biosynthesis of silver nanoparticles using *Momordica charantia* leaf broth: Evaluation of their innate antimicrobial and catalytic activities, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 146 (2015) 1–9. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.02.017.
- [50] D. Li, Z. Liu, Y. Yuan, Y. Liu, F. Niu, Green synthesis of gallic acid-coated silver nanoparticles with high antimicrobial activity and low cytotoxicity to normal cells, *Process Biochem.* 50 (2015) 357–366. doi:10.1016/j.procbio.2015.01.002.
- [51] J. Robinson, B. Demmitt, T. Colliins, R. Gorey, R. Posgai, S. Varma, S. Hussain, J. Rowe, Green synthesized silver nanoparticles exhibit reduced toxicity to mammalian cells and retain antimicrobial activity, in: *ACS Natl. Meet.*, Anaheim, CA, 2011. [https://cfpub.epa.gov/si/si\\_public\\_record\\_Report.cfm?dirEntryId=231564](https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?dirEntryId=231564).
- [52] A.K. Mittal, Y. Chisti, U.C. Banerjee, Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 346–356. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
- [53] P. Kuppusamy, M.M. Yusoff, G.P. Maniam, N. Govindan, Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report, *Saudi Pharm. J.* 24 (2016) 473–484. doi:10.1016/j.jsps.2014.11.013.
- [54] V. Sanchez-Mendieta, A.R. Vilchis-Nestor, Green Synthesis of Noble Metal (Au, Ag, Pt) Nanoparticles, Assisted by Plant-Extracts, INTECH Open Access Publisher, 2012. <https://books.google.com.mx/books/id=pKt6oAEACAAJ>.
- [55] S.S. Shankar, A. Ahmad, M. Sastry, Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1627–1631. doi:10.1021/bp034070w.
- [56] V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Adv. Colloid Interface Sci.* 145 (2009) 83–96. doi:10.1016/j.cis.2008.09.002.

- [57] J. Kesharwani, K.Y. Yoon, J. Hwang, M. Rai, Phytofabrication of Silver Nanoparticles by Leaf Extract of *Datura metel*: Hypothetical Mechanism Involved in Synthesis, *J. Bionanoscience*. 3 (2009) 39–44. doi:10.1166/jbns.2009.1008.
- [58] J. Huang, Q. Li, D. Sun, Y. Lu, Y. Su, X. Yang, H. Wang, Y. Wang, W. Shao, N. He, J. Hong, C. Chen, Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf, *Nanotechnology*. 18 (2007) 105104. doi:10.1088/0957-4484/18/10/105104.
- [59] M. Sathishkumar, K. Sneha, S.W. Won, C.-W. Cho, S. Kim, Y.-S. Yun, Cinnamon *zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 73 (2009) 332–338. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.06.005.
- [60] G.R.D. K. Mallikarjuna, G. Narasimha, Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*. 6 (2011) 181–186. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-79551706243&origin=inward&txGid=FBE000D63F9A2BB9206F471B91CD492A.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3A26>.
- [61] A.R. Vilchis-Nestor, V. Sánchez-Mendieta, M.A. Camacho-López, R.M. Gómez-Espinosa, M.A. Camacho-López, J.A. Arenas-Alatorre, Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract, 2008. doi:10.1016/j.matlet.2008.01.138.
- [62] J. Kasthuri, K. Kathiravan, N. Rajendiran, Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 1075–1085. doi:10.1007/s11051-008-9494-9.
- [63] M.R. Bindhu, M. Umadevi, Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and its antimicrobial activity, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 101 (2013) 184–190. doi:10.1016/j.saa.2012.09.031.
- [64] Y. Cao, Y. Xie, L. Liu, A. Xiao, Y. Li, C. Zhang, X. Fang, Y. Zhou, Influence of

- phytochemicals on the biocompatibility of inorganic nanoparticles: a state-of-the-art review, *Phytochem. Rev.* 16 (2017) 555–563. doi:10.1007/s11101-017-9490-8.
- [65] S. Perni, V. Hakala, P. Prokopovich, Biogenic synthesis of antimicrobial silver nanoparticles capped with L-cysteine, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 460 (2014) 219–224. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.09.034.
- [66] A.R. Shahverdi, S. Minaeian, H.R. Shahverdi, H. Jamalifar, A.-A. Nohi, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach, *Process Biochem.* 42 (2007) 919–923. doi:10.1016/j.procbio.2007.02.005.
- [67] J. Morales-Sánchez, Jesus Guajardo-Pacheco, M.-E. Noriega, Q. Cristina, M.E. Compeón-Jasso, J. González-Hernández, R. Facundo, Synthesis of Silver Nanoparticles Using Albumin as a Reducing Agent, *Mater. Sci. Appl.* 2 (2011) 578–581. doi:10.4236/msa.2011.26077.
- [68] J.Y. Song, B.S. Kim, Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32 (2008) 79. doi:10.1007/s00449-008-0224-6.
- [69] J.F. Benazir, R. Suganthi, P. Ch, rika, B. Mathithumilan, In vitro regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens* (geranium) - an important medicinal and aromatic plant, *J. Med. Plants Res.* 7 (2013) 2815–2822. doi:10.5897/JMPR09.046.
- [70] M.T. Lis-Balchin, Geranium, in: P. K. V. (Ed.), *Handb. Herbs Spices Vol. 2*, 1st ed., CRC Press, Cambridge, England, 2004: pp. 162–178.
- [71] A. Tuominen, E. Toivonen, P. Mutikainen, J.-P. Salminen, Defensive strategies in *Geranium sylvaticum*. Part 1: Organ-specific distribution of water-soluble tannins, flavonoids and phenolic acids, *Phytochemistry.* 95 (2013) 394–407. doi:10.1016/j.phytochem.2013.05.013.
- [72] M. Boukhris, M.S.J. Simmonds, S. Sayadi, M. Bouaziz, Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *pelargonium graveolens*, *Phyther. Res.* 27 (2013) 1206–1213.

- doi:10.1002/ptr.4853.
- [73] A. Jafarizad, K. Safaee, S. Gharibian, Y. Omid, D. Ekinci, Biosynthesis and In-vitro Study of Gold Nanoparticles Using Mentha and Pelargonium Extracts, *Procedia Mater. Sci.* 11 (2015) 224–230. doi:10.1016/j.mspro.2015.11.113.
- [74] A.A. S. Shiv Shankar Renu Pasricha, Murali Sastry, Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes, *J. Mater. Chem.* 13 (2003) 1822–1826.
- [75] A. Mirończyk, A. Timoszyk, J.J. Koziol, Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using *Pelargonium zonale* extract, *Jökull J.* 65 (2015) 300–309. <http://www.jokulljournal.com/issue.php?v=65&i=2>.
- [76] M. Franco-Romano, M.L.A. Gil, J.M. Palacios-Santander, J.J. Delgado-Jaén, I. Naranjo-Rodríguez, J.L. Hidalgo-Hidalgo De Cisneros, L.M. Cubillana-Aguilera, Sonosynthesis of gold nanoparticles from a geranium leaf extract, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 1570–1577. doi:10.1016/j.ultsonch.2014.01.017.
- [77] O. V. Kharissova, H.V.R. Dias, B.I. Kharisov, B.O. Pérez, V.M.J. Pérez, The greener synthesis of nanoparticles, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 240–248. doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.003.
- [78] A.K. Jha, K. Prasad, K. Prasad, A.R. Kulkarni, Plant system: Nature's nanofactory, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 73 (2009) 219–223. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.05.018.
- [79] N. Durán, P.D. Marcato, O.L. Alves, G.I.H. De Souza, E. Esposito, Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains, *J. Nanobiotechnology.* 3 (2005) 8. doi:10.1186/1477-3155-3-8.
- [80] T.C. Prathna, N. Chandrasekaran, A.M. Raichur, A. Mukherjee, Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 82 (2011) 152–159. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.08.036.
- [81] R. Sanghi, P. Verma, Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 501–504.

- doi:10.1016/j.biortech.2008.05.048.
- [82] A.J. Kora, R.B. Sashidhar, J. Arunachalam, Gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A template for the green synthesis and stabilization of silver nanoparticles with antibacterial application, *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 670–679. doi:10.1016/j.carbpol.2010.05.034.
- [83] S.M. Roopan, Rohit, G. Madhumitha, A.A. Rahuman, C. Kamaraj, A. Bharathi, T.V. Surendra, Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity, *Ind. Crops Prod.* 43 (2013) 631–635. doi:10.1016/j.indcrop.2012.08.013.
- [84] B. Sadeghi, F. Gholamhoseinpoor, A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 134 (2015) 310–315. doi:10.1016/j.saa.2014.06.046.
- [85] M. Rahimi-Nasrabadi, S.M. Pourmortazavi, S.A.S. Shandiz, F. Ahmadi, H. Batooli, Green synthesis of silver nanoparticles using *Eucalyptus leucoxydon* leaves extract and evaluating the antioxidant activities of extract., *Nat. Prod. Res.* 28 (2014) 1964–1969. doi:10.1080/14786419.2014.918124.
- [86] T.J.I. Edison, M.G. Sethuraman, Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue, *Process Biochem.* 47 (2012) 1351–1357. doi:10.1016/j.procbio.2012.04.025.
- [87] M.M.H. Khalil, E.H. Ismail, K.Z. El-Baghdady, D. Mohamed, Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity, *Arab. J. Chem.* 7 (2014) 1131–1139. doi:10.1016/j.arabjc.2013.04.007.
- [88] S.K. Das, M.M.R. Khan, A.K. Guha, A.R. Das, A.B. Mandal, Silver-nano biohybride material: Synthesis, characterization and application in water purification, *Bioresour. Technol.* 124 (2012) 495–499. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.071.
- [89] S. Ashraf, A.Z. Abbasi, C. Pfeiffer, S.Z. Hussain, Z.M. Khalid, P.R. Gil, W.J. Parak, I. Hussain, Protein-mediated synthesis, pH-induced reversible

- agglomeration, toxicity and cellular interaction of silver nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 102 (2013) 511–518. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.032.
- [90] D. Philip, Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using *Mangifera indica* leaf, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 77 (2010) 807–810. doi:10.1016/j.saa.2010.08.008.
- [91] C.K. Tagad, S.R. Dugasani, R. Aiyer, S. Park, A. Kulkarni, S. Sabharwal, Green synthesis of silver nanoparticles and their application for the development of optical fiber based hydrogen peroxide sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 183 (2013) 144–149. doi:10.1016/j.snb.2013.03.106.
- [92] M.H. El-Rafie, M.E. El-Naggar, M.A. Ramadan, M.M.G. Fouda, S.S. Al-Deyab, A. Hebeish, Environmental synthesis of silver nanoparticles using hydroxypropyl starch and their characterization, *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 630–635. doi:10.1016/j.carbpol.2011.04.088.
- [93] A. Mohammed Fayaz, K. Balaji, P.T. Kalaichelvan, R. Venkatesan, Fungal based synthesis of silver nanoparticles: An effect of temperature on the size of particles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 74 (2009) 123–126. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.07.002.
- [94] O.E. Rodríguez-Luis, R. Hernandez-Delgadillo, R.I. Sánchez-Nájera, G.A. Martínez-Castañón, N. Niño-Martínez, M.D.C. Sánchez Navarro, F. Ruiz, C. Cabral-Romero, Green synthesis of silver nanoparticles and their bactericidal and antimycotic activities against oral microbes, *J. Nanomater.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/9204573.
- [95] M. Premanathan, Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells, *IET Nanobiotechnology*. 9 (2015) 325–330(5). doi:10.1049/iet-nbt.2015.0001.
- [96] R. Rajan, K. Chandran, S.L. Harper, S.-I. Yun, P.T. Kalaichelvan, Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 356–373. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.015.

- [97] T.V.M. Sreekanth, P.C. Nagajyothi, K.D. Lee, *Dioscorea batatas* Rhizome-Assisted Rapid Biogenic Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles, *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* 42 (2012) 567–572. doi:10.1080/15533174.2011.613886.
- [98] C.J. Kirubakaran, D. Kalpana, Y.S. Lee, A.R. Kim, D.J. Yoo, K.S. Nahm, G.G. Kumar, Biomediated Silver Nanoparticles for the Highly Selective Copper(II) Ion Sensor Applications, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51 (2012) 7441–7446. doi:10.1021/ie3003232.
- [99] R. Lu, D. Yang, D. Cui, Z. Wang, L. Guo, Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 2101. doi:10.2147/IJN.S29762.
- [100] K. Cheng, Y. Hung, C. Chen, C. Liu, J. Young, Green synthesis of chondroitin sulfate-capped silver nanoparticles: Characterization and surface modification, *Carbohydr. Polym.* 110 (2014) 195–202. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.053.
- [101] C. Goddeeris, F. Cuppo, H. Reynaers, W.G. Bouwman, G. Van Den Mooter, Light scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes, *Int. J. Pharm.* 312 (2006) 187–195. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.037.
- [102] S.W. Provencher, Inverse Problems in Polymer Characterization: Direct Analysis of Polydispersity with Photon Correlation Spectroscopy, *Die Makromol. Chemie.* 180 (1979) 201–209. doi:10.1002/macp.1979.021800119.
- [103] M. Panalytical, AZONano, *Dyn. Light Scatt. Basics.* (2013). <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662> (accessed January 14, 2018).
- [104] S.W. Provencher, CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982) 229–242. doi:10.1016/0010-4655(82)90174-6.
- [105] S.W. Provencher, A constrained regularization method for inverting data

- represented by linear algebraic or integral equations, *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982) 213–227. doi:10.1016/0010-4655(82)90173-4.
- [106] Cytodiagnosics, Cytodiagnosics, Silver Nanoparticles. (2016) 3. <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Silver-Nanoparticles-c150.htm> (accessed April 14, 2016).
- [107] B. Tang, J. Li, X. Hou, T. Afrin, L. Sun, X. Wang, Colorful and antibacterial silk fiber from anisotropic silver nanoparticles, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 4556–4563. doi:10.1021/ie3033872.
- [108] P. Valloiton, B. Angel, M. McCall, M. Osmond, J. Kirby, Imaging nanoparticle-algae interactions in three dimensions using Cytoviva microscopy, *J. Microsc.* 257 (2015) 166–169. doi:10.1111/jmi.12199.
- [109] X. Yang, C. Jiang, H. Hsu-Kim, A.R. Badireddy, M. Dykstra, M. Wiesner, D.E. Hinton, J.N. Meyer, Silver nanoparticle behavior, uptake, and toxicity in *Caenorhabditis elegans*: Effects of natural organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 3486–3495. doi:10.1021/es404444n.
- [110] A. Verma, F. Stellacci, Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions, *Small.* 6 (2010) 12–21. doi:10.1002/sml.200901158.
- [111] D. Manolakis, D. Marden, G. a Shaw, Hyperspectral Image Processing for Automatic Target Detection Applications, *Lincoln Lab. J.* 14 (2003) 79–116.
- [112] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias, Hyperspectral imaging – an emerging process analytical tool for food quality and safety control, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 590–598. doi:10.1016/j.tifs.2007.06.001.
- [113] L.L. Maurer, X. Yang, A.J. Schindler, R.K. Taggart, C. Jiang, H. Hsu-Kim, D.R. Sherwood, J.N. Meyer, Intracellular trafficking pathways in silver nanoparticle uptake and toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *Nanotoxicology.* 10 (2016) 831–835. doi:10.3109/17435390.2015.1110759.
- [114] A.R. Badireddy, M.R. Wiesner, J. Liu, Detection, characterization, and abundance of engineered nanoparticles in complex waters by hyperspectral imagery with enhanced darkfield microscopy, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012)

- 10081–10088. doi:10.1021/es204140s.
- [115] M.M. Robins, P.J. Wilde, Colloids and Emulsions, in: *Encycl. Food Sci. Nutr.*, Elsevier Science Ltd., Norwich, UK, 2003: pp. 1517–1523.
- [116] J.M. DeMan, Emulsion and Emulsifiers, in: *Princ. Food Chem.*, Springer, Ontario, Canada, 1999: pp. 101–107.
- [117] K.G. Wang, M.E. Glicksman, Ostwald Rippening in Materials Processing, in: *Mater. Process. Handb.*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2007: p. 5.1-5.5.
- [118] L.L. Schramm, Emulsion, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications, Wiley-VCH, Saskatoon, 2005.
- [119] T.A. Razo-Lazcano, M. Stambouli, M. del P. González-Muñoz, D. Pareau, M. Ávila-Rodríguez, Emulsion liquid membranes for recovery of ibuprofen from aqueous solutions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014) 890–898. doi:10.1002/jctb.4329.
- [120] S. Less, A. Hannisdal, J. Sjöblom, Dehydration Efficiency of Water-in-Crude Oil Emulsions in Alternating Current Electrical Fields, *J. Dispers. Sci. Technol.* 31 (2010) 265–272. doi:10.1080/01932690903123734.
- [121] N. Garti, Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications, *LWT - Food Sci. Technol.* 30 (1997) 222–235. doi:10.1006/fstl.1996.0176.
- [122] A.F. Dyson, Emulsion paints and their formulation, *Pigment Resin Technol.* 2 (1973) 3–8. doi:10.1108/eb040961.
- [123] H.L. Jaffe, F.M. Rosenblum, W. Daniels, Polyvinyl Acetate Emulsions for Adhesives, in: I. Skeist (Ed.), *Handb. Adhes.*, Springer US, Boston, MA, 1990: pp. 381–400. doi:10.1007/978-1-4613-0671-9\_21.
- [124] K.-C. Chang, M.-C. Lai, C.-W. Peng, Y.-T. Chen, J.-M. Yeh, C.-L. Lin, J.-C. Yang, Comparative studies on the corrosion protection effect of DBSA-doped polyaniline prepared from in situ emulsion polymerization in the presence of hydrophilic Na<sup>+</sup>-MMT and organophilic organo-MMT clay platelets, *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 5645–5653. doi:10.1016/j.electacta.2006.02.039.

- [125] S.R. Schmid, W.R.D. Wilson, Lubrication of Aluminum Rolling by Oil-in-Water Emulsions, *Tribol. Trans.* 38 (1995) 452–458. doi:10.1080/10402009508983428.
- [126] P. Palanisamy, A.M. Raichur, Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 199–204. doi:10.1016/j.msec.2008.06.008.
- [127] D. Morales, J.M. Gutiérrez, M.J. García-Celma, Y.C. Solans, A Study of the Relation between Bicontinuous Microemulsions and Oil/Water Nano-emulsion Formation, *Langmuir.* 19 (2003) 7196–7200. doi:10.1021/la0300737.
- [128] C. Solans, D. Morales, M. Homs, Spontaneous emulsification, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 22 (2016) 88–93. doi:10.1016/j.cocis.2016.03.002.
- [129] K. Bouchemal, S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi, Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation, *Int. J. Pharm.* 280 (2004) 241–251. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.016.
- [130] D.T. Piorkowski, D.J. McClements, Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications, *Food Hydrocoll.* 42 (2014) 5–41. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.009.
- [131] R.K. Thakur, C. Villette, J.M. Aubry, G. Delaplace, Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 315 (2008) 285–293. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.08.017.
- [132] A. Forgiarini, J. Esquena, C. González, C. Solans, Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature, *Langmuir.* 17 (2001) 2076–2083. doi:10.1021/la001362n.
- [133] N. Sadurní, C. Solans, N. Azemar, M.J. García-Celma, Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 438–445. doi:10.1016/j.ejps.2005.08.001.
- [134] Z.H. Han, B. Yang, Y. Qi, J. Cumings, Synthesis of low-melting-point metallic nanoparticles with an ultrasonic nanoemulsion method, *Ultrasonics.* 51 (2011)

- 485–488. doi:10.1016/j.ultras.2010.11.015.
- [135] H. Liu, P. Hou, W. Zhang, J. Wu, Synthesis of monosized core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au multifunctional nanoparticles by PVP-assisted nanoemulsion process, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 356 (2010) 21–27. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.12.023.
- [136] L. Montenegro, F. Lai, A. Offerta, M.G. Sarpietro, L. Micicché, A.M. Maccioni, D. Valenti, A.M. Fadda, From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32 (2016) 100–112. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.003.
- [137] C. Fornaguera, A. Dols-Perez, G. Calderó, M.J. García-Celma, J. Camarasa, C. Solans, PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier, *J. Control. Release.* 211 (2015) 134–143. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.002.
- [138] P. Riachy, M.J. Stébé, B. Lebeau, A. Pasc, L. Vidal, J.L. Blin, Nano-emulsions as imprints for the design of hierarchical porous silica through a dual templating mechanism, *Microporous Mesoporous Mater.* 221 (2016) 228–237. doi:10.1016/j.micromeso.2015.09.048.
- [139] T.P. Hoar, J.H. Shulman, S.J. Hoar TP, Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle, *Nature.* 152 (1943) 102–103. doi:10.1038/152102a0.
- [140] P.A. Winsor, Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes, *Trans. Faraday Soc.* 44 (1948) 451. doi:10.1039/tf9484400451.
- [141] S. Bardhan, K. Kundu, S.K. Saha, B.K. Paul, Physicochemical studies of mixed surfactant microemulsions with isopropyl myristate as oil, *J. Colloid Interface Sci.* 402 (2013) 180–189. doi:10.1016/j.jcis.2013.04.008.
- [142] E. Ruckenstein, The surface of tension, the natural radius, and the interfacial tension in the thermodynamics of microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 114 (1986) 173–179. doi:10.1016/0021-9797(86)90249-3.
- [143] H. Wennerström, J. Balogh, U. Olsson, Interfacial tensions in microemulsions,

- Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 291 (2006) 69–77. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.09.027.
- [144] S. Paul, A.K. Panda, Physico-chemical studies on ionic liquid microemulsion: Phase manifestation, formation dynamics, size, viscosity, percolation of electrical conductance and spectroscopic investigations on 1-butyl-3-methylimidazolium methanesulfonate+water/Tween 20+n-pentanol/n-heptane pseudoternary system, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 419 (2013) 113–124. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.11.061.
- [145] J.C. Eriksson, S. Ljunggren, W.K. Kegel, H.N.W. Lekkerkerker, Entropy and droplet size distributions of Winsor I and II microemulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 183–185 (2001) 347–360. doi:10.1016/S0927-7757(01)00526-X.
- [146] D.J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
- [147] P.P. Constantinides, S.H. Yiv, Particle size determination of phase-inverted water-in-oil microemulsions under different dilution and storage conditions, *Int. J. Pharm.* 115 (1995) 225–234. doi:10.1016/0378-5173(94)00272-7.
- [148] S.P. Moulik, B.K. Paul, Structure, dynamics and transport properties of microemulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 78 (1998) 99–195. doi:10.1016/S0001-8686(98)00063-3.
- [149] M.A. Pedroza-Toscano, M. Rabelero-Velasco, R. Daz De Len, H. Saade, R.G. Lopez, E. Mendizbal, J.E. Puig, Preparation of silver nanostructures from bicontinuous microemulsions, *J. Nanomater.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/975106.
- [150] C. von Corswant, C. Olsson, O. Söderman, Microemulsions Based on Soybean Phosphatidylcholine and Isopropylmyristate Effect of Addition of Hydrophilic Surfactants, *Langmuir.* 14 (1998) 6864–6870. doi:10.1021/la980567h.
- [151] C. Solans, M.J. García-Celma, Surfactants for microemulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2 (1997) 464–471. doi:10.1016/S1359-0294(97)80093-

3.

- [152] D.J. McClements, *Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques* Second Edition, Food Emuls. Princ. Pract. Tech. (2005). doi:10.1093/acprof:oso/9780195383607.003.0002.
- [153] J.Y. Walz, The effect of surface heterogeneities on colloidal forces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 74 (1998) 119–168. doi:10.1016/s0001-8686(97)00042-0.
- [154] A. Yaghmur, L. de Campo, A. Aserin, N. Garti, O. Glatter, Structural characterization of five-component food grade oil-in-water nonionic microemulsions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 1524–1533. doi:10.1039/B314625C.
- [155] P.P. Constantinides, J.P. Scalart, Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides, *Int. J. Pharm.* 158 (1997) 57–68. doi:10.1016/S0378-5173(97)00248-2.
- [156] W. Warisnoicharoen, A.B. Lansley, M.J. Lawrence, Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour, *Int. J. Pharm.* 198 (2000) 7–27. doi:10.1016/S0378-5173(99)00406-8.
- [157] G. Kaur, S.K. Mehta, Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications, *Int. J. Pharm.* 529 (2017) 134–160. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.059.
- [158] A.S. Koneva, E.A. Safonova, P.S. Kondrakhina, M.A. Vovk, A.A. Lezov, Y.S. Chernyshev, N.A. Smirnova, Effect of water content on structural and phase behavior of water-in-oil (n-decane) microemulsion system stabilized by mixed nonionic surfactants SPAN 80/TWEEN 80, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 518 (2017) 273–282. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.01.020.
- [159] G.W.A. Milne, Oleth-10, in: *Gardner's Commer. Important Chem. Synonyms, Trade Names, Prop.*, Wiley InterScience, Hoboken, N.J., 2005: p. 458.
- [160] Y. Kapoor, A. Chauhan, Ophthalmic delivery of Cyclosporine A from Brij-97

- microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels, *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 222–229. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.028.
- [161] A.S. Zidan, O.A. Sammour, M.A. Hammad, N.A. Megrab, M.J. Habib, M.A. Khan, Quality by design: Understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function, *Int. J. Pharm.* 332 (2007) 55–63. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.09.060.
- [162] J.Y. Fang, C.F. Hung, M.H. Liao, C.C. Chien, A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 67–75. doi:10.1016/j.ejpb.2007.01.008.
- [163] S. Zevian, N.E. Winterwood, C.S. Stipp, Structure-function analysis of tetraspanin CD151 reveals distinct requirements for tumor cell behaviors mediated by  $\alpha 3\beta 1$  versus  $\alpha 6\beta 4$  integrin, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 7496–7506. doi:10.1074/jbc.M110.173583.
- [164] M. Tabbakhian, N. Tavakoli, M.R. Jaafari, S. Daneshamouz, Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes. 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models, *Int. J. Pharm.* 323 (2006) 1–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.041.
- [165] N. Garti, A. Yaghmur, M.E. Leser, V. Clement, H.J. Watzke, Improved Oil Solubilization in Oil/Water Food Grade Microemulsions in the Presence of Polyols and Ethanol, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2552–2562. doi:10.1021/jf001390b.
- [166] D. Myers, *Polymeric Surfactants and Surfactant–Polymer Interactions*, in: *Surfactant Sci. Technol.*, John Wiley & Sons, Inc., 2005: pp. 220–244. doi:10.1002/047174607X.ch7.
- [167] W.C. Griffin, Classification of surface-active agents by “HLB,” *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1 (1949) 311–326. <http://journal.sconline.org/pdf/cc1949/cc001n05/p00311-p00326.pdf>.
- [168] C.R.B. Mendonça, Y.P. Silva, W.J. Böckel, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C.M.S. Piatnicki, C.I.D. Bica, Role of the co-surfactant nature in

- soybean w/o microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2009) 579–585. doi:10.1016/j.jcis.2009.04.091.
- [169] L.J. Maidment, V. Chen, G.G. Warr, Effect of added cosurfactant on ternary microemulsion structure and dynamics, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 129–130 (1997) 311–319. doi:10.1016/S0927-7757(97)00048-4.
- [170] R. Sripriya, K. Muthu Raja, G. Santhosh, M. Chandrasekaran, M. Noel, The effect of structure of oil phase, surfactant and co-surfactant on the physicochemical and electrochemical properties of bicontinuous microemulsion, *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 712–717. doi:10.1016/j.jcis.2007.05.080.
- [171] N. Garti, Microemulsions as microreactors for food applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 197–211. doi:10.1016/S1359-0294(03)00022-0.
- [172] K.L. Mittal, D.O. Shah, *Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution*, 2003. doi:10.1201/9780203910573.
- [173] A. Wang, L. Chen, D. Jiang, Z. Yan, Vegetable oil-based ionic liquid microemulsions and their potential as alternative renewable biolubricant basestocks, *Ind. Crops Prod.* 51 (2013) 425–429. doi:10.1016/j.indcrop.2013.09.039.
- [174] V. Papadimitriou, E.D. Tzika, S. Pispas, T.G. Sotiroudis, A. Xenakis, Microemulsions based on virgin olive oil: A model biomimetic system for studying native oxidative enzymatic activities, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 382 (2011) 232–237. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.10.042.
- [175] H. Sirén, S. Vesänen, J. Suomi, Separation of steroids using vegetable oils in microemulsion electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 945–946 (2014) 199–206. doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.052.
- [176] J. Flanagan, K. Kortegaard, D. Neil Pinder, T. Rades, H. Singh, Solubilisation of soybean oil in microemulsions using various surfactants, *Food Hydrocoll.*

- 20 (2006) 253–260. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.02.017.
- [177] Hoja Técnica del Aceite de Soya, (n.d.). [www.aceiteimperial.com.mx](http://www.aceiteimperial.com.mx) (accessed July 3, 2017).
- [178] A. Wang, L. Chen, D. Jiang, H. Zeng, Z. Yan, Vegetable oil-based ionic liquid microemulsion biolubricants: Effect of integrated surfactants, *Ind. Crops Prod.* 62 (2014) 515–521. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.031.
- [179] K.S. Sharma, P.A. Hassan, A.K. Rakshit, Surface activity and association behavior of nonaoxyethylene n-dodecylether in aquo amino acid medium: Tensiometry, small-angle neutron scattering, dynamic light scattering and viscosity studies, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 308 (2007) 100–110. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.05.035.
- [180] M.A. López-Quintela, Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 137–144. doi:10.1016/S1359-0294(03)00019-0.
- [181] M. Boutonnet, J. Kizling, P. Stenius, G. Maire, The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions, *Colloids and Surfaces.* 5 (1982) 209–225. doi:10.1016/0166-6622(82)80079-6.
- [182] G. Catanoiu, E. Carey, S.R. Patil, S. Engelskirchen, C. Stubenrauch, Partition coefficients of nonionic surfactants in water/n-alkane systems, *J. Colloid Interface Sci.* 355 (2011) 150–156. doi:10.1016/j.jcis.2010.12.002.
- [183] F. Ravera, M. Ferrari, L. Liggieri, R. Miller, Adsorption kinetics of alkyl phosphine oxides in water/alkane systems with transfer across the interface, in: J.B. Rosenholm, B. Lindman, P. Stenius (Eds.), *Trends Colloid Interface Sci.* XI, Steinkopff, Darmstadt, 1997: pp. 346–350. doi:10.1007/BFb0111013.
- [184] K. Allen, R.J. Davey, E. Ferrari, C. Towler, G.J. Tiddy, M.O. Jones, R.G. Pritchard, The Crystallization of Glycine Polymorphs from Emulsions, Microemulsions, and Lamellar Phases, *Cryst. Growth Des.* 2 (2002) 523–527. doi:10.1021/cg025568t.
- [185] Y. Li, C. Park, Particle Size Distribution in the Synthesis of Nanoparticles Using Microemulsions, *Langmuir.* 15 (1999) 952–956.

- [186] M. De Dios, F. Barroso, C. Tojo, M.C. Blanco, M.A. López-Quintela, Effects of the reaction rate on the size control of nanoparticles synthesized in microemulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 270–271 (2005) 83–87. doi:10.1016/j.colsurfa.2005.05.042.
- [187] D. Chen, S. Liu, J. Li, N. Zhao, C. Shi, X. Du, J. Sheng, Nanometre Ni and core/shell Ni/Au nanoparticles with controllable dimensions synthesized in reverse microemulsion, *J. Alloys Compd.* 475 (2009) 494–500. doi:10.1016/j.jallcom.2008.07.115.
- [188] M.-L. Wu, L.-B. Lai, Synthesis of Pt/Ag bimetallic nanoparticles in water-in-oil microemulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 244 (2004) 149–157. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.06.027.
- [189] X. Zhang, F. Zhang, K.Y. Chan, Preparation of Pt-Ru-Co trimetallic nanoparticles and their electrocatalytic properties, *Catal. Commun.* 5 (2004) 749–753. doi:10.1016/j.catcom.2004.09.010.
- [190] M. Sanchez-Dominguez, M. Boutonnet, C. Solans, A novel approach to metal and metal oxide nanoparticle synthesis: The oil-in-water microemulsion reaction method, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 1823–1829. doi:10.1007/s11051-009-9660-8.
- [191] R. Chen, B. Han, L. Yang, Y. Yang, Y. Xu, Y. Mai, Controllable synthesis and characterization of CdS quantum dots by a microemulsion-mediated hydrothermal method, *J. Lumin.* 172 (2016) 197–200. doi:https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.12.006.
- [192] J. Wang, T. Tsuzuki, L. Sun, X. Wang, Reverse microemulsion-mediated synthesis of SiO<sub>2</sub>-coated ZnO composite nanoparticles: Multiple cores with tunable shell thickness, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2 (2010) 957–960. doi:10.1021/am100051z.
- [193] K. Du, G.R. Hu, Z.D. Peng, L. Qi, Synthesis of spinel LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> with manganese carbonate prepared by micro-emulsion method, *Electrochim. Acta.* 55 (2010) 1733–1739. doi:10.1016/j.electacta.2009.10.058.
- [194] D.S. Mathew, R.S. Juang, An overview of the structure and magnetism of

- spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions, *Chem. Eng. J.* 129 (2007) 51–65. doi:10.1016/j.cej.2006.11.001.
- [195] R. Hu, C. Li, X. Wang, T. Zhou, X. Yang, G. Gao, Y. Zhang, Synthesis of perovskite  $\text{KMgF}_3$  with microemulsion for photocatalytic removal of various pollutants under visible light, *Catal. Commun.* 40 (2013) 71–75. doi:10.1016/j.catcom.2013.06.007.
- [196] M. Hopkins Hatzopoulos, J. Eastoe, P.J. Dowding, I. Grillo, Cylinder to sphere transition in reverse microemulsions: The effect of hydrotropes, *J. Colloid Interface Sci.* 392 (2013) 304–310. doi:10.1016/j.jcis.2012.09.078.
- [197] J. Xu, Y. Li, Formation of zinc sulfide nanorods and nanoparticles in ternary W/O microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 259 (2003) 275–281. doi:10.1016/S0021-9797(02)00237-0.
- [198] A. Pal, S. Shah, S. Devi, Preparation of silver, gold and silver-gold bimetallic nanoparticles in w/o microemulsion containing TritonX-100, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 302 (2007) 483–487. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.03.032.
- [199] D. Chen, S. Liu, J. Li, N. Zhao, C. Shi, X. Du, J. Sheng, Nanometre Ni and core/shell Ni/Au nanoparticles with controllable dimensions synthesized in reverse microemulsion, *J. Alloys Compd.* 475 (2009) 494–500. doi:10.1016/j.jallcom.2008.07.115.
- [200] L.G.R.A. Santos, C.H.F. Oliveira, I.R. Moraes, E.A. Ticianelli, Oxygen reduction reaction in acid medium on Pt–Ni/C prepared by a microemulsion method, *J. Electroanal. Chem.* 596 (2006) 141–148. doi:10.1016/j.jelechem.2006.07.033.
- [201] S.T. Hussain, S.R. Gilani, S.D. Ali, H. Safdar Bhatti, Decoration of carbon nanotubes with magnetic  $\text{Ni}_{1-x}\text{Co}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$  nanoparticles by microemulsion method, *J. Alloys Compd.* 544 (2012) 99–104. doi:10.1016/j.jallcom.2012.07.155.
- [202] X. Zhang, F. Zhang, R.-F. Guan, K.-Y. Chan, Preparation of Pt–Ru–Ni ternary nanoparticles by microemulsion and electrocatalytic activity for methanol

- oxidation, *Mater. Res. Bull.* 42 (2007) 327–333. doi:10.1016/j.materresbull.2006.05.021.
- [203] J. Wang, M. Shen, Y. An, J. Wang, Ce-Zr-Sr mixed oxide prepared by the reversed microemulsion method for improved Pd-only three-way catalysts, *Catal. Commun.* 10 (2008) 103–107. doi:10.1016/j.catcom.2008.08.004.
- [204] J. Eastoe, Photo-destructible surfactants in microemulsions, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 133 (2006) 106–110. doi:10.1007/2882\_047.
- [205] A. Vesperinas, J. Eastoe, S. Jackson, P. Wyatt, Light-induced flocculation of gold nanoparticles, *Chem. Commun.* (2007) 3912. doi:10.1039/b710502a.
- [206] A. Salabat, J. Eastoe, A. Vesperinas, R.F. Tabor, K.J. Muteh, Photorecovery of nanoparticles from an organic solvent, *Langmuir.* 24 (2008). doi:10.1021/la703145n.
- [207] F. Song, J. Xu, W.G. Hou, Surfactant-free oil/water and bicontinuous microemulsion composed of benzene, ethanol and water, *Chinese Chem. Lett.* 21 (2010) 880–883. doi:10.1016/j.ccllet.2010.01.029.
- [208] J. Xu, A. Yin, J. Zhao, D. Li, W. Hou, Surfactant-free microemulsion composed of oleic acid, n-propanol, and H<sub>2</sub>O, *J. Phys. Chem. B.* 117 (2013) 450–456. doi:10.1021/jp310282a.
- [209] S. Prevost, T. Lopian, M. Pleines, O. Diat, T. Zemb, Small-angle scattering and morphologies of ultraflexible microemulsions, *J. Appl. Crystallogr.* 49 (2016) 2063–2072. doi:10.1107/S1600576716016150.
- [210] T. Lopian, S. Schöttl, S. Prévost, S. Pellet-Rostaing, D. Horinek, W. Kunz, T. Zemb, Morphologies Observed in Ultraflexible Microemulsions with and without the Presence of a Strong Acid, *ACS Cent. Sci.* 2 (2016) 467–475. doi:10.1021/acscentsci.6b00116.
- [211] T.N. Zemb, M. Klossek, T. Lopian, J. Marcus, S. Schöetl, D. Horinek, S.F. Prevost, D. Touraud, O. Diat, S. Marčelja, W. Kunz, How to explain microemulsions formed by solvent mixtures without conventional surfactants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 4260–4265. doi:10.1073/pnas.1515708113.
- [212] R. Dinarvand, S.H. Moghadam, A. Sheikhi, F. Atyabi, Effect of surfactant HLB

- and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 139–151. doi:10.1080/02652040400026392.
- [213] Sigma-Aldrich, Surfactants by HLB number, (2018). <https://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=22686648>.
- [214] I. Ash, M. Ash, *Syn Lube 6065*, 2a ed., Norwood Mass, Nueva York, 2008.
- [215] I. Matsaridou, P. Bampalexis, A. Salis, I. Nikolakakis, The Influence of Surfactant HLB and Oil/Surfactant Ratio on the Formation and Properties of Self-emulsifying Pellets and Microemulsion Reconstitution, *AAPS PharmSciTech.* 13 (2012) 1319–1330. doi:10.1208/s12249-012-9855-7.
- [216] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer.* 37 (2001) 1590–1598. doi:10.1016/S0959-8049(01)00171-X.
- [217] K.C. Engvild, Chlorine-containing natural compounds in higher plants, *Phytochemistry.* 25 (1986) 781–791. doi:10.1016/0031-9422(86)80002-4.
- [218] R. Sanghi, P. Verma, Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 501–504. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.048.
- [219] N. Vigneshwaran, N.M. Ashtaputre, P.V. Varadarajan, R.P. Nachane, K.M. Paralikar, R.H. Balasubramanya, Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*, *Mater. Lett.* 61 (2007) 1413–1418. doi:10.1016/j.matlet.2006.07.042.
- [220] T. Sinha, M. Ahmaruzzaman, High-value utilization of egg shell to synthesize Silver and Gold–Silver core shell nanoparticles and their application for the degradation of hazardous dyes from aqueous phase-A green approach, *J. Colloid Interface Sci.* 453 (2015) 115–131. doi:10.1016/j.jcis.2015.04.053.
- [221] S.C.G.K. Daniel, K.N. and M. Sivakumar, Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Eichornia crassipes* and its Antibacterial Activity, *Curr. Nanosci.* 8 (2012) 125–129.

- doi:<http://dx.doi.org/10.2174/1573413711208010125>.
- [222] G.J. Amabeoku, Antidiarrhoeal activity of *Geranium incanum* Burm. f. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice, *J. Ethnopharmacol.* 123 (2009) 190–193. doi:10.1016/j.jep.2009.02.015.
- [223] S. Schöttl, D. Horinek, Aggregation in detergent-free ternary mixtures with microemulsion-like properties, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 22 (2016) 8–13. doi:10.1016/j.cocis.2016.02.003.
- [224] C.R.B. Mendonça, Y.P. Silva, W.J. Böckel, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C.M.S. Piatnicki, C.I.D. Bica, Role of the co-surfactant nature in soybean w/o microemulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2009) 579–585. doi:10.1016/j.jcis.2009.04.091.
- [225] R. Sripriya, K. Muthu Raja, G. Santhosh, M. Chandrasekaran, M. Noel, The effect of structure of oil phase, surfactant and co-surfactant on the physicochemical and electrochemical properties of bicontinuous microemulsion, *J. Colloid Interface Sci.* 314 (2007) 712–717. doi:10.1016/j.jcis.2007.05.080.
- [226] X. Li, G. He, W. Zheng, G. Xiao, Study on conductivity property and microstructure of TritonX-100/alkanol/n-heptane/water microemulsion, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 360 (2010) 150–158. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.02.026.
- [227] P. Bošković, V. Sokol, T. Zemb, D. Touraud, W. Kunz, Weak Micelle-Like Aggregation in Ternary Liquid Mixtures as Revealed by Conductivity, Surface Tension, and Light Scattering, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 9933–9939. doi:10.1021/acs.jpccb.5b06228.
- [228] G.D. Smith, C.E. Donelan, R.E. Barden, Oil-continuous microemulsions composed of hexane, water, and 2-propanol, *J. Colloid Interface Sci.* 60 (1977) 488–496. doi:10.1016/0021-9797(77)90313-7.
- [229] H. Zhang, M. Taxipalati, F. Que, F. Feng, Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques, *Food Chem.* 141 (2013) 3050–3055.

- doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.141.
- [230] M. Singh, I. Sinha, R.K. Mandal, Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles, *Mater. Lett.* 63 (2009) 425–427. doi:10.1016/j.matlet.2008.10.067.
- [231] H. Yang, Y. Wang, X. Chen, X. Zhao, L. Gu, H. Huang, J. Yan, C. Xu, G. Li, J. Wu, A.J. Edwards, B. Dittrich, Z. Tang, D. Wang, L. Lehtovaara, H. Häkkinen, N. Zheng, Plasmonic twinned silver nanoparticles with molecular precision, *Nat. Commun.* 7 (2016). doi:10.1038/ncomms12809.
- [232] W.J. Yoon, K.Y. Jung, J. Liu, T. Duraisamy, R. Revur, F.L. Teixeira, S. Sengupta, P.R. Berger, Plasmon-enhanced optical absorption and photocurrent in organic bulk heterojunction photovoltaic devices using self-assembled layer of silver nanoparticles, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells.* 94 (2010) 128–132. doi:10.1016/j.solmat.2009.08.006.
- [233] M.N. Alam, N. Roy, D. Mandal, N.A. Begum, Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties, *RSC Adv.* 3 (2013) 11935–11956. doi:10.1039/C3RA23133J.
- [234] M. Safaepour, A.R. Shahverdi, H.R. Shahverdi, M.R. Khorramizadeh, A.R. Gohari, Green Synthesis of Small Silver Nanoparticles Using Geraniol and Its Cytotoxicity against Fibrosarcoma-Wehi 164, *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 1 (2009) 111–115.
- [235] A. Torrecilla Escribano, Determinación del contenido de plata en nanomateriales de plata inorgánicos y poliméricos mediante digestión asistida por microondas y espectroscopía de absorción atómica de llama., Universidad de la Rioja, 2014. [https://biblioteca.unirioja.es/tfe\\_e/TFE000682.pdf](https://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/TFE000682.pdf).
- [236] N.R. Jana, T. Pal, Growing small metal particle as redox catalyst, *Curr. Sci.* 75 (1998) 145–149. doi:10.1021/jp982731f.
- [237] M. Chen, Y.G. Feng, X. Wang, T.C. Li, J.Y. Zhang, D.J. Qian, Silver nanoparticles capped by oleylamine: Formation, growth, and self-organization, *Langmuir.* 23 (2007) 5296–5304. doi:10.1021/la700553d.

- [238] V. LaMer, R. Dinegar, Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols, *J. Am. Chem. ....* 72 (1950) 4847–4854. doi:10.1021/ja01167a001.
- [239] S.K. Mehta, S. Chaudhary, M. Gradzielski, Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media, *J. Colloid Interface Sci.* 343 (2010) 447–453. doi:10.1016/j.jcis.2009.11.053.
- [240] D. V. Goia, Preparation and formation mechanisms of uniform metallic particles in homogeneous solutions, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 451. doi:10.1039/b311076a.
- [241] M. Harada, Y. Inada, M. Nomura, In situ time-resolved XAFS analysis of silver particle formation by photoreduction in polymer solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 337 (2009) 427–438. doi:10.1016/j.jcis.2009.05.035.
- [242] N.K.R. Bogireddy, H.A. Kiran Kumar, B.K. Mandal, Biofabricated silver nanoparticles as green catalyst in the degradation of different textile dyes, *J. Environ. Chem. Eng.* 4 (2016) 56–64. doi:10.1016/j.jece.2015.11.004.
- [243] W.-M. Lee, Y.-J. An, H. Yoon, H.-S. Kweon, TOXICITY AND BIOAVAILABILITY OF COPPER NANOPARTICLES TO THE TERRESTRIAL PLANTS MUNG BEAN (PHASEOLUS RADIATUS) AND WHEAT (TRITICUM AESTIVUM): PLANT AGAR TEST FOR WATER-INSOLUBLE NANOPARTICLES, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1915. doi:10.1897/07-481.1.
- [244] S.A. Al-Thabaiti, Z. Khan, S. Hussain, Biogenic silver nanosols: Flavonol based green synthesis, and effects of stabilizers on their morphology, *J. Mol. Liq.* 212 (2015) 316–324. doi:10.1016/j.molliq.2015.08.057.
- [245] K.H. Miean, S. Mohamed, Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3106–3112. doi:10.1021/jf000892m.
- [246] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 749–760.

- doi:10.1016/S0891-5849(96)00351-6.
- [247] V. Kuntic, N. Pejic, S. Micic, D. Malesev, Z. Vujic, Determination of dissociation constants of quercetin, *Pharmazie*. 58 (2003) 439–440.
- [248] A.M.O. Brett, M.E. Ghica, Electrochemical Oxidation of Quercetin, *Electroanalysis*. 15 (2003) 1745–1750. doi:10.1002/elan.200302800.
- [249] M. Alshammari Muhawwis, Determination of Silver Binding to Natural Organic Matter Using Ion Selective Electrode, Wilfrid Laurier University, 2017.
- [250] E.A. Terenteva, V. V. Apyari, S.G. Dmitrienko, Y.A. Zolotov, Formation of plasmonic silver nanoparticles by flavonoid reduction: A comparative study and application for determination of these substances, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 151 (2015) 89–95. doi:10.1016/j.saa.2015.06.049.
- [251] D.D. Evanoff, G. Chumanov, Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays, *ChemPhysChem*. 6 (2005) 1221–1231. doi:10.1002/cphc.200500113.
- [252] D.D. Evanoff, G. Chumanov, Size-Controlled Synthesis of Nanoparticles. 2. Measurement of Extinction, Scattering, and Absorption Cross Sections, *J. Phys. Chem. B*. 108 (2004) 13957–13962. doi:10.1021/jp0475640.
- [253] M. Villanueva-Ibáñez, M.G. Yañez-Cruz, R. Álvarez-García, M.A. Hernández-Pérez, M.A. Flores-González, Aqueous corn husk extract - Mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles, *Mater. Lett.* 152 (2015) 166–169. doi:10.1016/j.matlet.2015.03.097.
- [254] E.C. Da Silva, M.G.A. Da Silva, S.M.P. Meneghetti, G. Machado, M.A.R.C. Alencar, J.M. Hickmann, M.R. Meneghetti, Synthesis of colloids based on gold nanoparticles dispersed in castor oil, *J. Nanoparticle Res.* 10 (2008) 201–208. doi:10.1007/s11051-008-9483-z.
- [255] E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja, J. Grobelny, Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids, *J. Nanomater.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/313081.

- [256] P. Ghosh, *Colloid and Interface Science*, PHI Learning, 2009. <https://books.google.com.mx/books?id=U-eKKDavY7YC>.
- [257] C.R.K. Rao, D.C. Trivedi, Synthesis and characterization of fatty acids passivated silver nanoparticles - Their interaction with PPy, in: *Synth. Met.*, 2005: pp. 324–327. doi:10.1016/j.synthmet.2005.01.038.
- [258] D. Steinigeweg, S. Schlücker, Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol–water mixtures, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8682. doi:10.1039/c2cc33850e.
- [259] V. Amendola, M. Meneghetti, Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 4277–4285. doi:10.1021/jp8082425.
- [260] N. Garti, M. Avrahami, A. Aserin, Improved solubilization of Celecoxib in U-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 352–365. doi:10.1016/j.jcis.2006.01.060.
- [261] M.E. Carlotti, M. Gallarate, V. Rossatto, O/W microemulsion as vehicle for sunscreens, *J. Cosmet. Sci.* 54 (2003) 451–462.
- [262] H. Zhang, M. Taxipalati, F. Que, F. Feng, Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques, *Food Chem.* 141 (2013) 3050–3055. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.141.
- [263] D. Steinigeweg, S. Schlücker, Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol–water mixtures, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8682. doi:10.1039/c2cc33850e.
- [264] T. Huang, X.N. Xu, S.T. Huang, Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 9867–9876. doi:10.1039/C0JM01990A.

- [265] B.R.R. Rao, Chemical Composition and Uses of Indian Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* Species) Essential Oil - A Review, *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 12 (2009) 381–394. doi:10.1080/0972060X.2009.10643735.
- [266] S.M. Yakout, A.A. Mostafa, A novel green synthesis of silver nanoparticles using soluble starch and its antibacterial activity, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8 (2015) 3538–3544.
- [267] R. Dondi, W. Su, G.A. Griffith, G. Clark, G.A. Burley, Highly size- and shape-controlled synthesis of silver nanoparticles via a templated tollens reaction, *Small.* 8 (2012) 770–776. doi:10.1002/smll.201101474.
- [268] A.L. Tolstov, E. V. Lebedev, Features of the stabilization of silver nanoparticles by carbonyl-containing polymers, *Theor. Exp. Chem.* (2012) 1–14. doi:10.1007/s11237-012-9264-8.
- [269] S. Basavaraja, S.D. Balaji, A. Lagashetty, A.H. Rajasab, A. Venkataraman, Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*, *Mater. Res. Bull.* 43 (2008) 1164–1170. doi:10.1016/j.materresbull.2007.06.020.
- [270] T.F. Tadros, *Emulsion Science and Technology*, Wiley-VCH, Berkshire, 2009.
- [271] D.J. McClements, Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities, *Soft Matter.* 8 (2012) 1719–1729. doi:10.1039/C2SM06903B.
- [272] S. Clark, P.D.I. Fletcher, X. Ye, Interdroplet exchange rates of water-in-oil and oil-in-water microemulsion droplets stabilized by pentaoxyethylene monododecyl ether, *Langmuir.* 6 (1990) 1301–1309. doi:10.1021/la00097a019.
- [273] M. Boutonnet, S. Lögdberg, E. Elm Svensson, Recent developments in the application of nanoparticles prepared from w/o microemulsions in heterogeneous catalysis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13 (2008) 270–286. doi:10.1016/j.cocis.2007.10.001.