

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA Y ORO: EXPLORACIÓN DE RUTAS VERDES DE**

**SÍNTESIS**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Julio-2021

**AUTOR:** David Barceló Estevan

**TUTORES:** Carmen Reyes Mateo Martínez

María José Martínez Tomé

**Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente**

**Área de Química-Física**

**Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche**

**(IDiBE)**

**Título:** Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y oro: exploración de rutas verdes de síntesis.

**Resumen:** En la presente investigación se han sintetizado nanopartículas (NPs) de plata y oro mediante reacciones de óxido-reducción, partiendo de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{HAuCl}_4$  como precursores, respectivamente. Como agentes reductores se han utilizado, por un lado, reactivos tradicionales, variando su relación con respecto a la sal metálica, con objeto de evaluar como afectaba a la formación de las NPs. Por otro lado, dado que estos agentes suelen ser poco respetuosos con el medio ambiente, se han desarrollado nuevos protocolos para una síntesis verde, en los que el agente reductor ha sido sustituido por un extracto natural. Todas las NPs han sido caracterizadas mediante espectrometría UV-visible, para confirmar su formación, así como utilizando un analizador de tamaño de partícula. A su vez, se ha evaluado la estabilidad de las NPs bajo diferentes condiciones y se ha explorado la capacidad de ciertos productos para aumentar dicha estabilidad. Finalmente, se ha podido visualizar la morfología de las NPs utilizando un microscopio electrónico FESEM en modo de transmisión por barrido (STEM).

**Palabra clave:** Nanopartícula, agente reductor, extractos naturales, síntesis verde.

**Title:** Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles: exploration of synthesis green routes.

**Abstract:** In the present investigation, silver and gold nanoparticles (NPs) have been synthesized through oxidation-reduction reactions, starting from  $\text{AgNO}_3$  and  $\text{HAuCl}_4$  as precursors, respectively. As reducing agents, on the one hand, traditional reagents have been used, varying their relationship with respect to the metal salt, in order to evaluate how it affected the formation of NPs. On the other hand, given that these agents are usually not very respectful with the environment, new protocols have been developed for a green synthesis, in which the reducing agent has been replaced by a natural extract. All NPs have been characterized by UV-visible spectrometry, to confirm their formation, as well as using a particle size analyzer. In turn, the stability of NPs has been evaluated under different conditions and the ability of certain products to increase said stability has been explored. Finally, it has been possible to visualize the morphology of the NPs using a FESEM electron microscope in scanning transmission mode (STEM).

**Keywords:** Nanoparticle, reducing agent, natural extracts, green synthesis.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Antecedentes históricos .....	1
1.2 Nanociencia y nanotecnología .....	2
1.3 Nanopartículas de metales nobles: plata (AgNPs) y oro (AuNPs).....	3
1.3.1 Propiedades: Resonancia del plasmón de superficie localizado (LSRP) .....	3
1.3.2 Estrategias de síntesis de nanopartículas .....	4
1.3.3 Síntesis con métodos convencionales y métodos verdes.....	5
1.3.4 Aplicaciones de las nanopartículas.....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
2.1 Objetivo principal .....	8
2.2 Objetivos específicos .....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	9
3.1 Materiales y métodos de caracterización de AgNPs y AuNPs .....	9
3.2 Fabricación de AgNPs y AuNPs por métodos convencionales.....	11
3.2.1 Nanopartículas de plata .....	12
3.2.2 Nanopartículas de oro.....	13
3.3 Fabricación de AgNPs y AuNPs por métodos verdes .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	18
4.1 Métodos convencionales .....	18
4.2 Métodos verdes.....	32
<b>5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA</b> .....	38
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	39
6.1 Recursos de internet consultados .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	41



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes históricos

Los fundamentos conceptuales de la nanotecnología fueron presentados por primera vez en 1959 por el físico Richard Feynman. Feynman señaló la posibilidad de manipular la materia a escala de átomos y moléculas individuales. No fue hasta 1974 cuando Norio Taniguchi utilizó el término “nanotecnología”, cuando lo usó para referirse a la capacidad para diseñar materiales con una precisión nanométrica. Desde ese momento la principal fuerza impulsora provino de la industria electrónica, que tenía el objetivo de desarrollar dispositivos electrónicos más pequeños, llegando a obtenerse dispositivos del tamaño de 40-70 nm.

Desde ese momento, la comunidad científica se centra en el rango de tamaño que va desde los 100 nm hasta el nivel atómico (aprox. 0,2 nm), ya que en este rango los materiales pueden tener propiedades diferentes en comparación con los mismos materiales con un tamaño mayor. Las dos razones principales en este cambio de comportamiento son el aumento del área superficial y el predominio de los efectos cuánticos. Por tanto, al aumentar el área superficial y al tener un tamaño de nanómetros o menos, los efectos cuánticos obtienen más protagonismo y los materiales pueden cambiar su óptica, magnetismo o sus propiedades eléctricas (TRS, 2004).

Podemos ver a lo largo de la historia que los nanomateriales ya han sido utilizadas durante siglos, debido a sus propiedades ópticas únicas dependientes de la forma y del tamaño de estos. Hasta donde se tiene registrado, la copa de Licurgo es uno de los objetos más antiguos que contienen nanopartículas (NPs). La copa fue elaborada por los romanos en el siglo IV d.C. El proceso que los romanos seguían para la elaboración de sus vidrios propició la síntesis de nanopartículas de oro-plata. La presencia de NPs en la copa tiene como efecto que se aprecie en diferentes colores. Este color dependerá de cómo sea iluminada; estando la fuente de luz en el exterior la copa tendría un color verde amarillento (figura 1a), pero si se encuentra en el interior ésta se torna de color rojizo (figura 1b) (Freestone y col., 2007). Las vidrieras realizadas en la Edad Media contenían también NPs metálicas que les conferían un color característico.



**Figura 1.** *Copa de Licurgo. (a) Copa iluminada desde el exterior. (b) Copa iluminada desde el interior. Imagen tomada de la revista del Smithsonian. (Merali, 2013).*

El desafío que se les presentaba era hacer que todas las NPs tuvieran el mismo tamaño (y, por lo tanto, el mismo color). Y la producción de un solo tamaño de NPs sigue siendo un desafío en la actualidad.

## 1.2 Nanociencia y nanotecnología

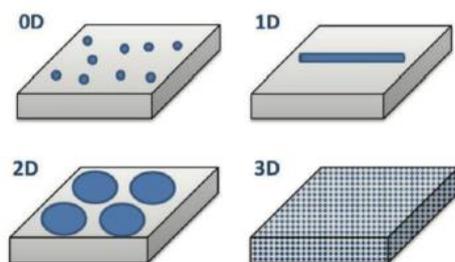
Nanociencia y nanotecnología son dos términos que a veces se confunden.

Según la *British Standards Institution*, la nanociencia estudia los fenómenos y la manipulación de materiales en la escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de las de una escala mayor (BSI, 2005), mientras que la nanotecnología estudia el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlando la forma y el tamaño a escala nanométrica (BSI, 2005).

Hay diferentes clasificaciones de los nanomateriales de acuerdo con sus dimensiones (figura 2):

- 0D (Cero-dimensional): son materiales con todas sus dimensiones ( $x, y, z$ ) dentro de la nanoescala. La mayoría de estos materiales son de forma esférica, sin embargo, formas cúbicas y poligonales con dimensiones nanométricas también se pueden encontrar. En esta categoría encontramos a las nanopartículas.
- 1D (unidimensional): son materiales con dos dimensiones ( $x, y$ ) en la nanoescala y la otra dimensión es de mayor tamaño ( $>100\text{nm}$ ). Algunos ejemplos de estos tipos de materiales son los nanocables, nanovarillas, nanotubos, fibras.
- 2D (Bidimensional): son materiales con una dimensión en la escala nanométrica, y dos dimensiones fuera de este intervalo. Estos nanomateriales, tienen forma de placas. Algunos ejemplos son: nanoláminas, nanocapas, películas poliméricas (nanofilms).

- 3D (Tridimensional): son materiales que tienen sus tres dimensiones por fuera de la escala nanométrica (>100nm), pero su interior está nanoestructurado. Ejemplos de estos materiales son las estructuras orgánicas metálicas nanoporosas, más conocidas como MOFs.



**Figura 2.** Clasificación de nanomateriales según su dimensionalidad (TRS, 2004).

### 1.3 Nanopartículas de metales nobles: plata (AgNPs) y oro (AuNPs)

Las nanopartículas son materiales con tamaños desde 1 a 100 nm, que pueden tener características diferentes en comparación con el mismo material sin tamaño nanométrico (BSI, 2005). Los dos factores principales que causan esta diferencia son:

- I. El aumento de la relación superficie/volumen.
- II. Los efectos cuánticos.

A medida que una partícula disminuye de tamaño, aumenta la proporción de átomos que se encuentran en la superficie. Por ejemplo, una partícula de 30 nm tiene un 5% de sus átomos en su superficie, a 10 nm el 20% y a 3 nm el 50%. Por tanto, las nanopartículas tienen una mayor área por unidad de masa en comparación con partículas más grandes. Y a medida que el tamaño se reduce a la nanoescala, estos dos factores afectan el comportamiento óptico, eléctrico y magnético de los materiales (TRS, 2004).

#### 1.3.1 Propiedades: Resonancia del plasmón de superficie localizado (LSRP)

El fenómeno conocido como “plasmón” es un fenómeno vibratorio típico en estado de plasmas, donde los portadores de carga libre (en este caso los electrones de la banda de conducción de la superficie de las NPs metálicas) pueden interactuar muy fácilmente con la radiación electromagnética, oscilando colectivamente en las condiciones adecuadas.

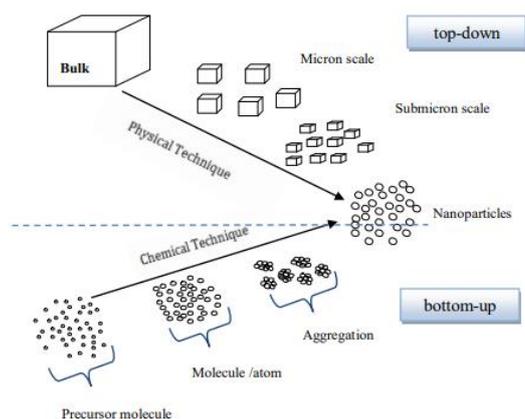
La resonancia del plasmón de superficie localizado son oscilaciones colectivas de los electrones libres de los átomos de la superficie de las NPs metálicas, que oscilan en resonancia

con la radiación electromagnética, al ser excitados por un haz de luz de longitud de onda ( $\lambda$ ) adecuada. Por lo que cuando se hace incidir luz, se produce la absorción a esa concreta  $\lambda$  y el reflejo será el color que observemos. En el caso de las AgNPs entre 350 y 400 nm es cuando se produce la absorción y en las AuNPs es entre 450 y 600 nm. Además, dependiendo del tamaño y forma de las NPs, esta banda de absorción se desplazará. En NPs esféricas, cuanto mayor es el tamaño más hacia el rojo aparece la banda de absorción, mientras que en NPs con diferente morfología, puede aparecer más de una banda.

Esta propiedad tan fascinante de las NPs metálicas resalta su naturaleza cuántica, consecuencia directa del tamaño de las NPs, y que la proporción de átomos en la superficie respecto a volumen es muy superior a la del metal macroscópico. Así los electrones de la superficie son capaces de interactuar con la radiación electromagnética siendo dicha reacción altamente dependiente de la forma, tamaño, cristalinidad y naturaleza química de las NPs, y también de las condiciones físicas y químicas del medio circundante alrededor de ellas (Cruz y col., 2012).

### 1.3.2 Estrategias de síntesis de nanopartículas

Para conseguir las NPs, se utilizan diferentes métodos de síntesis que se engloban en una de las dos posibles estrategias existentes: *Top-down* (de arriba hacia abajo) y *Bottom-up* (de abajo hacia arriba). La estrategia *Top-down* se basa en disminuir el tamaño de los materiales hasta llegar al tamaño requerido usando, principalmente, métodos físicos, aunque también puede utilizarse técnicas químicas, eléctricas o térmicas. Por el contrario, el enfoque *Bottom-up* consiste en la unión de los átomos o moléculas individuales, utilizando, entre ellos, métodos químicos (véase figura 3) (Yaya y col., 2012). Consiste en la reducción de iones metálicos desde su estado de oxidación en disolución hasta su estado elemental, seguido de un proceso de nucleación o agregación.



**Figura 3.** Los dos métodos de síntesis, *Top-down* y *Bottom-up* (Yaya y col., 2012)

Aunque los dos métodos tienen sus ventajas/inconvenientes, el método *Bottom-up* es el más empleado para la obtención de NPs. Dentro de este, se utiliza la síntesis química. Las ventajas que presenta permiten obtener NPs más pequeñas y homogéneas, controlando el proceso de agregación durante la síntesis; permite sintetizar nanopartículas a gran escala; variar el tamaño; y ser empleadas en multitud de aplicaciones.

Sorprendentemente, la síntesis de NPs metálicas es tan fácil que el problema no radica en iniciar su crecimiento, sino detenerlo según se quiera en el momento deseado para que dejen de crecer. Por tanto, el principal problema de la síntesis es que hay que provocar dos procesos opuestos al mismo tiempo: las partículas tienen que crecer incorporando masa a su superficie, pero a la vez hay que bloquear de alguna manera su superficie, para que no interactúen entre ellas aumentando de tamaño y precipitando. Además, todas deben ser iguales en tamaño, forma y naturaleza, lo que se conoce como monodispersión.

### 1.3.3 Síntesis con métodos convencionales y métodos verdes

#### 1.3.3.1 Métodos para sintetizar nanopartículas

Se ha desarrollado una gran variedad de métodos para sintetizar NPs metálicas, de los cuales los más comunes son los métodos *Bottom-up*, en los que se engloban los métodos convencionales y métodos verdes que vamos a ver.

- **Métodos convencionales:** Son los más utilizados en la actualidad. La reducción química de sales de metales en presencia de moléculas estabilizadoras es el método químico más popular para la preparación de nanopartículas metálicas. Para llevarlo a cabo es necesario el empleo de un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizante (Zhou y col., 2009). El método de reducción química más extendido es la

síntesis coloidal, esta técnica consiste en la reducción de iones metálicos a átomos cerovalente que inmediatamente actúan como centros de nucleación para dar lugar a la formación de NPs. Sus principales ventajas son (Friederici, 2013): que es muy simple y reproducible; permite obtener NPs homogéneas; permite preparar nanopartículas a gran escala y con una distribución de tamaño estrecha; la estructura, el tamaño y la forma de las partículas pueden ser controladas variando simplemente las condiciones de preparación como el tipo de reductor, el contenido de los iones metálicos, la temperatura, la velocidad de agitación y las soluciones de las nanopartículas son estables por meses y presentan extraordinarias propiedades para diversas aplicaciones.

- **Métodos verdes:** Surgen como una alternativa a los métodos tradicionales que utilizan agentes tóxicos y costosos que pueden afectar al medio ambiente y dificultar su aplicación biomédica. Se basan en el uso de extractos naturales (que contienen agentes reductores). Se ha demostrado que muchos sistemas biológicos como plantas y algas, diatomeas, bacterias, levaduras, hongos y virus pueden reemplazar a los agentes químicos reductores (Gómez-Garzón, 2018). Se ha centrado la investigación en el uso de métodos verdes con plantas, ya que presentan una puerta a la investigación fácil de reproducir y de extender a extractos aun no probados (ver tabla 1) (Lee y col., 2020).

**Tabla 1.** Ventajas e inconvenientes de las plantas para la síntesis de NPs de plata y oro

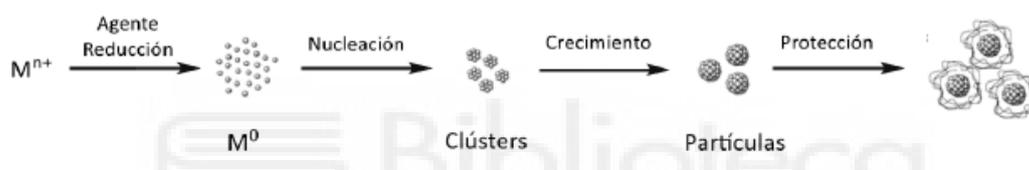
Extractos verdes	Ventajas	Inconvenientes	Aplicaciones
Plantas	El método de síntesis es simple y sencillo. Es fácil controlar el tamaño y forma de las NPs. Y la reducción de NPs es relativamente rápido y rentable.	Es difícil determinar el reactivo de las plantas porque los extractos de la planta contienen muchos compuestos orgánicos.	Biomédicas, eliminación de metales pesados, catalizadores.

### 1.3.3.2 Mecanismo de síntesis y formación de nanopartículas

Se ha realizado en este proyecto la síntesis de NPs de plata y oro cuyo proceso consta de las siguientes etapas (Oroz, 2009) (figura 4):

- Obtención de átomos metálicos en estado de oxidación cero, mediante reacciones de oxidación-reducción.

- **Nucleación:** En esta etapa dos o más átomos chocan y se unen para formar un cúmulo. El núcleo crítico es el tamaño más pequeño del cúmulo que es estable para las condiciones experimentales en que se realiza la síntesis de nanopartículas. A partir de este tamaño se considera que se inicia el crecimiento de la nanopartícula.
- **Crecimiento:** Se adicionan los núcleos unos a otros para dar lugar a la formación de la nanopartícula. Se produce por agregación de átomos provenientes de la etapa de reducción y cúmulos ya existentes, o bien por colisión entre cúmulos.
- **Adsorción de un agente estabilizante:** Las partículas metálicas en disolución tienden a aglomerarse debido a las interacciones de Van der Waals, por lo que es primordial estabilizarlas adicionando diferentes agentes estabilizantes que controlen tanto la velocidad de reducción de los iones metálicos como el proceso de agregación de los átomos metálicos al neutralizar las fuerzas electrostáticas.



**Figura 4.** Proceso de formación de nanopartículas metálicas.

### 1.3.3.3 Parámetros de control de la reacción

Las características más significativas de las NPs son su tamaño y forma. Por tanto, para su control también hay que modificar y controlar otros parámetros:

- **Temperatura de síntesis:** El aumento de la temperatura aumenta la ratio de nucleación, lo que provoca que las NPs sean más pequeñas (Makarov y col., 2014).
- **Tiempo de reacción:** Interviene en mayor medida en el tamaño de nanopartícula, ya que parando la reacción o alterando sus condiciones se puede evitar acabar la fase de crecimiento en las condiciones iniciales. Los cambios de color y la medición del espectro UV-Vis pueden indicar indirectamente el crecimiento de las nanopartículas.
- **Concentración:** Si la concentración de catión metálico está por encima de una concentración crítica, la nucleación está favorecida. Una nucleación favorecida causa una disminución en el tamaño medio de las nanopartículas y un aumento en su número.

### 1.3.4 Aplicaciones de las nanopartículas

Las NPs tienen muchas aplicaciones debido a sus propiedades únicas. Esto ha hecho posible su aplicación en diversos campos como el tecnológico, la medicina, etc. Algunas aplicaciones son (TRS, 2004):

- Utilización en cosmética y en protectores solares, ya que absorben y reflejan la radiación ultravioleta (UV).
- En el uso doméstico, por las propiedades bactericidas. Al igual que en textil, para elaborar calcetines y otros productos que prevengan de infecciones.
- En la electrónica se utilizan para fabricar transistores, aprovechando sus propiedades eléctricas.
- En la medicina, gasas para quemaduras con AgNPs, que actúan como bactericida. O en cremas para dolores musculares. También para ir conjugadas con otras moléculas, para actuar como fármacos específicos.

En resumen, que las propiedades que se obtienen al tener las NPs establecidas les confieren una cantidad inmensa de posibilidades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo principal

El objetivo principal de este proyecto es encontrar las condiciones experimentales necesarias para establecer protocolos para la síntesis y caracterización de NPs de plata y oro, tanto por métodos convencionales como utilizando rutas verdes que sustituyan los agentes reductores tradicionales por extractos naturales, menos agresivos con el medio ambiente, tales como té verde, miel, romero o pétalos de rosa. Se han empleado métodos estandarizados (convencionales) para entender el proceso.

Este objetivo principal se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos específicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar AgNPs y AuNPs mediante reacciones de óxido-reducción tradicionales, partiendo de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y ácido tetracloroaurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) como precursores del metal, respectivamente.

- Evaluar cómo influye la relación entre el precursor metálico y el agente reductor en la formación de las NPs metálicas.

- Caracterizar las NPs mediante técnicas de absorción, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica, con objeto de conocer su tamaño, polidispersión y morfología.

- Analizar la estabilidad de las AgNPs y AuNPs bajo diferentes condiciones y encontrar agentes estabilizantes que mejoren sus propiedades.

- Seleccionar extractos naturales y explorar su capacidad para ser utilizados como agentes reductores en la formación de AgNPs y AuNPs .

- Caracterizar las NPs sintetizadas mediante métodos verdes, utilizando espectroscopía de absorción, DLS y microscopía electrónica.

- Determinar la eficacia y estabilidad de los métodos verdes a la hora de sintetizar NPs, a la vez de crear protocolos nuevos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales y métodos de caracterización de AgNPs y AuNPs

Las NPs de plata y oro, una vez formadas, se encuentran en dispersión acuosa, por lo que el uso de un espectrofotómetro UV-Vis y un DLS (dispersión dinámica de la luz) para su caracterización es viable. Y para caracterizar con el microscopio electrónico de transmisión por barrido (STEM) la muestra deberá prepararse por separado y llevarse a sequedad. Estas técnicas son las que se usaron para caracterizar las NPs obtenidas en laboratorio:

- **Espectrofotómetro UV-Visible:** Compara la radiación luminosa absorbida o transmitida por una solución respecto de un blanco; esto permite obtener información acerca de la concentración (absorbancia en el pico de máxima absorción), tamaño (posición del pico) y homogeneidad de tamaños (ancho del pico) de la muestra. El rango de longitudes de onda que utiliza el equipo (imagen 1) van desde los 220 nm hasta los 850 nm. Para cada longitud de onda, la muestra tendrá un valor de absorbancia (Shimadzu, 2021).



**Imagen 1.** Espectrofotómetro UV-Vis modelo UV-2700 de Shimadzu, donde se han obtenido los espectros de absorbancia.

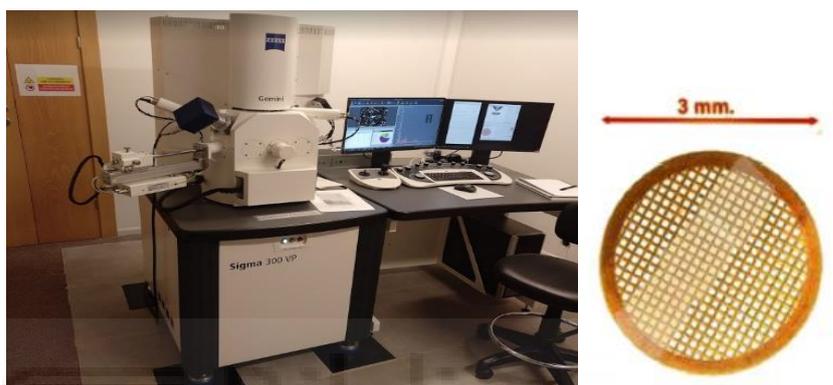
Al conocer la longitud de onda asociada se puede estimar el diámetro de las nanopartículas. Del ancho del pico se puede tener una idea de la distribución de diámetros al comparar diferentes muestras. En caso de ser el pico más estrecho corresponderá con una muestra con menor dispersión en tamaños, es decir, la diferencia en el valor de diámetros es de unos pocos nanómetros, lo que llamaremos monodispersión de la muestra. Pero si el pico es ancho puede haber diferencia en los valores de sus diámetros por unas decenas o cientos de nanómetros, lo que llamaremos polidispersión de la muestra (Mayya y col., 1997).

- **DLS (Dispersión Dinámica de la Luz):** Es una técnica que permite medir el tamaño (radio hidrodinámico) y la distribución de tamaño de las moléculas y partículas en una disolución (ver imagen2). Esta técnica utiliza un láser que enfoca en las partículas y analiza la luz dispersa para determinar el tamaño. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein (Falke & Betzel, 2019).



**Imagen 2.** Banco de trabajo con DLS (dispersión dinámica de la luz) modelo Zetasizer Nano ZS de Malvern Panalytical.

- **Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM, por sus siglas en inglés) en modo STEM (microscopía electrónica de barrido y transmisión):** es un instrumento que proporciona imágenes tridimensionales de la morfología externa de una muestra, permitiendo la observación y caracterización de los materiales. Este microscopio requiere muestras electrotransparentes (espesores inferiores a los 100 nm) y permite ver su microestructura, así como evaluar su composición química. Para preparar las muestras, hay que coger una cantidad muy pequeña y depositarla sobre el soporte. La gota se deja secar al aire.



*Figura 5. Microscopio Electrónico de Barrido modelo SIGMA 300 VP de ZEISS de emisión de campo de cátodo caliente Schottky, junto a la rejilla de cobre que sirve como soporte para la muestra.*

- **Material utilizado:** Vaso de precipitados, matraz aforado, temporizador, balanza, probeta, micropipetas, puntas de micropipetas, pipetas Pasteur, placa calefactora, hielo, agitador magnético, campana extractora, agitador vortex, cubetas de plástico.
- **Reactivos utilizados.** Casa comercial de los reactivos:  $\text{AgNO}_3$  (Merck),  $\text{NaBH}_4$  (Sigma Aldrich),  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma Aldrich), citrato sódico (Sigma Aldrich), ácido ascórbico (Sigma Aldrich),  $\text{NaOH}$  (Sigma Aldrich),  $\text{NaCl}$  (Scharlau), BSA (Sigma Aldrich), lisozima (Sigma Aldrich), PVP (Sigma Aldrich).

### 3.2 Fabricación de AgNPs y AuNPs por métodos convencionales

En este apartado describiremos los diferentes métodos convencionales en los que nos hemos basado para llevar a cabo la síntesis de las AgNPs y AuNPs.

El **método de Creighton** utilizado para las AgNPs fue uno de los primeros métodos descritos. Consiste en la reducción de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) con el agente reductor borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ). Este método es el más popular en la actualidad y da lugar a la

obtención de AgNPs de aproximadamente 10 nm de diámetro y con una distribución estrecha de tamaños (monodispersas) (Oroz, 2009).

Para las AuNPs nos hemos basado en el **método de Turkevitch**, que consiste en la reducción del ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) con el agente reductor citrato sódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_9$ ). Da lugar a AuNPs de aprox. 20 nm de diámetro. Además, se ha utilizado un segundo método que usa el ácido ascórbico como agente reductor.

### 3.2.1 Nanopartículas de plata

- **Reactivos:**  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.
- **Disoluciones de partida:**

Preparar 50 mL de  $\text{AgNO}_3$  0,001 M a partir de una disolución de 0,1 M con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

Preparar 250 mL de  $\text{NaBH}_4$  0,002 M con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. Colocar el matraz aforado en un baño de hielo y dejar que se enfríe alrededor de 20 minutos.

- **Síntesis de AgNPs por el método Creighton**

- Primero se llena la bureta con  $\text{AgNO}_3$  0,001 M.

- Se mide 20 mL de  $\text{NaBH}_4$  0,002 M con una probeta y se introduce en un matraz Erlenmeyer. Se introduce un imán, y se lleva a una placa agitadora y se pone en agitación vigorosa. Todo ello en contacto constante con hielo.

- Añadir gota a gota los volúmenes elegidos de  $\text{AgNO}_3$  a la disolución y parar la agitación al acabar de añadir el  $\text{AgNO}_3$ . La disolución debería de volverse amarillo claro.

- **Caracterización de las NPs de plata**

Se ha realizado espectro de absorción de las NPs de plata. El espectro de absorción se realiza entre las longitudes de onda de 350-500 nm. Para realizar el espectro de absorción, cogemos una cubeta para poder utilizarlas en el espectrofotómetro y en el DLS. Se introducen los 2 mL de la dilución anteriormente dicha y se hace previamente un blanco con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. Una vez que se obtiene estas medidas se representan en una gráfica.

Se realiza DLS de las NPs de plata sintetizadas, para obtener su tamaño y polidispersión. Se realiza a todos, espectro de absorción con y sin NPs y DLS solo con NPs.

Y con el microscopio electrónico se obtienen imágenes de las NPs seleccionadas.

- **Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes**

Los agentes estabilizantes que vamos a usar son:

- BSA (albúmina de suero bovino) ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M)
- Lisozima (enzima) ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M)
- PVP (polivinilpirrolidona) (polímero) (0,3 %)

A partir de las NPs sintetizadas se preparan 4 cubetas a las que se les añaden 10  $\mu$ L de BSA, lisozima y PVP para estabilizarlas y H<sub>2</sub>O MilliQ para utilizarla como blanco. Se hacen espectros de absorción antes y después de añadir los agentes estabilizadores y el DLS solo después.

Cada cubeta se divide a su vez en 2 cubetas de 1 mL a la que se añaden 10  $\mu$ L de NaCl (1,5 M) y NaOH (2,8 M) respectivamente. Se hace el espectro de absorción de las cubetas. Se añaden estas dos sales para ver su estabilidad, ya que estas rompen las interacciones electrostáticas si no son estables.

### 3.2.2 Nanopartículas de oro

- **Reactivos:** HAuCl<sub>4</sub>, citrato sódico, ácido ascórbico, H<sub>2</sub>O MilliQ.
- **Disoluciones de partida:**

Preparar 250 mL de HAuCl<sub>4</sub> 1 mM con H<sub>2</sub>O MilliQ.

Preparar 5 mL de HAuCl<sub>4</sub> 50 mM con H<sub>2</sub>O MilliQ.

Preparar 25 mL de citrato sódico 88 mM con H<sub>2</sub>O MilliQ.

Preparar 5 mL de ácido ascórbico 10 mM con H<sub>2</sub>O MilliQ.

- **Síntesis de AuNPs por el método de Turkevitch**

- Primero se añade 20 mL de HAuCl<sub>4</sub> 1 mM en un matraz Erlenmeyer. Este se pone en una placa calefactora-agitadora, donde se deja en agitación.

- Se añade 2 mL de citrato sódico 88 mM cuando la disolución anterior este hirviendo.

- Continuar hirviendo y agitando hasta que la solución adquiera un color rojo (10 min). Añadir H<sub>2</sub>O MilliQ necesaria para mantener el volumen total de la solución cercano a 22 mL.

- **Síntesis de AuNPs por el método del ácido ascórbico**

La síntesis de las AuNPs mediante este método es momentánea. Se realiza en la cubeta, ya que vamos a utilizar volúmenes muy pequeños.

En nuestra concentración de referencia añadimos:

-1940  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ

-60  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM y 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  50 mM.

Y se agita durante 30-60 segundos en un agitador vortex. A partir de esta medida de referencia, se varía la concentración de ácido ascórbico y  $\text{HAuCl}_4$  para ver qué ocurre.

- **Caracterización de las NPs de oro** (se realiza el mismo proceso que en AgNPs)
- **Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes** (se realiza el mismo proceso que en AgNPs)

### 3.3 Fabricación de AgNPs y AuNPs por métodos verdes

El objetivo se centra en la obtención de nanopartículas utilizando extractos naturales. El objeto de utilizar estos extractos se centra en utilizar desde el principio materias que sean respetuosas con el medio ambiente. Para ello se ha experimentado con: té verde, miel, romero y pétalos de rosa, dado que todos ellos poseen propiedades reductoras.

El mismo procedimiento se ha utilizado para obtener NPs tanto de plata como de oro. Y conforme se ha obtenido los datos, hemos visto cuales funcionaban y cuáles no.

- **Reactivos:**  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{HAuCl}_4$ , té verde, miel, romero, pétalos de rosa,  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.
- **Disoluciones de partida:**

Preparar  $\text{AgNO}_3$  1 mM.

Preparar  $\text{HAuCl}_4$  1 mM.

Los volúmenes de preparación pueden variar según las necesidades.

- **Preparación de los extractos naturales:**

-**Té verde:** Disolver una bolsita de té (*Camellia sinensis*) de unos 1,8 gramos en 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ en un vaso de precipitados. El agua se calienta a tempera de ebullición y se le añade la bolsita con el té. Proceso idéntico a la realización de una infusión. Se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos.

-**Miel:** Disolver 38 g de miel en 150 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. Se calienta ligeramente para favorecer la disolución y se mantiene en agitación hasta observar que toda la miel se ha disuelto. Se utiliza un filtro de 0,8  $\mu\text{m}$ .

-**Romero:** Disolver 2 g de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en 50 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ en un vaso de precipitados. El agua se calienta a temperatura de ebullición y se le añade el romero. Se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos.

-**Pétalos de rosa:** Se limpian unos 40-50 pétalos de rosa (*Rosa sp.* L.) con agua destilada y se secan durante 3-4 días en una estufa a 37 °C. Tras el secado, se muelen en un mortero hasta tener un polvo fino. Se disuelve en 50 mL con etano al 70%. Esta disolución se mantiene a oscuras durante 3 días a temperatura ambiente.



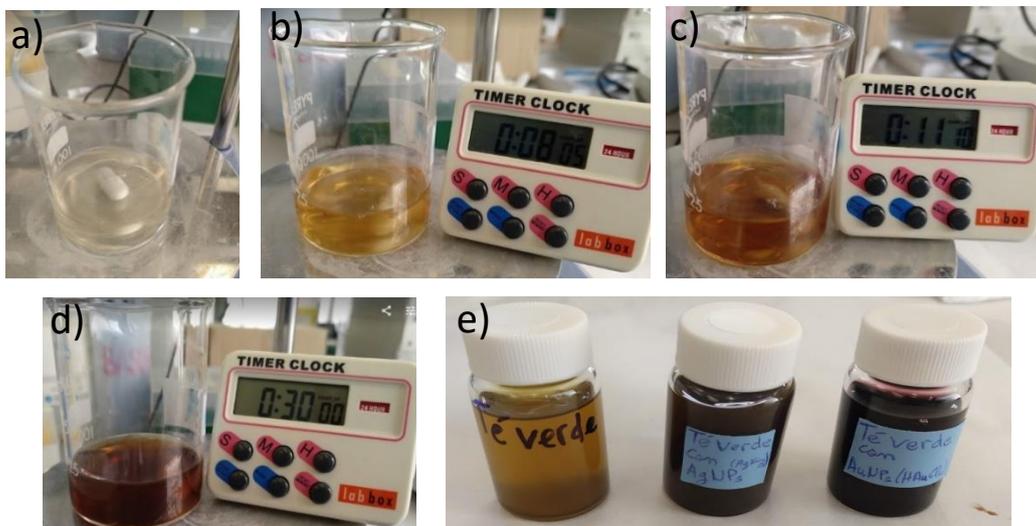
**Imagen 3.** Pétalos de rosa antes y después del secado.

- **Preparación de NPs de plata y oro**

Preparación de Ag y Au NPs empleando *té verde* como agente reductor.

-Se añade 1 mL de extracto de té sobre 20 mL de AgNO<sub>3</sub> 1 mM. Se mantiene la mezcla en agitación y sin calentar. Y tras unos 30 minutos la disolución se oscurecerá indicando la aparición de nanopartículas (imagen 4). Para realizar el espectro de absorbancia, se toma 6 mL de la disolución y se diluye en 20 mL de H<sub>2</sub>O MilliQ.

-Para el oro es el mismo proceso.



**Imagen 4.** Cambio de color que se produce durante los 30 minutos de agitación con las AgNPs (a, b, c y d). Resultado final de las diferentes NPs con té (e).

### Preparación de Ag y Au NPs empleando *miel* como agente reductor.

-Se añade 15 mL de extracto de miel sobre 20 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM. Se mantiene en agitación magnética calentando la disolución hasta 80 °C durante 10 minutos. Para realizar el espectro de absorbancia, se toma 6 mL de la disolución y se diluye en 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

-Para el oro es el mismo proceso.



**Imagen 5.** Extracto de miel y AgNPs con miel.

### Preparación de Ag y Au NPs empleando *romero* como agente reductor.

-Se añade 1 mL de extracto de romero sobre 20 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM. Se mantiene la mezcla en agitación y sin calentar. Y tras unos 30 minutos la disolución se oscurecerá indicando la aparición de nanopartículas. Para realizar el espectro de absorbancia, se toma 6 mL de la disolución y se diluye en 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

-Para el oro es el mismo proceso.



**Imagen 6.** Resultado final de las NPs con romero.

### Preparación de Ag y Au NPs empleando *pétalos de rosa* como agente reductor.

-Se añade 5 mL del extracto de pétalos de rosa sobre 95 mL de  $\text{AgNO}_3$  1 mM. Se mantiene en agitación magnética durante aproximadamente 60 minutos. Para realizar el espectro de absorbancia, se toma 6 mL de la disolución y se diluye en 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

-Para el oro es el mismo proceso.



*Imagen 7. Resultado final de las NPs con pétalos de rosa.*

- **Caracterización de las NPs de plata y oro**

Se ha realizado espectro de absorción de las NPs de plata y oro. El espectro de absorción se realiza entre las longitudes de onda de 350-700 nm. Para realizar el espectro de absorción, cogemos una cubeta para poder utilizarlas en el espectrofotómetro y en el DLS. Se introducen los 2 mL de la dilución anteriormente dicha y se hace previamente un blanco con H<sub>2</sub>O MilliQ. Una vez que se obtiene estas medidas se representan en una gráfica. Se ha utilizado cubeta de cuarzo, para poder realizar el espectro en el rango del UV, con el romero.

Se realiza DLS de las NPs de plata y oro sintetizadas, para obtener su tamaño y polidispersión. Se realiza a todos, espectro de absorción con y sin NPs y DLS solo con NPs.

Y con el microscopio electrónico se obtienen imágenes de las NPs seleccionadas.

- **Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes**

Los agentes estabilizantes que vamos a usar son:

- BSA (albúmina de suero bovino) ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M)
- Lisozima (enzima) ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  M)
- PVP (polivinilpirrolidona) (polímero) (0,3 %)

A partir de las NPs sintetizadas se preparan 4 cubetas a las que se les añaden 10  $\mu$ L de BSA, lisozima y PVP para estabilizarlas y H<sub>2</sub>O MilliQ para utilizarla como blanco. Se hacen espectros de absorción antes y después de añadir los agentes estabilizadores y el DLS solo después.

Cada cubeta se divide a su vez en 2 cubetas de 1 mL a la que se añaden 10  $\mu$ L de NaCl (1,5 M) y NaOH (2,8 M) respectivamente. Se hace el espectro de absorción de las cubetas. Se añaden estas dos sales para ver su estabilidad, ya que estos rompen las interacciones electrostáticas si no son estables.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Métodos convencionales

#### ⇒ Nanopartículas de plata

- Síntesis de AgNPs por el método de Creighton

Partimos de un volumen constante de 20 mL de  $\text{NaBH}_4$  0,002 M al que se le añadieron volúmenes crecientes de una disolución de  $\text{AgNO}_3$  (0,001M): 1, 2, 5, 10, 15 y 20 mL.

Para comprobar si el volumen inicial de  $\text{NaBH}_4$ , influía en la síntesis de las NPs, se repitió el protocolo anterior utilizando un volumen del agente reductor de 15 mL y manteniendo todos los pasos anteriores.

Las disoluciones obtenidas se muestran en la imagen 8. En todos los casos se observa un cambio de color, desde un amarillo muy pálido hasta una coloración marrón. Estos resultados indican que se han sintetizado las NPs, aunque de diferentes tamaños en función del color.

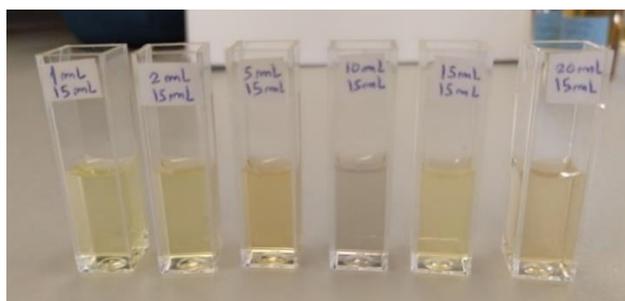


**Imagen 8.** Disoluciones obtenidas tras la síntesis de AgNPs a partir de un volumen constante de  $\text{NaBH}_4$  (0,002 M): 20 mL (a) y 15 mL (b), aumentando el volumen de  $\text{AgNO}_3$  (0,001M).

- Caracterización de las NPs de plata

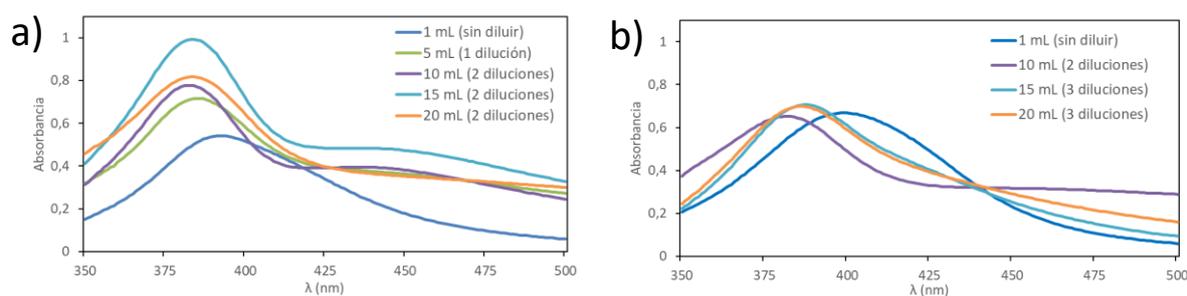
Como se comentó en la sección 1.3.1 de la Introducción, el fenómeno LSRP propio de las NPs metálicas se manifiesta por la aparición de bandas de absorción en el visible. Por ello, con objeto de confirmar la formación de las AgNPs, en primer lugar, se recogieron los espectros de absorción de las diferentes disoluciones. Además, para determinar su tamaño y heterogeneidad, las mismas muestras se analizaron por DLS.

El espectro de absorción se realizó entre las longitudes de onda de 350-500 nm. Con este fin, se pipetearon 2 mL de cada vial y se transfirieron a una cubeta (imagen 9) que fue utilizada tanto en el espectrofotómetro como en el DLS. De cada una de las muestras se recogió el espectro de absorción y cuando el valor de absorbancia obtenido en el máximo del espectro fue superior a 1, la muestra se diluyó con H<sub>2</sub>O MilliQ hasta obtener absorbancias por debajo de este valor.



**Imagen 9.** Cubetas con 2 mL de las disoluciones de AgNPs correspondientes a la imagen 8b.

En la figura 6 se representan los espectros de absorción de las distintas disoluciones. Los resultados muestran que en todos los casos se formaron AgNPs ya que todos los espectros presentan la banda característica de LSRP. La longitud de onda a la que aparece el máximo de esta banda se relaciona con el tamaño de la NP, mientras que el hecho de que aparezca una segunda banda sugiere que la forma de la NP no es esférica. Teniendo en cuenta este hecho, los resultados indican que las NPs de mayor tamaño son las que presentan menor cantidad de AgNO<sub>3</sub> y que algunas de las NPs sintetizadas no son esféricas.



**Figura 6.** Espectros de absorción de AgNPs sintetizadas tras añadir volúmenes crecientes de AgNO<sub>3</sub> (0,001 M) a un volumen constante de NaBH<sub>4</sub> (0,002M): 20 mL (a) y 15 mL (b).

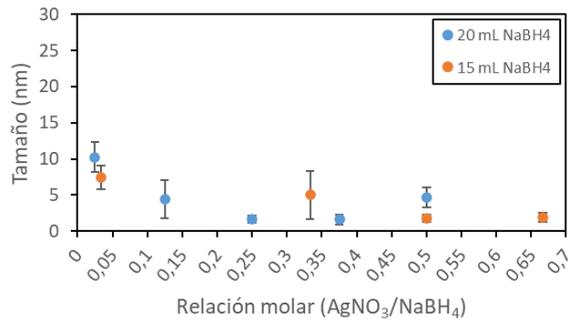
La tabla 2 muestra los tamaños y el índice de polidispersidad (PDI), medidos mediante DLS, correspondientes a algunas de las disoluciones anteriores. El valor de PDI da información sobre como de homogénea es la suspensión. Un PDI > 0.15 indica que no todas las NPs tienen el mismo tamaño. Los resultados de la tabla muestran un alto valor de PDI para casi todas las muestras analizadas, lo que sugiere que se han sintetizado diferentes poblaciones de NPs que varían en el tamaño y posiblemente en la forma. En la tabla también se incluyen los tamaños promedios de estas poblaciones. En la mayoría de los casos se obtuvo una distribución de poblaciones con más de un pico, aunque en la tabla solo se presentan los tamaños de las poblaciones mayoritarias.

**Tabla 2.** Diámetro hidrodinámico (*d*) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AgNPs correspondientes a los espectros representados en la figura 6.

20 mL NaBH <sub>4</sub>		d
AgNO <sub>3</sub> (mL)	PDI	Pico 1 ± error (nm)
1	0,289	10,2 ± 2,1
5	0,605	4,4 ± 2,6
10	0,470	1,6 ± 0,5
15	0,480	1,6 ± 0,7
20	0,532	4,7 ± 1,4

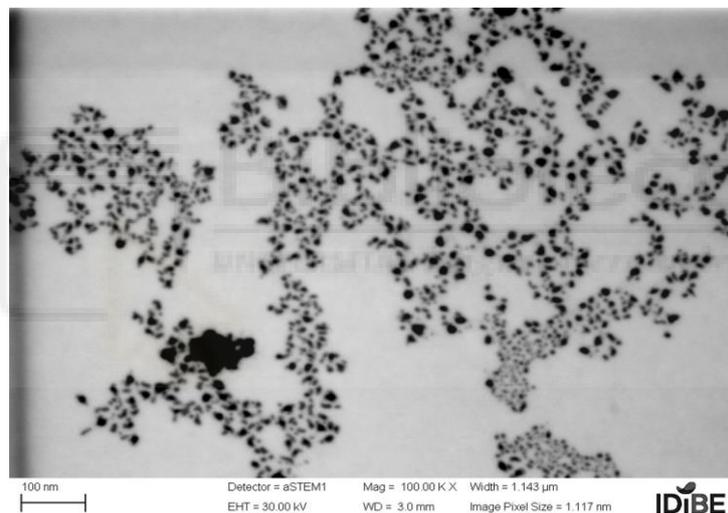
15 mL NaBH <sub>4</sub>		d
AgNO <sub>3</sub> (mL)	PDI	Pico 1 ± error (nm)
1	0,293	7,4 ± 1,6
10	0,557	5,0 ± 3,3
15	0,476	1,8 ± 0,5
20	0,564	1,9 ± 0,6

Con objeto de visualizar mejor los resultados de la tabla 2, se ha representado en la figura 7 el tamaño de las diferentes AgNPs frente a la relación molar AgNO<sub>3</sub>/NaBH<sub>4</sub>. Los resultados indican que el tamaño disminuye conforme aumenta esta relación molar. Los datos para realizar la figura 7 se encuentran en el apartado de Anexos (Anexo I).



**Figura 7.** Tamaño de AgNPs frente a la relación molar AgNO<sub>3</sub>/NaBH<sub>4</sub>.

Para confirmar la formación de las AgNPs se seleccionó la muestra preparada con 15 mL de NaBH<sub>4</sub> y 2 mL de AgNO<sub>3</sub>, para ser observada bajo el microscopio electrónico (imagen 10). Los resultados mostrados concuerdan con los obtenidos con los otros procesos, confirmando que tenemos una formación de NPs que varían en tamaño y forma.

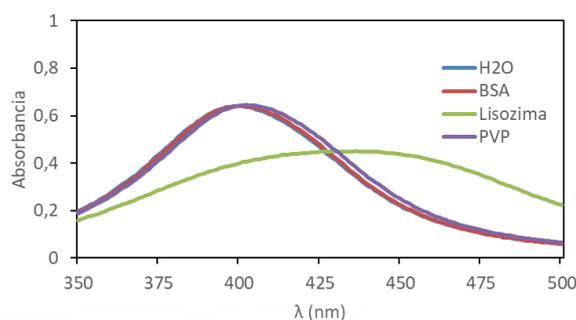


**Imagen 10.** Fotografía STEM de AgNPs preparadas con 15 mL NaBH<sub>4</sub> y 2 mL AgNO<sub>3</sub>.

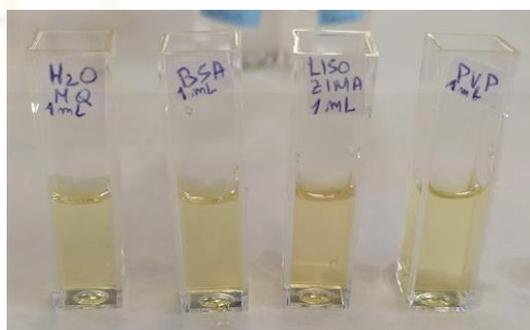
- **Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes**

Una de las limitaciones de las AgNPs y AuNPs es su tendencia a agregar cuando se modifica el pH o la fuerza iónica del medio. Con el fin de evitar este problema es conveniente añadir un agente estabilizante, que rodee a las NPs, impidiendo su acercamiento. Este agente estabilizante puede ser un polímero o una proteína. En el siguiente estudio se han explorado tres posibles agentes estabilizantes: el polímero PVP y las proteínas BSA y lisozima. Para estudiar su efecto se ha seleccionado una de las muestras preparadas anteriormente, la correspondiente al vial conteniendo 15 mL de NaBH<sub>4</sub> y 1 mL de AgNO<sub>3</sub>. Esta muestra se dividió

en 4 cubetas. A una de ellas se le añadió H<sub>2</sub>O MilliQ, para utilizarla como control, y a las tres restantes se les añadió 10 µL de BSA (1,5·10<sup>-5</sup> M), lisozima (1,5·10<sup>-5</sup> M) y PVP (0,3 %). En la figura 8 se representan los espectros de absorción correspondientes a estas mezclas y en la tabla 3 los tamaños y PDI de las mismas. Los resultados muestran que tanto el PVP como la BSA, no modificaron las propiedades de las NPs, mientras que la adición de lisozima indujo su agregación, por lo que esta muestra se descartó para el siguiente experimento. Este efecto también se observa en la imagen 11, donde se ve que el color de la muestra conteniendo lisozima comienza a oscurecerse.



**Figura 8.** Espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas a partir de 15 mL de NaBH<sub>4</sub> y 1 mL de AgNO<sub>3</sub>, tras la adición de 10 µL de H<sub>2</sub>O, BSA, lisozima y PVP.

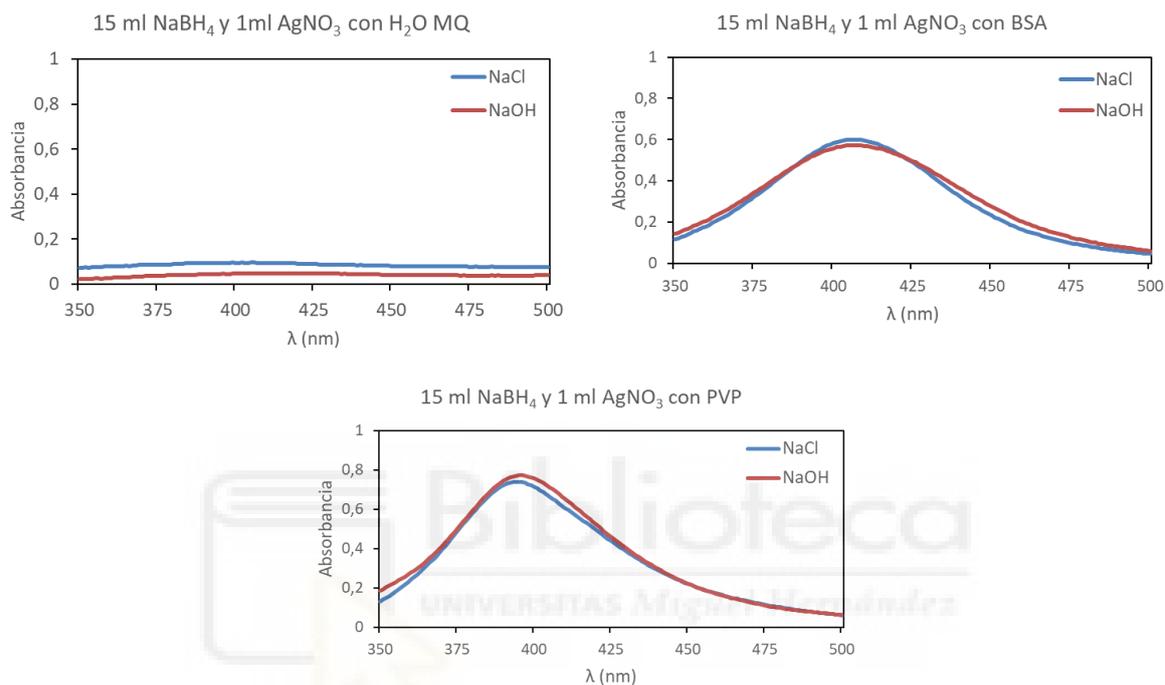


**Imagen 11.** AgNPs una vez añadidos los agentes estabilizantes.

**Tabla 3.** Diámetro hidrodinámico (d) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AgNPs de la imagen 11.

15 mL NaBH <sub>4</sub>	1 mL AgNO <sub>3</sub>	d
Reactivos	PDI	Pico 1 ± error (nm)
H <sub>2</sub> O MQ	0,249	7,6 ± 1,6
BSA	0,281	8,2 ± 2,9
Lisozima	Agregan NPs	
PVP	0,274	7,3 ± 1,4

Una vez descartada la muestra con lisozima, las otras muestras se dividieron en dos cubetas a las que se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NaCl (1,5 M) y NaOH (2,8 M), respectivamente. En la figura 9 se representan los espectros de absorción correspondientes a estas mezclas. Los resultados muestran que en ausencia de PVP y BSA, la adición de NaCl y NaOH provocó la desaparición de las AgNPs, mientras que en su presencia se mantuvieron estables, lo que demuestra la acción estabilizante de estos agentes.



**Figura 9.** Efecto del NaCl y NaOH sobre los espectros de absorción de las AgNPs, sintetizadas con  $\text{NaBH}_4$ , en ausencia y en presencia de BSA y PVP.

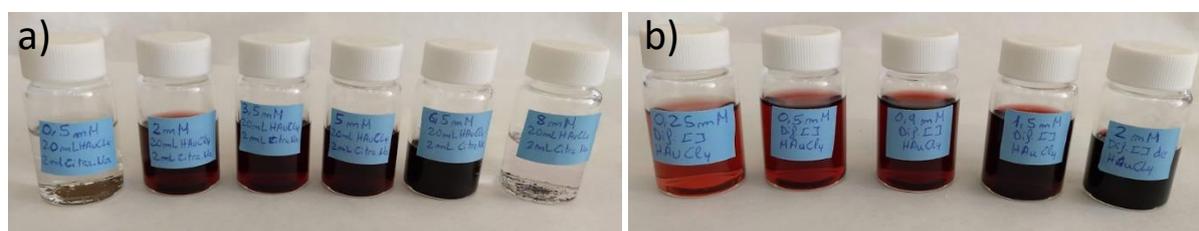
## ⇒ Nanopartículas de oro

### • Síntesis de AuNPs por el método de Turkevitch

Primero se prepararon una serie de muestras manteniendo constante la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  (1 mM) y variando la concentración de agente reductor (citrato sódico): 0,5; 2; 3,5; 5; 6,5 y 8 mM. Cuando se produjo la reacción, todas las disoluciones cambiaron a un color rojo vino, de distinta intensidad, excepto las correspondientes a las concentraciones de 0,5 y 8 mM, lo que sugería que las AuNPs se habían formado en las otras cuatro muestras, por lo que las dos anteriores fueron descartadas (imagen 12a).

Después variarnos la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  (0,25; 0,5; 0,9; 1,5 y 2 mM) manteniendo la de citrato sódico constante (38,8 mM), y siempre manteniendo los mismos volúmenes. En

este caso, todas las muestras adquirieron un color rojizo, cuya intensidad se incrementó conforme aumentaba la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  (imagen 12b).

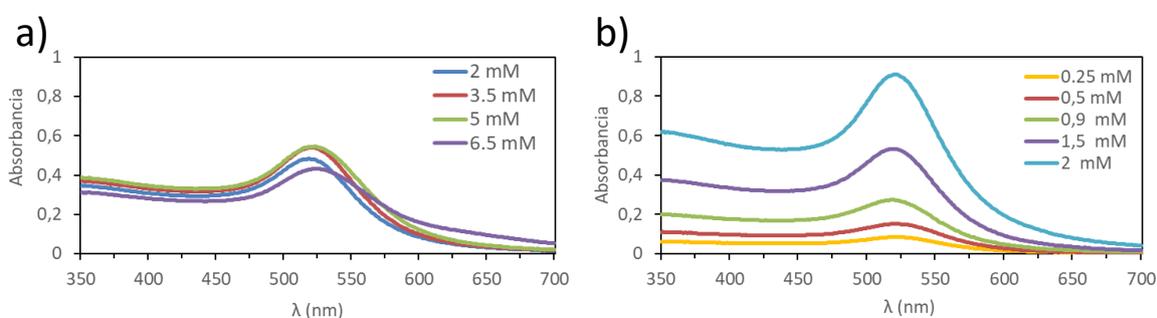


**Imagen 12.** Disoluciones obtenidas tras la síntesis de AuNPs a partir de una concentración constante de  $\text{HAuCl}_4$  (1 mM) (a) y una concentración constante de citrato sódico (38,8 mM) (b).

### Caracterización de las NPs de oro

Con objeto de confirmar la formación de las AuNPs, en primer lugar, se recogieron los espectros de absorción de las diferentes disoluciones. Además, para determinar su tamaño y heterogeneidad, las mismas muestras se analizaron por DLS. El espectro de absorción se realizó entre las longitudes de onda de 350-700 nm. Dado que las NPs obtenidas estaban muy concentradas, tuvieron que diluirse con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, cogiendo solo 0,2 mL de la preparación y el 1,8 restante con  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

En la figura 10 se representan los espectros de absorción de las distintas disoluciones. Estos espectros muestran bandas de absorción a longitudes de onda mayores que las observadas para las AgNPs y que se corresponden con la región de absorción de las AuNPs, por lo que se confirma su formación. Los resultados sugieren que ni la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  ni la de citrato parecen tener mucho efecto sobre el tamaño final de la NP, ya que no se observan desplazamientos importantes en los máximos de absorción.



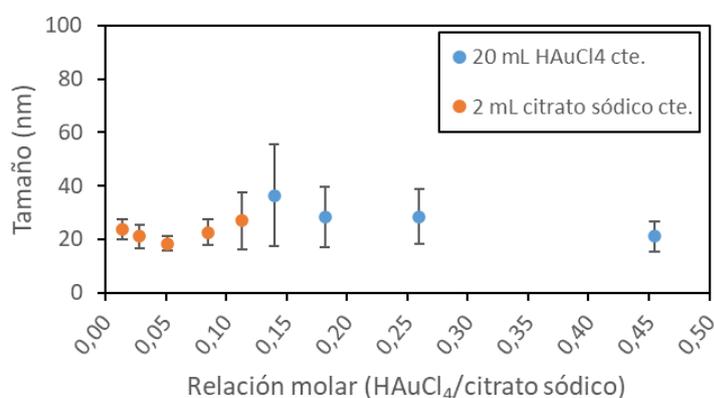
**Figura 10.** Espectros de absorción de AuNPs sintetizadas a partir de una concentración constante de  $\text{HAuCl}_4$  (1 mM) variando la de citrato (a) y una concentración constante de citrato sódico (38,8 mM) variando la de oro (b).

En la tabla 4 se recogen los tamaños y PDI de las muestras anteriores. Los resultados confirman lo observado en los espectros, es decir, la poca influencia de las concentraciones de partida en el tamaño de las NPs formadas. Estos tamaños en general fueron superiores a los obtenidos para las AgNPs. Los datos de la tabla se pueden visualizar mejor en la figura 11, en la que se representa el tamaño de las AuNPs frente a la relación molar  $\text{HAuCl}_4/\text{citrato sódico}$ . Los datos de la figura 11 se encuentran en el apartado de Anexos (Anexo I). Como se puede apreciar en la imagen 13 realizada en el microscopio electrónico, las AuNPs obtenidas presentan una forma esférica característica de los tamaños obtenidos observados con el DLS.

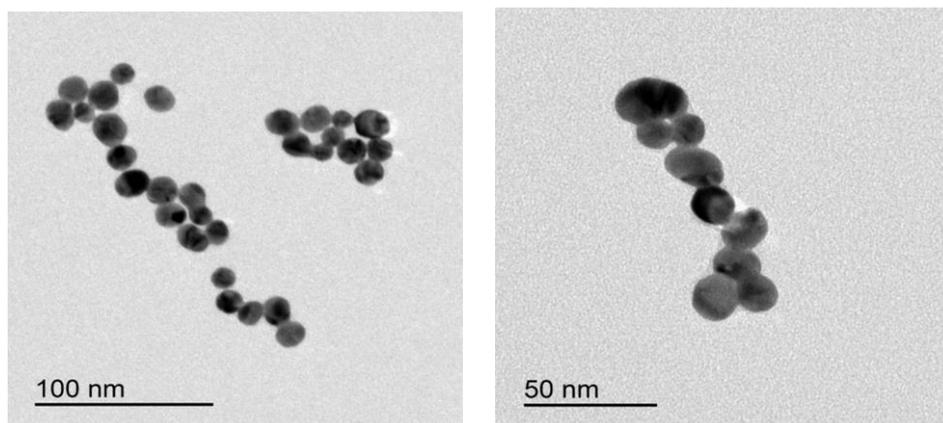
**Tabla 4.** Diámetro hidrodinámico (*d*) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs correspondientes a los espectros representados en la figura 10.

1 mM $\text{HAuCl}_4$		d
Citrato sódico (mM)	PDI	Pico 1 $\pm$ error (nm)
2	0,204	21,1 $\pm$ 5,6
3,5	0,219	28,5 $\pm$ 10,2
5	0,343	28,3 $\pm$ 11,4
6,5	0,587	36,4 $\pm$ 19,1

38,8 mM citrato sódico		d
$\text{HAuCl}_4$ (mM)	PDI	Pico 1 $\pm$ error (nm)
0,25	0,209	23,8 $\pm$ 3,8
0,5	0,140	21,0 $\pm$ 4,3
0,9	0,164	18,3 $\pm$ 2,7
1,5	0,221	22,6 $\pm$ 4,8
2	0,445	27,0 $\pm$ 10,7



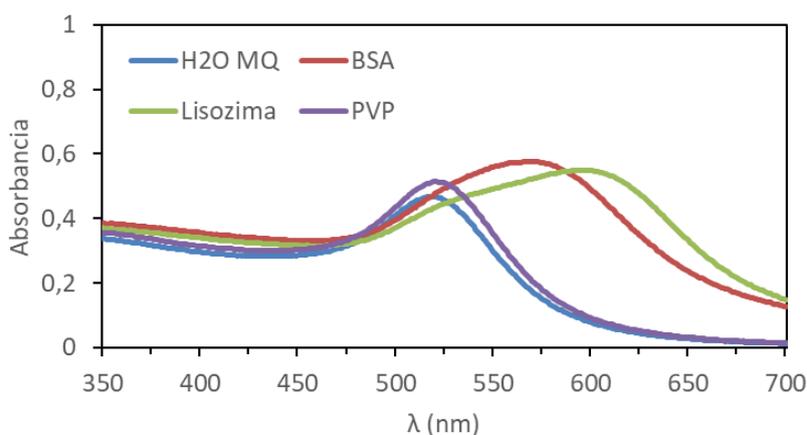
**Figura 11.** Tamaño de AuNPs frente a la relación molar  $\text{HAuCl}_4/\text{citrato sódico}$ .



**Imagen 13.** Fotografía STEM de AuNPs preparadas con 0,9 mM de  $\text{HAuCl}_4$  y 38,8 mM de citrato sódico.

### Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes.

Al igual que se hizo con las AgNPs, se estudió la estabilidad de las AuNPs en presencia de tres posibles agentes estabilizantes: el polímero PVP y las proteínas BSA y lisozima. Para este estudio se seleccionó la muestra de AuNPs preparadas a una concentración 2 mM de citrato sódico y 1 mM de  $\text{HAuCl}_4$ . Los espectros correspondientes a estos experimentos se muestran en la figura 12. Los resultados indican que tanto la adición de BSA, como de lisozima, modificaron las propiedades de las NPs (posiblemente están agregando), a diferencia del PVP, por lo que estas muestras se descartaron. Tanto la imagen 14 como los datos de la tabla 5 apoyan esta conclusión.



**Figura 12.** Espectros de absorción de las AuNPs sintetizadas a partir de 2 mM de citrato sódico y 1 mM de  $\text{HAuCl}_4$ , tras la adición de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , BSA, lisozima y PVP.

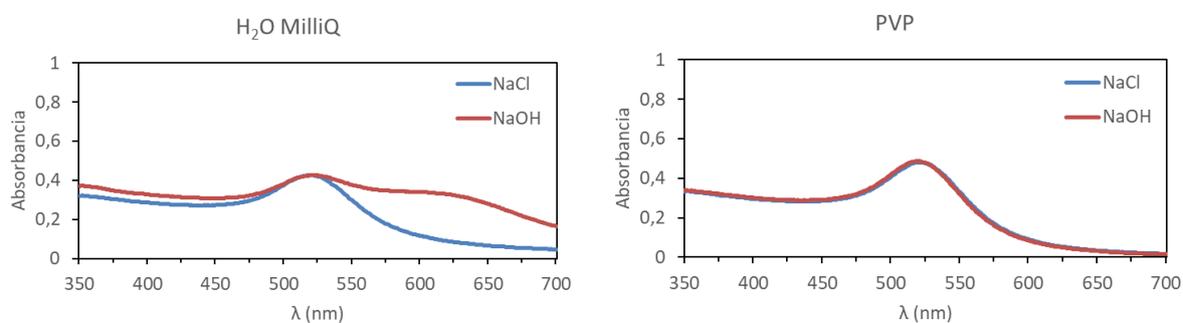


**Imagen 14.** AuNPs una vez añadidos los agentes estabilizantes.

**Tabla 5.** Diámetro hidrodinámico ( $d$ ) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs de la imagen 12.

2 mL citrato sódico		d
Reactivos	PDI	Pico 1 $\pm$ error (nm)
H <sub>2</sub> O MQ	0,215	17,3 $\pm$ 3,7
BSA	Agregan NPs	
Lisozima	Agregan NPs	
PVP	0,193	24,2 $\pm$ 6,1

Una vez descartadas las muestras con lisozima y BSA, las otras muestras se dividieron en dos cubetas a las que se añadieron 10  $\mu$ L de NaCl y NaOH, respectivamente. En la figura 13 se representan los espectros de absorción correspondientes a estas mezclas. Los resultados muestran que en ausencia de PVP la adición de NaOH provocó la agregación de las AuNPs, mientras que en su presencia estas se mantuvieron estables. A diferencia de lo observado con las AgNPs, la adición de NaCl a la concentración utilizada no desestabilizó las AuNPs, al menos a corto plazo.

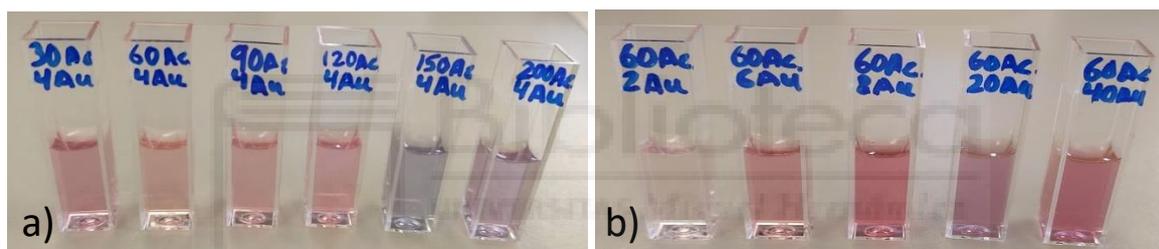


**Figura 13.** Efecto del NaCl y NaOH sobre los espectros de absorción de las AuNPs sintetizadas con citrato sódico en ausencia y en presencia de PVP.

- **Síntesis de AuNPs por el método del ácido ascórbico**

Primero se prepararon unas muestras variando la concentración del agente reductor que en este caso es el ácido ascórbico (10 mM). Esto se consiguió variando su volumen: 30, 60, 90, 120, 150 y 200  $\mu\text{L}$  y manteniendo un volumen constante de 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  50 mM completando con agua hasta un volumen final de 2 mL. La reacción se produjo al instante y las muestras adquirieron un color rojo vino claro excepto para los dos últimas que tenían un color más azulado (imagen 15a). Estos resultados nos sugieren que las AuNPs se han sintetizado, aunque son de diferente tamaño.

Después variarnos la concentración de  $\text{HAuCl}_4$  (50 mM), añadiendo volúmenes crecientes (2, 4, 6, 8, 20 y 40  $\mu\text{L}$ ), y manteniendo constante la de ácido ascórbico (10 mM). Siempre se mantuvo el mismo volumen final. Como se observa en la imagen 15b todas las muestras se pusieron de color rojo, aunque la intensidad del color varió de unas muestras a otras.

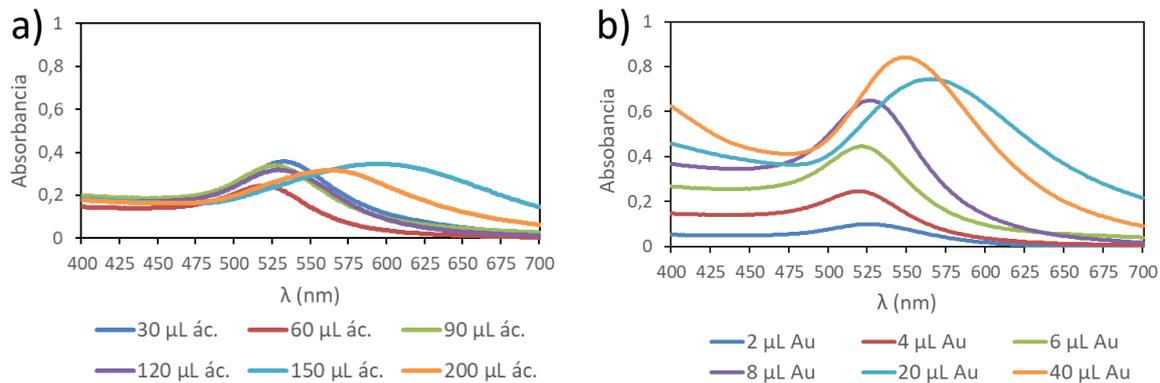


**Imagen 15.** Disoluciones obtenidas tras la síntesis de AuNPs a partir de una concentración constante de  $\text{HAuCl}_4$  (50 mM) (a) y una concentración constante de ácido ascórbico (10 mM) (b).

### **Caracterización de las NPs de oro**

Con objeto de confirmar la formación de las AuNPs por este método se recogieron los espectros de absorción de las diferentes disoluciones (figura 14). El espectro de absorción se realizó entre las longitudes de onda de 400-700 nm. En este caso las preparaciones se hicieron directamente en las propias cubetas y no hizo falta diluirlas.

De forma similar a los espectros obtenidos para las AuNPs sintetizadas por el método del citrato, los espectros recogidos muestran bandas de absorción a la longitud de onda característica de las AuNPs, por lo que se confirma su formación.



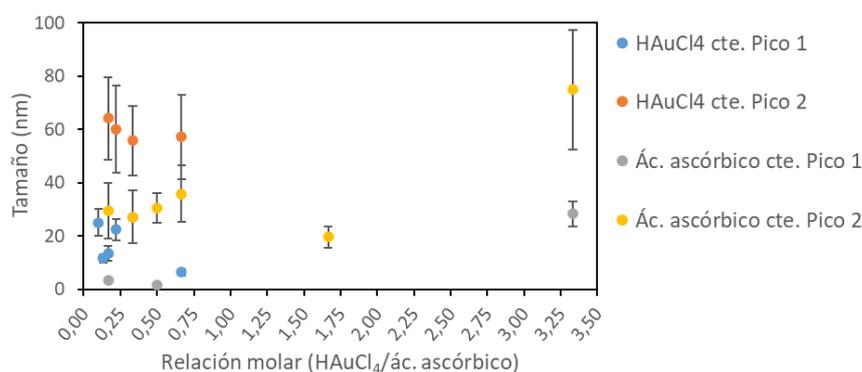
**Figura 14.** Espectros de absorción de AuNPs sintetizadas a partir de una concentración constante de HAuCl<sub>4</sub> (50 mM) variando la concentración de ác. ascórbico (a) y una concentración constante de ácido ascórbico (10 mM) variando la concentración de HAuCl<sub>4</sub> (b).

A continuación, las mismas muestras se analizaron por DLS para determinar su tamaño y heterogeneidad (tabla 6). A diferencia de los otros métodos, donde una población fue mayoritaria, aquí aparecen dos poblaciones mayoritarias con poblaciones similares. Estos resultados nos indican mucha heterogeneidad y que las NPs no son esféricas, como se puede apreciar en las fotos de microscopía electrónica mostradas en la imagen 16. Es difícil hacer una correlación debido a la dispersión de datos. Esa dispersión también se ve en la diferencia de colores que varía de tonos más rojizos a más azulados. Los datos de la tabla 6 se pueden visualizar mejor en la figura 15, en la que se representa el tamaño de las AuNPs frente a la relación molar HAuCl<sub>4</sub>/ácido ascórbico. Los datos para realizar la figura 15 se encuentran en el aparatado de Anexos (Anexo I).

**Tabla 6.** Diámetro hidrodinámico (d) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs.

50 mM HAuCl <sub>4</sub>		d			
Ác. ascórbico (mL)	PDI	Pico 1 ± error (nm)	%	Pico 2 ± error (nm)	%
0,15	0,297	6,4 ± 1,2	97,9		
0,3	0,254	27,2 ± 10,0	100,0		
0,45	0,241	22,4 ± 3,9	25,3	57,2 ± 15,8	41,6
0,6	0,230	13,4 ± 2,9	60,7	55,8 ± 13,1	39,3
0,75	0,197	11,6 ± 1,6	31,3	60,1 ± 16,4	68,7
1	0,238	25,1 ± 5,0	28,6	64,2 ± 15,5	41,2

10 mM ác. ascórbico		d			
H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (mM)	PDI	Pico 1 ± error (nm)	%	Pico 2 ± error (nm)	%
0,05	0,332	3,2 ± 0,7	32,9	29,4 ± 10,4	67,1
0,1	0,254	27,2 ± 10,0	100,0		
0,15	0,306	1,5 ± 0,2	66,6	30,4 ± 5,6	33,3
0,2	0,234	35,9 ± 10,6	100,0		
0,5	0,223	19,6 ± 4,1	87,7		
1	0,186	28,3 ± 4,7	27	75,0 ± 22,4	73,0



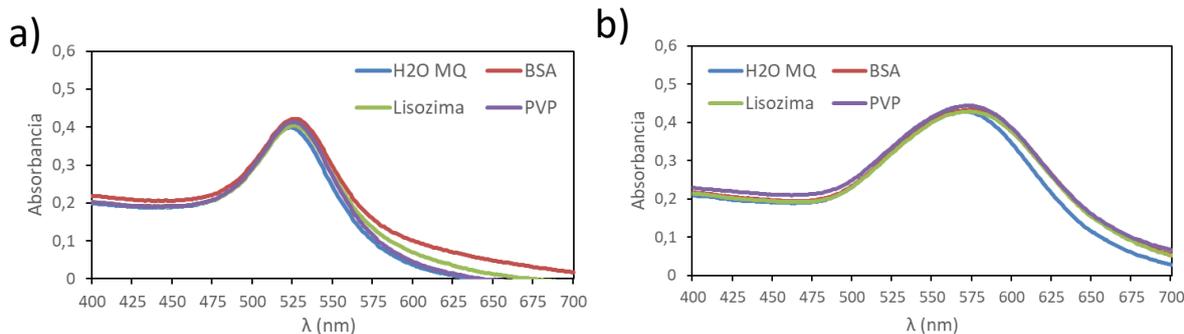
**Figura 15.** Tamaño de AuNPs frente a la relación molar H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/ácido ascórbico.



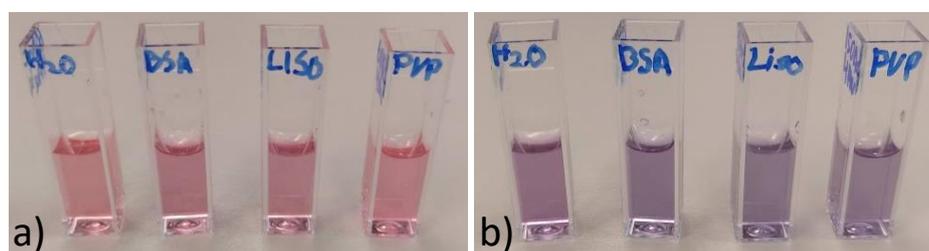
**Imagen 16.** Fotografía STEM de AuNPs preparadas con 0,75 mM de ác. ascórbico y 50 mM de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>.

### Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizadores

Para llevar a cabo los estudios de estabilidad y, debido a la dispersión de las muestras, en este caso se eligieron, a diferencia de los anteriores, dos preparaciones, correspondientes a 0,3 mM y 0,75 mM de ác. ascórbico a una concentración de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> de 50 mM. En la figura 16 se observa que estas NPs soportaron tanto la BSA como la lisozima y el PVP. El desplazamiento de los espectros en la figura 16b respecto de la figura 16a también se ve apoyado por la diferencia de color y de tamaño que presentan las muestras de 0,3 mM y 0,75 mM como se aprecia en la imagen 17 y en la tabla 7 respectivamente.



**Figura 16.** Espectros de Absorción de las AuNPs preparadas a partir de 0,3 mM (a) y 0,75 mM (b) de ác. ascórbico y 50 mM de  $\text{HAuCl}_4$ , tras la adición de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , BSA, lisozima y PVP.



**Imagen 17.** AuNPs una vez añadidos los agentes estabilizantes, siendo a) 0,3 mM y b) 0,75 mM de ác. ascórbico y 50 mM de  $\text{HAuCl}_4$ .

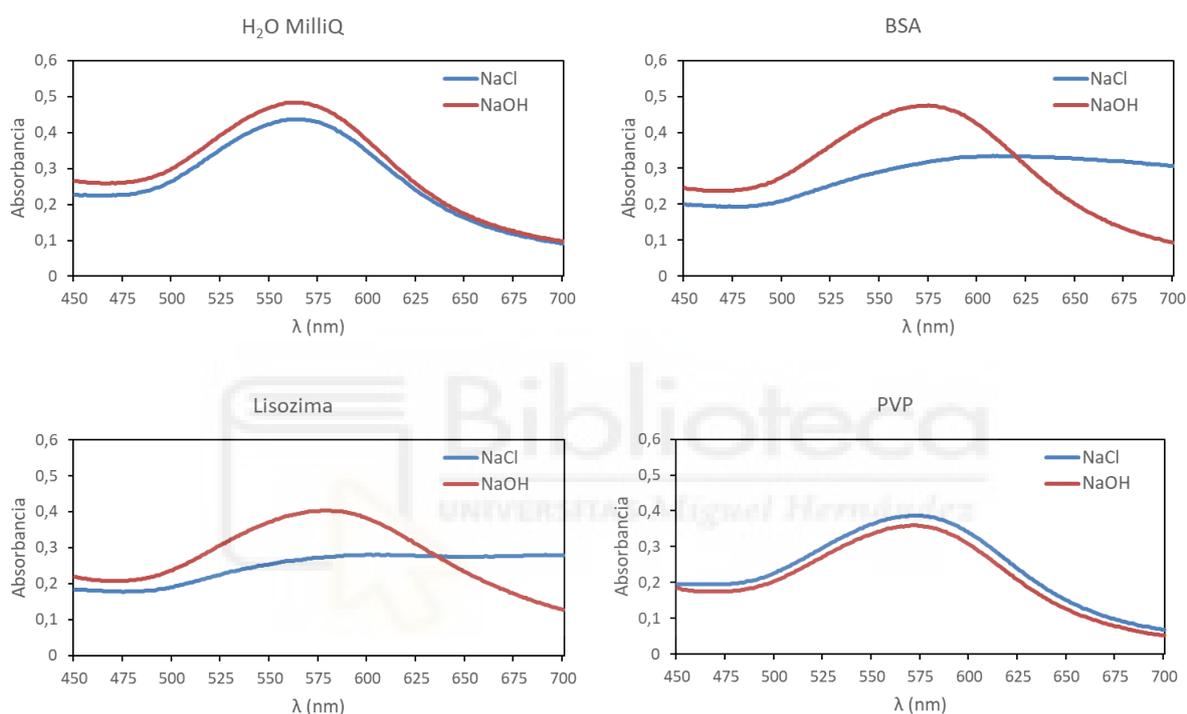
**Tabla 7.** Diámetro hidrodinámico (d) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs preparadas con ácido ascórbico.

0,3 mM ác. ascórbico	50 mM $\text{HAuCl}_4$	d					
		Reactivos	PDI	Pico 1 $\pm$ error (nm)	%	Pico 2 $\pm$ error (nm)	%
H <sub>2</sub> O MQ	0,258			4,3 $\pm$ 0,5	65,4	36,5 $\pm$ 9,9	34,4
BSA	0,301			8,9 $\pm$ 1,8	96		
Lisozima	0,311			5,0 $\pm$ 0,7	64,4	22,7 $\pm$ 13,7	35,6
PVP	0,227			7,6 $\pm$ 1,1	63,4	45,9 $\pm$ 13,6	36,6

0,75 mM ác. ascórbico	50 mM $\text{HAuCl}_4$	d					
		Reactivos	PDI	Pico 1 $\pm$ error (nm)	%	Pico 2 $\pm$ error (nm)	%
H <sub>2</sub> O MQ	0,206			26,7 $\pm$ 5,4	27,6	65,0 $\pm$ 17,6	72,4
BSA	0,193			14,0 $\pm$ 2,3	27,8	67,5 $\pm$ 17,0	72,2
Lisozima	0,217			14,1 $\pm$ 2,3	29,7	59,1 $\pm$ 20,0	56,4
PVP	0,167			76,4 $\pm$ 18,2	100		

Posteriormente, la muestra correspondiente a 0,75 mM de ác. ascórbico, se dividió con los agentes estabilizadores en dos cubetas y se les añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NaCl y NaOH,

respectivamente. En la figura 17 se representan los espectros de absorción correspondientes a estas mezclas. Los resultados muestran que en ausencia de BSA, lisozima y PVP, la adición de NaCl y NaOH no provocó la desaparición de las AuNPs, lo que demuestra la estabilidad de las AuNPs sintetizadas con ác. ascórbico, al menos a corto plazo. En presencia de BSA y lisozima las NPs se mantuvieron estables tras la adición de NaOH, mientras que tras la adición de NaCl agregaron y precipitaron. Y en presencia de PVP las NPs se mantuvieron estables tras la adición de NaCl y NaOH, lo que demuestra la acción estabilizante del agente PVP.



**Figura 17.** Efecto del NaCl y NaOH sobre los espectros de absorción de las AuNPs, sintetizadas con ác. ascórbico, en ausencia y en presencia de BSA, lisozima y PVP.

## 4.2 Métodos verdes

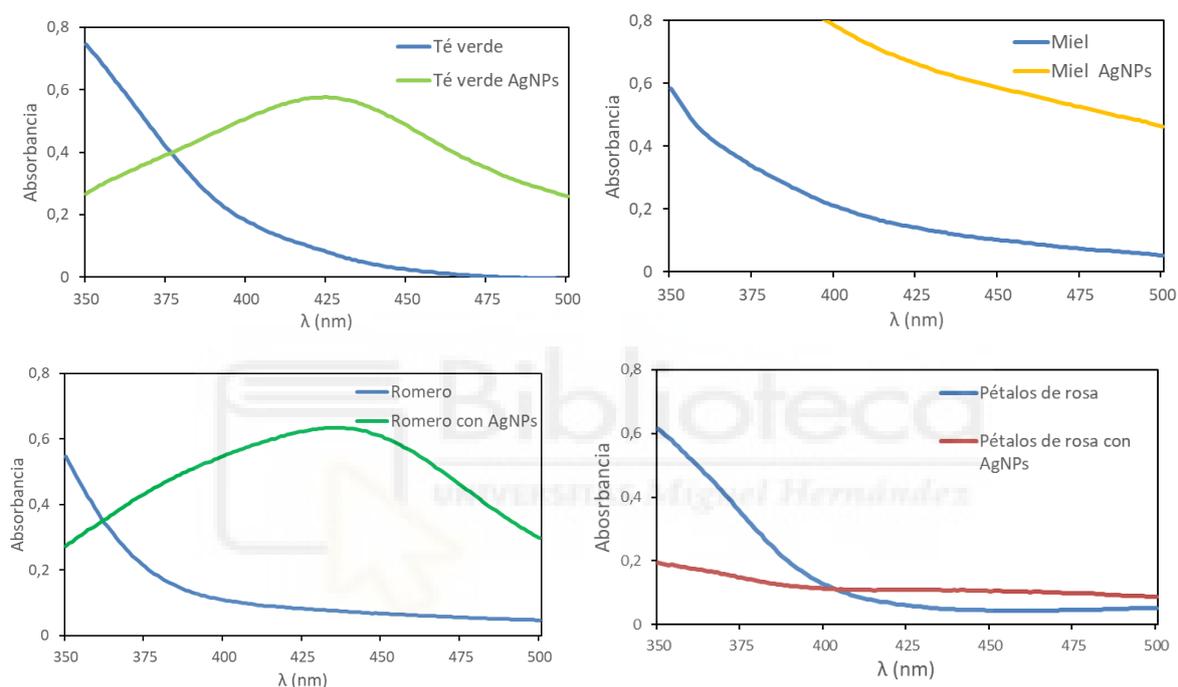
Caracterización de las AgNPs y AuNPs sintetizadas utilizando extractos naturales como agente reductor.

### ⇒ Extractos naturales con nanopartículas de plata

Para los extractos naturales: té verde, romero, miel y pétalos de rosa, se describió en la sección 3.3 de Materiales y Métodos el proceso de preparación de las NPs. Y con objeto de confirmar la formación de las AuNPs, en primer lugar, se recogieron los espectros de absorción de los diferentes extractos. Además, para determinar su tamaño y heterogeneidad, las mismas

muestras se analizaron por DLS. El espectro de absorción se realizó entre las longitudes de onda de 350-500 nm.

En la figura 18 se representan, por un lado, los espectros obtenidos tras el protocolo de preparación de las AgNPs y por otro, los espectros correspondientes a los extractos naturales (en ausencia de  $\text{AgNO}_3$ ) para confirmar que estos no absorbían en la zona de las AgNPs. Los resultados muestran que, en los casos que se han formado AgNPs, estos espectros muestran bandas de absorción a longitudes de onda mayores y desplazadas respecto a las observadas con los métodos tradicionales.



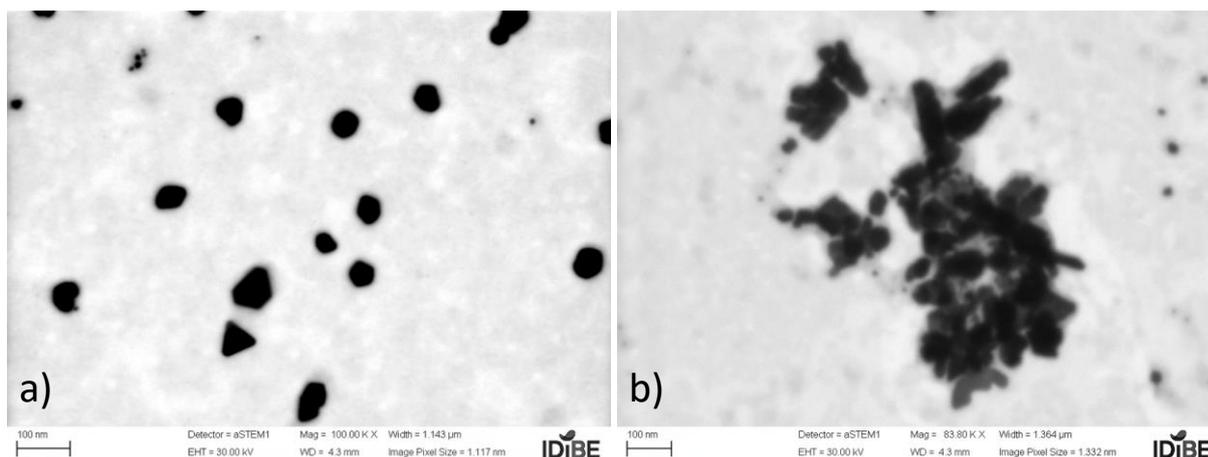
**Figura 18.** Espectros de absorción de las AgNPs, sintetizadas con extractos naturales, junto con el espectro del extracto de partida.

Se puede concluir que se han formado las NPs de plata con el té verde, romero y pétalos de rosa, teniendo una polidispersidad alta, como se puede apreciar en la tabla 8. Se descarta la miel como agente reductor, ya que no se observa el espectro característico de las AgNPs.

A continuación, las mismas muestras se analizaron por DLS para determinar su tamaño y polidispersidad (tabla 8). Estos resultados nos indican mucha polidispersidad como se puede apreciar en la imagen 18 de microscopía electrónica, donde se observan estructuras diferentes a las esféricas. Esa dispersión también se ve en la diferencia de colores que varía de tonos amarillos a marrón oscuro (ver sección 3.3 en el apartado Materiales y Métodos).

**Tabla 8.** Diámetro hidrodinámico (*d*) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AgNPs obtenidas a partir de extractos naturales.

AgNPs	PDI	d			
		Pico 1 ± error (nm)	%	Pico 2 ± error (nm)	%
Té verde	0,431	11,5 ± 3,7	97,6		
Romero	0,342	10,9 ± 1,9	33	26,3 ± 17,5	67
Pétalos de rosa	0,242	27,9 ± 4,1	15,9	74,5 ± 13,2	84,1

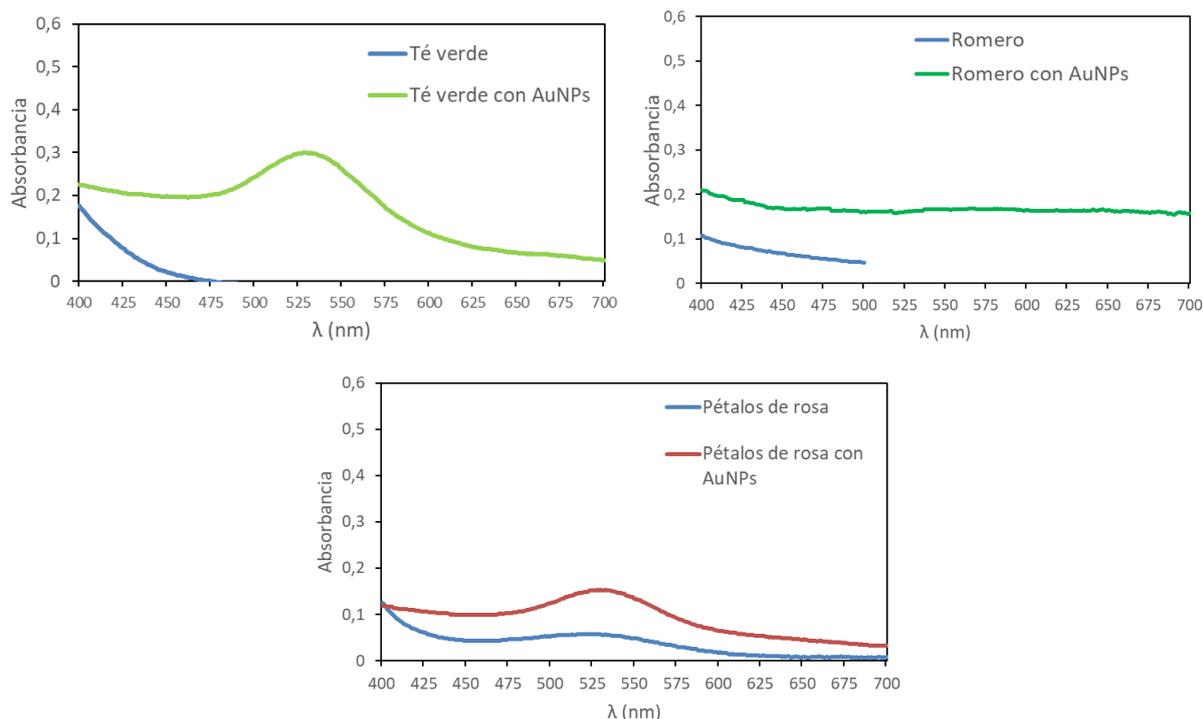


**Imagen 18.** Fotografía STEM de AgNPs reducidas con romero (a) y pétalos de rosa (b).

### ⇒ Extractos naturales con nanopartículas de oro

Al igual que se sintetizaron las AgNPs utilizando los extractos naturales como agentes reductores, se describió en la sección 3.3 de Materiales y Métodos el proceso de preparación de las AuNPs y se realizaron los mismos experimentos. Y con objeto de confirmar la formación de las AuNPs, en primer lugar, se recogieron los espectros de absorción de los diferentes extractos. Además, para determinar su tamaño y heterogeneidad, las mismas muestras se analizaron por DLS. El espectro de absorción se realizó entre las longitudes de onda de 400-700 nm.

En la figura 19 se representan los espectros de absorción de las AuNPs junto a los espectros de los diferentes extractos naturales. En los casos que se han formado AuNPs, que son para el té verde y los pétalos de rosa, estos espectros muestran bandas de absorción en las longitudes de onda que le corresponde a las AuNPs. Por tanto, a primera vista se puede determinar que con los métodos verdes se obtienen AuNPs y son métodos que dan una precisión parecida a los métodos convencionales estandarizados.



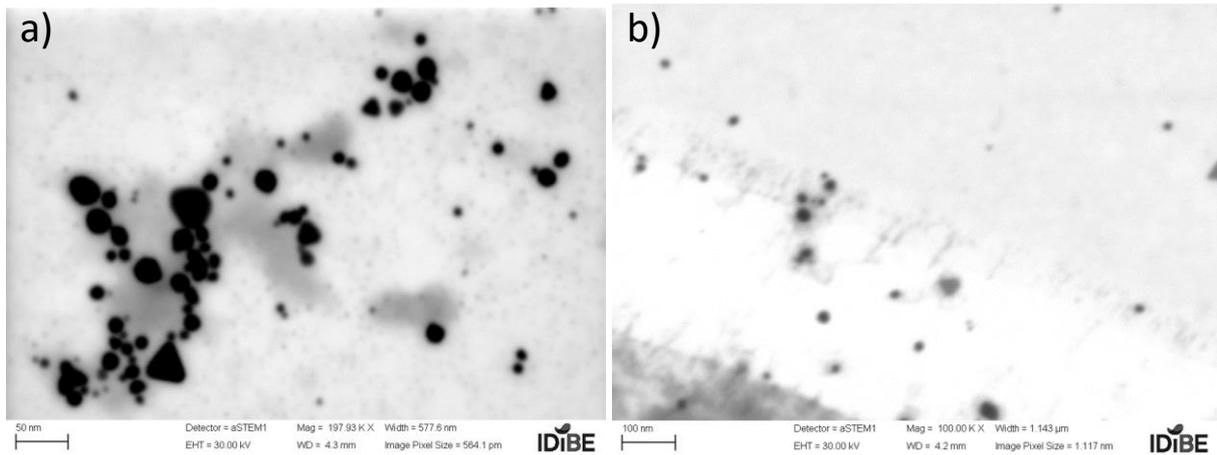
**Figura 19.** Espectros de absorción de AuNPs, sintetizadas con extractos naturales, junto con el espectro del extracto de partida. Se descarto la miel, puesto que se vio que no se formaban NPs y no se sintetizaron con oro.

Se puede concluir que se han formado NPs de oro con el té verde y pétalos de rosa, teniendo una polidispersidad alta, como se puede apreciar en la tabla 9. Se descarta el romero como agente reductor, ya que no se observa el espectro característico de las AuNPs (figura 19). La miel se descartó como agente reductor para la síntesis de AuNPs tras los resultados obtenidos con las AgNPs.

A continuación, las mismas muestras se analizaron por DLS para determinar su tamaño y polidispersidad (tabla 9). Estos resultados nos indican mucha polidispersidad como se puede apreciar en la imagen 19 de microscopia electrónica, donde se observan estructuras diferentes a las esféricas. Los colores se mantienen en un rojo vino intenso (ver sección 3.3 en el apartado Materiales y Métodos).

**Tabla 9.** Diámetro hidrodinámico (*d*) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs obtenidas a partir de extractos naturales.

AuNPs	PDI	d			
		Pico 1 ± error (nm)	%	Pico 2 ± error (nm)	%
Té verde	0,46	1,3 ± 0,2	60,8	2,2 ± 0,4	39,1
Pétalos de rosa	0,602	1,6 ± 0,3	61,7		



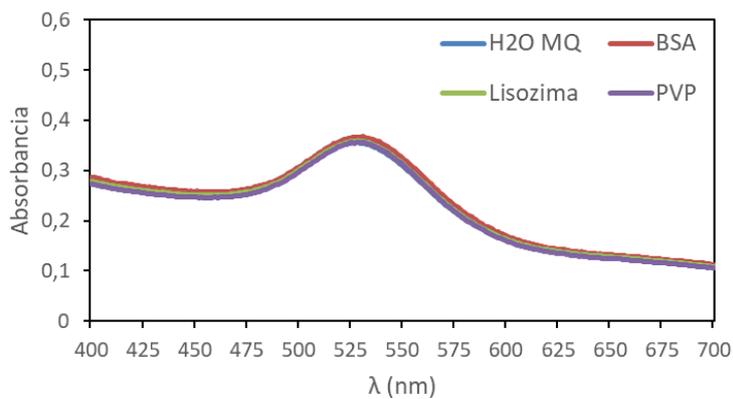
**Imagen 19.** Fotografía STEM de AuNPs reducidas con té verde (a) y pétalos de rosa (b).

Se ha elegido el té verde para realizar los efectos de agregación y precipitación descritos en el apartado 3.3.

❖ **Té verde**

**Efecto de agregación y precipitación tras la adición de diferentes agentes estabilizantes.**

Al igual que se hizo con los métodos tradicionales, se estudió la estabilidad de las AuNPs en presencia de tres posibles agentes estabilizantes: el polímero PVP y las proteínas BSA y lisozima. Para este estudio se seleccionó la muestra de AuNPs preparadas con té verde. Los espectros correspondientes a estos experimentos se muestran en la figura 20. Los resultados indican que tanto la adición de BSA como de lisozima y de PVP no modificaron las propiedades de las NPs y soportaron la adición. Los datos de la tabla 10 apoyan esta conclusión.

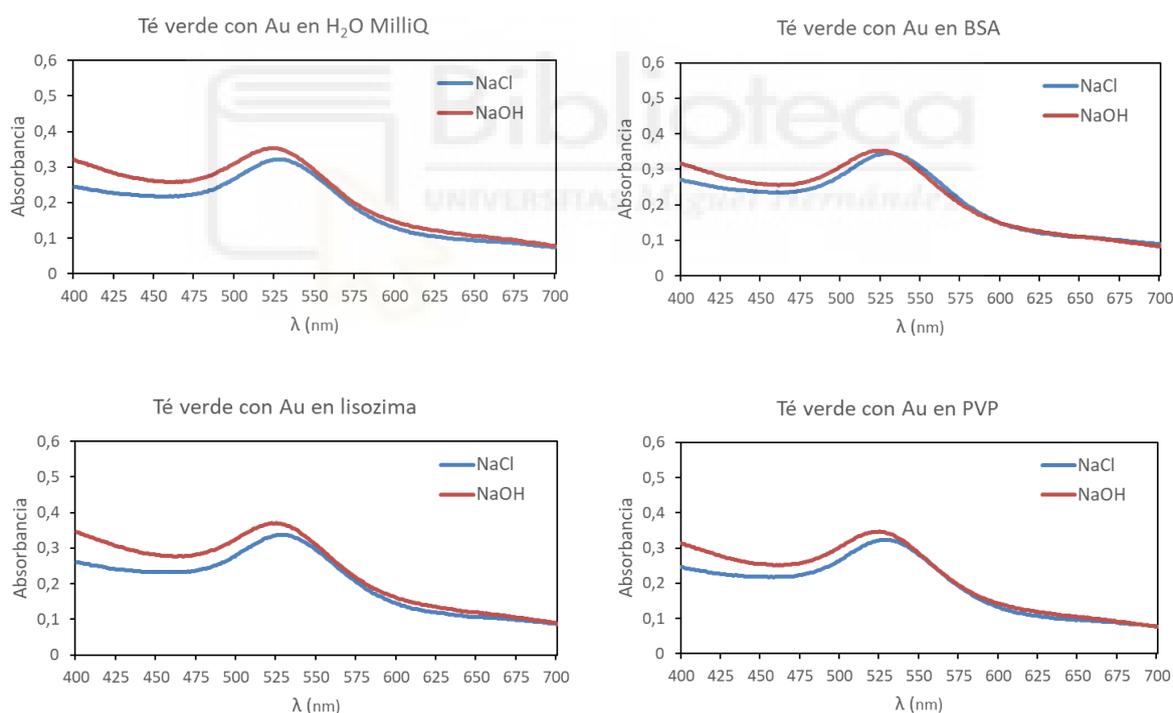


**Figura 20.** Espectros de Absorción de las AuNPs sintetizadas a partir de té verde, tras la adición de 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, BSA, lisozima y PVP.

**Tabla 10.** Diámetro hidrodinámico (*d*) y PDI, obtenidos mediante DLS, de las suspensiones de AuNPs con té verde.

Té verde ORO		d			
Reactivos	PDI	Pico 1 ± error (nm)	%	Pico 2 ± error (nm)	%
H <sub>2</sub> O MQ	0,467	1,0 ± 0,1	31,8	2,0 ± 0,3	68
BSA	0,484	2,8 ± 0,4	30,4		
Lisozima	0,526	1,6 ± 0,2	40,6		
PVP	0,489	1,1 ± 0,2	98,3		

Posteriormente se dividieron las muestras con los agentes estabilizadores en dos cubetas y se les añadieron 10 µL de NaCl y NaOH, respectivamente. En la figura 21 se representan los espectros de absorción correspondientes a estas mezclas. Los resultados muestran que en todos los casos las AuNPs se mantuvieron estables tras la adición de NaCl y NaOH, lo que demuestra la estabilidad de las AuNPs sintetizadas con té verde.



**Figura 21.** Efecto del NaCl y NaOH sobre los espectros de absorción de las AuNPs, sintetizadas con té verde, en ausencia y en presencia de BSA, lisozima y PVP.

## 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

1. Se han podido sintetizar AgNPs y AuNPs mediante métodos convencionales y se ha observado como la relación entre las concentraciones de partida del precursor metálico y agente reductor influyen en el tamaño y polidispersión de la NPs formadas, sobre todo en el caso de las AgNPs y de las AuNPs sintetizadas con ácido ascórbico. Los colores de las disoluciones confirman rápidamente la formación de estas NPs.
2. Las AgNPs sintetizadas mediante los métodos convencionales tienen, en general, tamaños más pequeños (entre 5-10 nm) que las AuNPs preparadas por esos mismos métodos (~20 nm). Cuando el agente reductor es el ácido ascórbico, las AuNPs obtenidas son muy heterogéneas, variando tanto en tamaño como en forma.
3. Las AgNPs son inestables frente a condiciones adversas (pH y fuerza iónica), pero su estabilidad aumenta tras la adición de BSA y/o PVP. Para las AuNPs, también es necesario la adición de PVP para aumentar su estabilidad cuando se sintetizan con citrato, mientras que la utilización de ácido ascórbico confiere mucha más estabilidad a las mismas. El agente estabilizante PVP se demuestra como un gran estabilizador de NPs, ya que en todos los métodos usados ha conseguido estabilizarlas.
4. En cuanto a la síntesis con métodos verdes, los resultados muestran que los extractos naturales como el té verde, romero y pétalos de rosa han servido para formar AgNPs, dando tamaños parecidos a los métodos convencionales, pero mostrando una diversidad de formas diferentes a las esféricas. La miel, sin embargo, no fue capaz de formar AgNPs bajo las condiciones seleccionadas.
5. En cuanto a las AuNPs, los extractos naturales que han sido efectivos son el té verde y los pétalos de rosa, descartándose el resto. Los tamaños obtenidos han sido menores a los observados en los métodos convencionales, obteniéndose AuNPs de ~1-2 nm.

Para concluir, como línea de trabajo futura, se debería de explorar más en profundidad los protocolos de los métodos verdes que se han desarrollado e intentar determinar que compuesto o compuestos, dentro de cada extracto natural, son los responsables de la síntesis de las NPs, con objeto de determinar su estabilidad en el tiempo y estudiar la capacidad de replicación de los procesos para realizarlo a gran escala, para que sea fiable para usos

industriales o técnicos. Además, se deberían optimizar los métodos hasta obtener NPs que fueran homogéneas en forma y tamaño.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- BSI, *British Standards Institution* (2005). Vocabulary – Nanoparticles, Publicly Available Specification, PAS 71:2005. BSI. London.
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Falke, S., & Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). In *Radiation in Bioanalysis* (pp. 173-193). Springer, Cham.
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M., & Higgitt, C. (2007). The Lycurgus cup—a roman nanotechnology. *Gold bulletin*, 40(4), 270-277.
- Friederici Muñoz, M. G. (2013). Nanopartículas de Au y Pd: síntesis, funcionalización y aplicaciones catalíticas (Tesis doctoral, *Universitat de Barcelona*).
- Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2).
- Lee, K. X., Shamel, K., Yew, Y. P., Teow, S. Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 15, 275.
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1 (20)),35-44.
- Mayya, K. S., Patil, V., & Sastry, M. (1997). On the stability of carboxylic acid derivatized gold colloidal particles: the role of colloidal solution pH studied by optical absorption spectroscopy. *Langmuir*, 13(15), 3944-3947.
- Merali, Z. (2013). This 1,600-Year-Old Goblet Shows that the Romans Were Nanotechnology Pioneers. *Smithsonian Magazine*.

Oroz, M. M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 33-41). Real Sociedad Española de Química.

TRS, The Royal Society (2004). *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. ISBN 0 85403 604 0

Yaya, A., Agyei-Tuffour, B., Dadoo-Arhin, D., Nyankson, E., Annan, E., Konadu, D. S., ... & Ewels, C. P. (2012). Layered nanomaterials-a review. *Global Journal of Engineering design and technology*, 2, 32-41.

Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R., & Beattie, D. A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. *Journal of colloid and interface science*, 331(2), 251-262.

## 6.1 Recursos de internet consultados

Microscopía. Universidad de Almería. Servicios centrales de investigación. (consultado 10/05/2021). Disponible en internet: <https://www.ual.es/universidad/serviciosgenerales/stecnicos/microscopia/microscopia-electronica-de-barrido>

Shimadzu. UV-Vis Spectrophotometer UV-2600/2700. (consultado 10/05/2021). Disponible en internet: <https://www.shimadzu.com/an/products/molecular-spectroscopy/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/uv-2600i-uv-2700i/index.html>

## ANEXOS

### Anexo I

**Tabla 1.** Datos utilizados para realizar las gráficas del tamaño de las NPs frente a la relación molar y con las barras de error.

<b>AgNPs</b>	Relación molar	Pico 1 ± error (nm)	<b>AuNPs citrato sódico</b>	Relación molar	Pico 1 ± error (nm)
20 mL NaBH <sub>4</sub>	0,025	10,2 ± 2,1	20 mL HAuCl <sub>4</sub>	0,45	21,1 ± 5,6
	0,125	4,4 ± 2,6		0,26	28,5 ± 10,2
	0,25	1,6 ± 0,5		0,18	28,3 ± 11,4
	0,375	1,6 ± 0,7		0,14	36,4 ± 19,1
	0,5	4,7 ± 1,4			
15 mL NaBH <sub>4</sub>	0,033	7,4 ± 1,6	2 mL citrato sódico	0,01	23,8 ± 3,8
	0,333	5 ± 3,3		0,03	21 ± 4,3
	0,5	1,8 ± 0,5		0,05	18,3 ± 2,7
	0,667	1,9 ± 0,6		0,09	22,6 ± 4,8
				0,11	27 ± 10,7

<b>AuNPs ác. ascórbico</b>	Relación molar	Pico 1 ± error (nm)	Pico 2 ± error (nm)
4 μL HAuCl <sub>4</sub>	0,67	6,4 ± 1,2	
	0,33	27,2 ± 10	
	0,22	22,4 ± 3,9	57,2 ± 15,8
	0,17	13,4 ± 2,9	55,8 ± 13,1
	0,13	11,6 ± 1,6	60,1 ± 16,4
	0,10	25,1 ± 5	64,2 ± 15,5
60 μL ác. ascórbico	0,17	3,2 ± 0,7	29,4 ± 10,4
	0,33		27,2 ± 10
	0,50	1,5 ± 0,2	30,4 ± 5,6
	0,67		35,9 ± 10,6
	1,67		19,6 ± 4,1
	3,33	28,3 ± 4,7	75 ± 22,4