

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

“Obtención de nanosistemas biogénicos para
aplicaciones en SERS”

Para obtener el título de:
Licenciado en Biotecnología

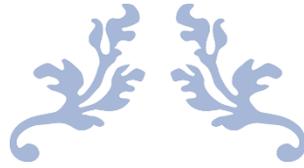
PRESENTA

Rodolfo Daniel Ávila Avilés

ASESOR

Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor

SEPTIEMBRE 2018



RESUMEN



La nanotecnología como campo de amplia relevancia en la actualidad ha centrado sus esfuerzos en la obtención controlada de nanosistemas de diferente forma, tamaño, dispersión y composición química, así como sus diferentes aplicaciones; por su parte el campo de la nanobiotecnología investiga el uso de un material biológico para fabricar nanosistemas, lo cual puede mejorar la biocompatibilidad del nanomaterial, generando sistemas de amplia dispersidad en el tamaño y la morfología.

Para tal motivo en el presente trabajo de investigación se muestra la síntesis y caracterización de tres distintos nanosistemas, a saber: la obtención de nanopartículas de plata y oro utilizando extracto de *Anemopsis californica* (*A. californica*) como agente reductor y estabilizador; la generación de nanocompositos de oxido de grafeno biosintetizado funcionalizado con nanopartículas de plata y oro; y la obtención de nano/microestructuras híbridas de nanopartículas de plata y oro utilizando como templete granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis*. Adjunto a la síntesis y caracterización de los nanosistemas mencionados, se realizó su evaluación como sustratos para efecto en la dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS), ocupando azul de metileno como molécula señal.

En este tenor fueron obtenidas nanopartículas de oro y plata con extracto de *A. californica*, utilizando diferentes solventes en la preparación del extracto (agua, metanol e isopropanol), lo cual muestra diferencias significativas en morfología dependiendo del tipo de metal de las nanopartículas y dependiente del tipo de solvente utilizado, así mismo considerando únicamente nanopartículas

poliédricas, para realizar una comparación en tamaño, se encontraron diferencias significativas dependientes del tipo de solvente ocupado para la preparación del extracto.

En el segundo sistema evaluado, se reporta la síntesis de óxido de grafeno mediante exfoliación de grafito en un sistema acuoso/surfactante auspiciado por extracto de *A. californica*, lo que añade grupos funcionales a la superficie del material 2D, induciendo la posibilidad de funcionalización. Tal material fue funcionalizado mediante la biosíntesis de nanopartículas de plata y oro, las cuales se adhirieron a la superficie del material, generando de esta manera compositos AgNPs/OG y AuNPs/OG.

El tercer nanosistema evalúa la obtención de nano/microestructuras híbridas, en las cuales es utilizado granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* como agente reductor y estabilizador en la síntesis de nanopartículas de plata y oro, funcionando al mismo tiempo como biotemplate para la adhesión de estas, generando así las nano/microestructuras híbridas AgNPs/GP y AuNPs/GP.

Por último se reporta la evaluación de todos los sistemas antes mencionados como sustratos para la aplicación en SERS, ocupando azul de metileno como molécula señal. Del mismo modo todos los sistemas exhibieron tal propiedad de aplicación de la señal Raman, con especial predilección las nanoestructuras de plata, debido a la morfología anisotrópica predominante; los nanocompositos AuNPs/OG asociado a la conglomeración de las partículas y a las propiedades del template, y las nano/microestructuras AgNPs/GP debido a la aglomeración de las partículas y a la morfología del template.



ABSTRACT



Nanotechnology as a field of great relevance at present has focused its efforts in the controlled obtaining of nanosystems of different shape, size, dispersion and chemical composition, as well as its different applications; Furthermore, the field of nanobiotechnology investigates the use of a biological material to manufacture nanosystems, which can improve the biocompatibility of the nanomaterial, which generates widely dispersed systems in size and morphology.

For this reason, in the present research, the synthesis and characterization of three different nanosystems are presented: obtaining of silver and gold nanoparticles using *Anemopsis californica* extract as a reducing and stabilizing agent; generation of nanocomposites of biosynthesized graphene oxide functionalized with silver and gold nanoparticles; and obtaining of hybrid nano/microstructures of silver and gold nanoparticles using pollen grains of *Dimorphotheca ecklonis* as a template. In addition to the synthesis and characterization of the nanosystems, its evaluation was carried out as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) effect, occupying methylene blue as the signal molecule.

Gold and silver nanoparticles with *A. californica* extract were obtained, using different solvents in the preparation of the extract (water, methanol and isopropanol), which shows significant differences in morphology depending on the type of metal of the nanoparticles and dependent of the kind of solvent used, likewise considering only hemispheric nanoparticles, significant differences were found depending on the solvent occupied for the preparation of the extract.

The second system, graphene oxide synthesis is obtained by graphite exfoliation in an aqueous/surfactant system supported by *A. californica* extract, which adds functional groups to the 2D material surface, inducing the possibility of functionalization. Such material was functionalized by the biosynthesis of silver and gold nanoparticles, which adhered to the surface of the material, thus generating AgNPs/GO and AuNPs/GO nanocomposites.

The third nanosystem evaluates the obtaining of hybrid nano/microstructures, in which pollen grains of *Dimorphotheca ecklonis* are used as a reducing and stabilizing agent in the synthesis of silver and gold nanoparticles, working at the same time as a biteplate for the adhesion of these, thus generating the hybrid nano/microstructures AgNPs/PG and AuNPs/PG.

Finally, we report the evaluation of all the systems as substrates for the application in SERS, occupying methylene blue as a signal molecule. In the same way all the systems exhibited such property of application of the Raman signal, with special preference silver nanostructures, due to the predominant anisotropic morphology; the AuNPs/OG nanocomposites associated with the conglomeration of the particles and the properties of the template, and the nano/microstructures AgNPs/GP due to the agglomeration of the particles and the morphology of the template.

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres, hermanas, cuñado y sobrinos.

A mi compañera de camino.



AGRADECIMEINTOS



Este proyecto de investigación fue posible gracias al financiamiento otorgado por el proyecto CONACYT No. 280518 y al financiamiento UAEM No. 4523/2018/CI, y a las instalaciones y equipamiento facilitados por el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM.

En primer lugar, agradezco al Dr. Alfredo Rafael Vilchis Nestor por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por su apoyo incondicional para llevar acabo el proyecto, por los consejos y la guía en el camino, además por siempre alentarme a dar lo mejor de mí y por aceptar y apoyar mis ideas y proyectos. Gracias por su ayuda, sus consejos, sus enseñanzas y su confianza.

Agradezco también al Dr. Marco Antonio Camacho López y a Emanuel Velarde Granados del LIDMA por su apoyo y facilidades para la obtención análisis por espectroscopía Raman.

Agradezco al Dr. Ignacio Guadalupe Becerril Juárez del IPICyT por su apoyo y colaboración para la obtención de los análisis Raman que tanto trabajo costaron.

Agradezco al Dr. Alejandro Dorazco González del CCIQS, por las facilidades otorgadas para la realización de los análisis por espectroscopía UV-vis.

Agradezco al Dr. Gustavo López Téllez del CCIQS, por todo su apoyo en la realización de los análisis por XPS.

Agradezco a la Mtra. Melina Tapia Tapia, por su apoyo y facilidades para la realización de los análisis de fluorescencia por microscopía confocal.

Agradezco a Nayely Torres Gómez, a Jossue Jared Barrera Torres y a Gabriela Rodríguez de la Concha Azcarate, por ser más que compañeros de laboratorio, mis amigos y acompañantes en esta aventura, sin ustedes esto no sería lo mismo.

Agradezco por último y no menos importante a mis padres Rodolfo Ávila Bonilla y Carolina Avilés Ramon por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, por su amor, comprensión, ejemplo, esfuerzo y entrega.



ÍNDICE



Resumen	I
Abstract	III
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Índice de abreviaturas	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tablas	XVII
Introducción	1
1. Capítulo uno: Antecedentes.....	3
1.1 Nanomateriales.....	3
1.2 Síntesis de nanomateriales.....	6
1.2.1 Biosíntesis utilizando extractos de plantas.....	7
1.2.1.1 <i>Anemopsis Californica</i> como agente reductor y estabilizador.....	9
1.2.2 Granos de polen como agente reductor, estabilizador y biotemplate.....	11

1.2.3 Oxido de Grafeno como nanomaterial y templete.....	12
1.3 Nanopartículas de Plata y Oro.....	14
1.4 Efecto SERS	18
2. Capítulo dos.....	22
2.1 Justificación.....	22
2.2 Hipótesis	23
2.3 Objetivo general.....	23
2.4 Objetivos específicos.....	24
3. Capítulo tres: Métodos de caracterización.....	25
3.1 Espectroscopía UV-Visible.....	25
3.2 Microscopía Electrónica.....	28
3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	30
3.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	31
3.5 Microanálisis por Dispersión de Energía (EDS).....	33
3.6 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	34
3.7 Espectroscopía Raman.....	35
4. Capítulo cuatro: Materiales y Métodos.....	38
4.1 Materiales.....	38
4.2 Preparación de Extractos de <i>A. californica</i>	38
4.3 Síntesis de nanopartículas de plata y oro.....	39

4.4 Síntesis de Oxido de Grafeno.....	39
4.5 Síntesis de nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG.....	39
4.6 Síntesis de nano/microestructuras híbridas de AgNPs/GP y AuNPs/GP.....	40
4.7 Análisis mediante espectroscopía UV-visible.....	40
4.8 Microscopía electrónica de Barrido y análisis EDS acoplado.....	40
4.9 Microscopía electrónica de Transmisión.....	41
4.10 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	41
4.11 Análisis de Fluorescencia mediante microscopía confocal.....	42
4.12 Preparación de sustratos SERS para mediciones SERS.....	42
4.13 Análisis estadísticos.....	43
5. Capítulo cinco: Resultados y Discusión.....	44
5.1 Síntesis, caracterización y evaluación de propiedades SERS de nanopartículas biogénicas de plata y oro.....	44
5.2 Síntesis y caracterización y evaluación de propiedades SERS de Óxido de grafeno y nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG.....	53
5.3 Síntesis, caracterización y determinación de propiedades SERS de nano/microestructuras híbridas AgNPs/PG y AuNPs/PG.....	63
5.4 Integración de Propiedades SERS.....	69
Conclusiones.....	72
Referencias Bibliográficas.....	75



Índice de Abreviaturas



°C	Grados centígrados
µm	Micrómetros
0D	Cero dimensiones
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
Å	Angstroms
abs	Absorción
Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
AgNPs/GP	Nanopartículas de plata en granos de polen
AgNPs/OG	Nanopartículas de plata en oxido de grafeno
APTES	Aminopropil trimetoxissilano
Au	Oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs/GP	Nanopartículas de oro en granos de polen
AuNPs/OG	Nanopartículas de oro en oxido de grafeno
C	Carbono
cm ⁻¹	Uno entre centímetros
EDS	Microanálisis por dispersión de energía
EM	Campo electromagnético
eV	electronvoltio
ext	Extinción
Fig.	Figura
GP	Granos de polen

H	Hidrógeno
HAuCl ₄	Ácido tetracloroaurico
HRTEM	Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
kV	Kilovoltios
Log	Logaritmo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
O	Oxígeno
OG	Óxido de grafeno
p/v	Peso dividido entre volumen
SAED	Área selecta del patrón de difracción de electrones.
sca	Dispersión
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SERS	Dispersión Raman mejorada en la superficie
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
v/v	Volumen sobre volumen
XPS	Espectroscopia por emisión de rayos X
λ	Longitud de onda
λ_{\max}	Longitud de onda máxima



Índice de Figuras



Figura	Página
1 Representación nanopartículas 0D.....	4
2 Representación de estructuras 1D.....	4
3 Representación de estructuras 2D.....	4
4 Compuestos volátiles identificados en hojas de <i>A. californica</i> : comparación en porcentajes de área detectados por Steam-Distilled Oil y SPME Samples en el GC/FID.....	10
5 Representación esquemática del dipolo inducido derivado de la resonancia de plasmón superficial en: a) esferas, b) esferas huecas y c) nanobarras.....	16
6 Localización en la región visible de resonancia del plasmón superficial de Au y Ag, dependiendo de su morfología y composición.....	17
7 Modos de distribución de cargas en un cubo.....	18
8 Esquematización de efecto SERS	18
9 Esquematización de un “hot-spot” y del efecto SERS	20
10 Espectro Raman de azul de metileno (AM). A: Estructura molecular de azul de metileno.....	20
11 Espectro UV-vis de nanopartículas de oro y nanopartículas de plata	28

12	Interacción del haz de electrones con la muestra	29
13	Esquema de microscopio electrónico de barrido (SEM).....	30
14	Esquema de microscopio electrónico de transmisión (TEM).	32
15	Proceso de generación de un rayo X característico	34
16	Diagrama del proceso fotoelectrónico.....	35
17	Esquematación de la dispersión Rayleigh y dispersión Raman.....	37
18	Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (A) y nanopartículas de oro (B) sintetizadas con extracto de <i>A. californica</i> utilizando agua (A), metanol (M) e isopropanol (I) como solventes	45
19	Nanoestructuras de plata obtenidas con extracto acuoso de <i>A. californica</i>	46
20	A) Dispersidad de nanopartículas esféricas de plata obtenidas con extracto acuoso de <i>A. californica</i> , B) micrografía de HRTEM y C) Patrón SAED. D) Polidispersidad de nanopartículas biogénicas base metanol, E) micrografía HRTEM y F) Patrón SAED. G) nanopartículas biogénicas de plata sintetizadas con extracto base isopropanol, H) HRTEM y I) patrón SAED.....	47
21	A) Dispersidad de nanopartículas esféricas de oro obtenidas con extracto acuoso de <i>A. californica</i> , B) nanopartículas planas. C) Polidispersidad de nanopartículas biogénicas base metanol y D) nanopartículas planas. E) nanopartículas sintetizadas con extracto base isopropanol.....	48
22	A) B) Micrografía HRTEM de nanopartículas de oro obtenidas con extracto acuoso de <i>A. californica</i> y C) Patrón SAED. D) E) HRTEM de nanopartículas biogénicas base metanol, F) Patrón SAED. G) Micrografías HRTEM de nanopartículas biogénicas de oro sintetizadas con extracto base isopropanol y I) patrón SAED.	49
23	Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB+AgNPs sintetizadas con extracto acuoso, MB+AgNPs sintetizadas con extracto base metanol, MB+AgNPs sintetizadas con	

	extracto base isopropanol, MB+AuNPs sintetizadas con extracto acuoso, MB+AuNPs sintetizadas con extracto base metanol y MB+AuNPs sintetizadas con extracto base isopropanol.....	51
24	Espectro Raman del Óxido de grafeno sintetizado.....	54
25	A) Espectro XPS del oxido de grafeno sintetizado, B) deconvoluciones del pico C1s y C) del pico correspondiente O1s.	55
26	A) Micrografía TEM de óxido de grafeno biogénico, B) patrón SAED y C) micrografía HRTEM.	56
27	Espectros UV-Vis de óxido de grafeno (OG), nanocomposito AgNPs/OG, y nanocomposito AuNPs/OG	57
28	A) Mapeo por microanálisis por dispersión de energía (EDS) acoplado a microscopía electrónica de Barrido de Oxido de grafeno y B) espectro del análisis. C) Mapeo del Nanocomposito AgNPs/OG y D) espectro del microanálisis. E) mapeo del nanocomposito AuNPs/OG y F) espectro del microanálisis.....	58
29	A) Micrografía TEM de nanocomposito AgNPs/OG, B) micrografía de HRTEM y C) Patrón SAED. D) Micrografía TEM de nanocomposito AuNPs/OG, E) micrografía de HRTEM y F) Patrón SAED.....	59
30	A) Polidispersidad de nanopartículas de plata en el nanocomposito AgNPs/OG; y B) polidispersidad de nanopartículas de oro en el nanocomposito AuNPs/OG.....	60
31	Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB con el sustrato del nanocomposito AgNPs/OG y MB más el nanocomposito AuNPs/OG.....	61
32	Micrografías SEM de nano/microestructuras AgNPs/GP (A,B) Y AuNPs/GP (C, D).....	64
33	Mapeo por EDS de A) nano/microestructuras AgNPs/GP y B) AuNPs/GP, mostrando el espectro del análisis de dispersión de energía, y cada canal correspondiente a un elemento obtenido en el mapeo respectivo.....	65

34	Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB con el sustrato de la nano/microestructura hibrida AgNPs/GP y MB más AuNPs/GP.....	66
35	Micrografías de fluorescencia de nano/microestructuras hibridas. A) AgNPs/GP en campo claro, B) filtro amarillo, C) DAPI, D) rojo, E) amarillo de cúmulo. F) AuNPs/GP en campo claro, G) filtro amarillo, H) DAPI, I) rojo, J) amarillo de cúmulo.....	68



Índice de Tablas



Tabla	Página
1 Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman, usando AgNPs y AuNPs.....	52
2 Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman, usando AgNPs/OG y AuNPs/OG.....	62
3 Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman, usando AgNPs/GP y AuNPs/GP.....	67



INTRODUCCIÓN



El desarrollo y producción de la nanotecnología como aplicación de los conocimientos obtenidos de la nanociencia, que se basa en la descripción de la materia a escala nanométrica, permite el diseño de sistemas funcionales a esta escala promoviendo, de ese modo, el aprovechamiento de sus propiedades, derivando en aplicaciones con fines específicas. Dentro de las múltiples aplicaciones de los nanosistemas funcionales se encuentra el sensado, hecho que se atribuye al comportamiento que mantiene la nanopartícula en su amplia área superficial, lo que permite promover la adhesión de moléculas comúnmente ocupadas en el sensado o en la utilización de la misma como sensor plasmónico, en virtud del llamado plasmón de resonancia superficial. De igual forma, dado su tamaño, morfología y estructuras, promueven el incremento de señales debido a la generación de “hot spots” como se patenta por medio de la técnica Dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS, por sus siglas en inglés).

Teniendo esto en cuenta, el presente trabajo busca centrarse en la síntesis, caracterización y aplicación en efecto SERS de nanosistemas obtenidos mediante una síntesis verde, que promueva la factibilidad y facilidad metodológica, la amabilidad ambiental, la reducción de productos de desecho nocivos, y el escalamiento industrial. Para tal efecto, se proponen tres sistemas diferentes, a continuación descritos.

El principio del desarrollo de la nanotecnología se basa en la producción de materia a escala nanométrica, de modo que bajo la obtención de nanopartículas y nanoestructuras comienza el reto de describir su comportamiento fenomenológico y determinar posibles aplicaciones en base a sus

propiedades. Por tal motivo, en el primer sistema a estudiar está conformado por nanopartículas y nanoestructuras sintetizadas a partir de extracto de *Anemopsis californica* como agente reductor y estabilizador, con el objetivo de analizar el efecto del solvente en la producción de tales nanopartículas, así como la naturaleza composicional en la determinación de su morfología y distribución en tamaño.

En el lógico e imperante avanzar de la nanotecnología, la producción de nanopartículas y nanoestructuras y su descripción se ve superado por la necesidad de incrementar y promover las propiedades de la materia a esta escala, de manera que mediante la producción de materiales compuestos se busca lo ya mencionado. Lo anterior permitió seleccionar el segundo nanosistema conformado por óxido de grafeno (OG) sintetizado mediante exfoliación acuosa utilizando un surfactante y extracto de *A. californica*. Una vez obtenido, se promovió su funcionalización con nanopartículas de oro y plata sintetizadas estabilizadas y soportadas sobre el propio óxido de grafeno, asistido por extractos base isopropanol de *A. californica*.

Por último, los nanosistemas no solo se pueden centrar en la producción de nanocompositos, sino que estos pueden virar a su interacción con sistemas de diferente orden de magnitud, haciendo necesario, en muchos casos, la inspiración en sistemas biológicos en formas y estructuras que permitan incrementar aun mas las propiedades de la materia en este orden. Por lo tanto, el tercer nanosistema evaluado se base en la generación de nano/microestructuras híbridas de nanopartículas de plata o nanopartículas de oro con granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis*. Tal sistema híbrido, está fundamentado en el hecho de que los granos funcionan no sólo como un templete para las nanopartículas sino como agente reductor y estabilizador para su formación.

A la par con la síntesis y la caracterización estructural, los tres nanosistemas propuestos, nanopartículas y nanoestructuras, nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG, y nano/microestructuras híbridas AgNPs/GP y AuNPs/GP, se evaluará su capacidad para amplificar la señal Raman del azul de metileno, lo cual es posible gracias por la dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) que presentan estos sistemas.



CAPÍTULO UNO

Antecedentes



La Nanociencia es un área emergente de la ciencia, que se ocupa del estudio del comportamiento de los sistemas materiales cuando se limita su tamaño a dimensiones nanométricas, así como el análisis de los fenómenos que tienen lugar a esa nanoescala [1]. La nanotecnología, por su parte, es la aplicación de las estas propiedades y fenómenos observados en tales materiales en su escala nanométrica, dando la posibilidad de transformar una gran variedad de campos científicos y tecnológicos [2]. Ambas áreas de la ciencia han cobrado importancia en las últimas décadas debido a las múltiples aplicaciones que los materiales nanométricos prometen, tales como en catálisis, medicina, biología, ciencia de materiales, tecnología, entre otras. [3]

1.1 Nanomateriales

Los nanomateriales son estructuras cuyo tamaño, en al menos una de sus dimensiones están en el rango de 1-100 nm [4], y se encuentran situadas entre el estado masivo y el estado molecular [5] lo que les confiere propiedades intermedias y características entre estos dos estados de la materia [6]. En este sentido, la morfología y composición son aspectos que impactan en las propiedades del nanomaterial ya que estos influyen en propiedades como la magnetización permanente, la actividad catalítica, la piezoelectricidad, el punto de fusión, entre otras [7]. De acuerdo con el número de dimensiones del material que se encuentre en régimen nanométrico podemos clasificar a los nanomateriales de la siguiente manera:

- **0D** (cero dimensiones): es aquella en la que todas las características dimensionales tienen el mismo orden de magnitud (no más de 100 nm); a este grupo corresponden las nanopartículas, algunos ejemplos con diferentes morfologías son esferas [8], esferoides [9] y nanocajas huecas [10].

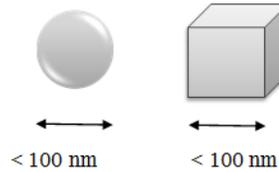


Figura 1. Representación nanopartículas 0D.

- **1D** (una dimensión): en estos sistemas, una dimensión de la partícula supera el régimen nanométrico, la cual se encuentra típicamente en la escala micrométrica, a estos corresponden los nanotubos [11], nanoalambres [12] y Nanobarras [13].

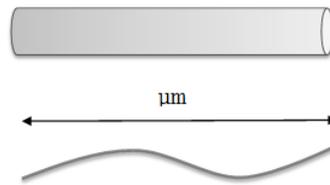


Figura 2. Representación de estructuras 1D.

- **2D** (dos dimensiones): dos de las dimensiones son una orden de magnitud mayor que la tercera que se encuentra en la escala nanométrica y con dimensiones menores a 100 nm [14].

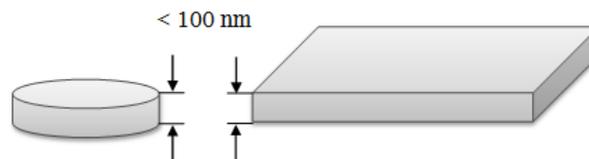


Figura 3. Representación de estructuras 2D.

Entre las dimensiones de una escala atómica y las dimensiones normales, la materia condensada exhibe algunas características específicas notables. Estas características conocidas se relacionan con diversos

factores como: la fracción de átomos superficiales, la gran energía superficial, el confinamiento espacial y las imperfecciones reducidas. [15] Tales propiedades específicas de la materia a nanoescala son principalmente:

- Tener una temperatura de fusión significativamente más baja que el material en bulto, gracias a la enorme fracción de átomos superficiales.
- Son mejoradas las propiedades mecánicas llegando incluso a la resistencia teórica debido a la baja probabilidad de defectos a nanoescala.
- Las propiedades ópticas son significativamente diferentes a las de los cristales en bulto.
- La conductividad eléctrica disminuye en una dimensión reducida debido a la dispersión de la superficie. [16]

La forma y composición química del material es de suma importancia para sus posibles aplicaciones. Por su composición se pueden clasificar en nanomateriales metálicos, semiconductores, óxidos metálicos y nanocompositos [17]. Sin embargo, por su forma, la clasificación es más compleja, ya que se basa en características tales como dimensionalidad, morfología, composición, uniformidad y aglomeración [18].

En específico y para fines del presente trabajo un material híbrido se define como la mezcla de dos o más materiales que expresan nuevas propiedades [19], en este sentido, un material híbrido nanoestructurado refiere a un material conformado por dos o más materiales en el cual alguno o todos en su conjunto se encuentran en el orden de 1 a 100 nm, y que en conjunto conforman un mismo material.

Por otra parte, un composito híbrido hace referencia a un material que es el resultado de la combinación de un material híbrido (previamente definido) y un composito, que es la mezcla de materiales que consisten en una matriz de cierto material y subnivel del segundo material disperso [20]. Otras definiciones de caracterización de materiales se dirigen hacia otro nivel de descripción siendo un material

hibrido-funcional aquél composito con funciones nuevas asociadas a la mezcla de los materiales y que por separado no se exhiben en su conjunto [21]. De esta manera es posible ubicar los materiales y los nanomateriales dentro de una clasificación estandarizada.

1.2 Síntesis de nanomateriales.

Los medios de obtención de nanomateriales se guían generalmente por dos rutas distintas:

- **Top-down:** en ésta ruta se parte del material en bulto hasta llegar a nanopartículas; permite la preparación de partículas de tamaño relativamente grande y en forma heterogénea. Este tipo de proceso involucra, por lo general un mecanismo físico o mecánico de molienda y posteriormente una estabilización de la partícula obtenida a través del uso de un agente protector coloidal. Diversos métodos físicos han sido utilizados para síntesis de nanopartículas. Técnicas y métodos en aerosol, litografía, ablación láser y campos ultrasónicos han sido usados exitosamente para producir nanopartículas. [22]
- **Bottom-up:** en éste caso, se parte de átomos hasta llegar a la formación de la nanopartícula, permitiendo obtener partículas uniformes, frecuentemente de distintos tamaños, formas y estructuras. Estos métodos utilizan átomos que se agregan en solución o en fase gaseosa para formar partículas de tamaño definido, bajo las condiciones experimentales apropiadas. La síntesis a partir de fuentes atómicas o moleculares (bottom-up) tiene la capacidad de controlar las propiedades y características deseadas en el producto final. [23]

Para la síntesis de nanomateriales se han implementado métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos como evaporación [23, 24], dispersión de átomos metálicos solvatados, pulverización con plasma y condensación en gas inerte, ablación láser en fase líquida y gaseosa [25, 26]; así como los métodos químicos: microemulsión [27], reducción química de sales metálicas [28], electroquímico, y sol-gel [29].

Así mismo, la síntesis definida mediante rutas de reducción puede dirigirse mediante tres rutas distintas: La primera de ellas necesita de la presencia de agentes reductores fuertes como el borohidruro de sodio [30], la hidrazina [31] o el borohidrato de tetrabutilamonio [32], o, por su parte pueden reducirse a una solución iónica en presencia de agentes reductores débiles como el citrato de sodio [33], la glucosa [34], la dimetilfomamida [35], el bitartato de potasio [36], el ácido ascórbico [37] o polioles [38]. La segunda ruta genera nanopartículas a partir de irradiación UV [39], radiación gama [40], radiación de ultrasonido [41] o microondas [42] en presencia de una solución iónica en y de agentes estabilizantes. Una tercera ruta es la llamada biosíntesis, o síntesis por métodos biológicos.

En este sentido, la biosíntesis de nanopartículas se basa en la utilización de organismos como bacterias, hongos, levaduras y plantas, así como sus derivados, a manera de agentes reductores y estabilizadores [43, 44, 45, 46]. Tales procesos han generado una síntesis limpia, no tóxica y amigable con el ambiente, no obstante, aun es necesario un refinamiento y control del tamaño medio de la partícula, así como su intervalo de tamaños y la morfología, debido a que las nanopartículas biogénicas presentan amplia dispersidad de tamaños y morfologías en contraposición de las NPs sintetizadas con otros métodos. [47, 48].

1.2.1 Biosíntesis utilizando extractos de plantas

Como se ha mencionado existen considerables ventajas cuando sistemas biológicos son utilizados en la síntesis de nanomateriales en comparación con los demás métodos expuestos, como lo son la utilización de metodologías simples, la efectividad costo-beneficio, la compatibilidad ecológica, la facilidad de escalamiento industrial sin necesidad de grandes cantidades de presión, temperatura y energía [49, 50, 51]

En base al objetivo del presente trabajo solamente será expuesta la síntesis de nanoestructuras mediante la utilización de extractos de plantas. En este sentido un gran número de extractos de plantas como: albahaca india (*Ocimum sanctum*), sábila (*Aloe vera*), Ce Bai Ye (*Cacumen platycladi*) y pimienta

larga (*Piper longum*), han demostrado su capacidad para producir nanopartículas con una gran estabilidad debido a la presencia de agentes reductores como alcaloides y flavonoides que son los mayores fito-constituyentes [52].

Estos métodos verdes son rápidos, eficientes y generalmente permiten la formación de nanopartículas cristalinas con una variedad de tamaños. Esto depende de la naturaleza y concentración de los extractos de plantas, además, también depende del pH, temperatura de incubación y tiempo de la reacción de síntesis [53].

Hay un gran número de reportes en los que se describe la síntesis de NPs Ag y Au mediante el uso de extractos de plantas medicinales como espinaca china (*Besella alba*), girasol (*Helianthus annuus*), Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), maíz (*Zea Mays*), extractos de hojas de té, fruta, espino negro (*Crataegus douglasii*) [54], Acacia (*Acacia leucophloea*) [49], eucalipto (*Eucalyptus oleosa*) [54], abrigo de José (*Alternanthera dentata*) [52], entre otros cientos de plantas. De igual forma, han sido sintetizadas por extractos que exhiben propiedades antioxidantes y anticancerígenas como manzana del elefante (*Dillenia indica*), orégano (*Origanum vulgare*), mora india (*Morinda pubescens*), manzana de mayo himalaya (*Podophyllum hexandrum*), cálamo aromático (*Acorous calamus*) [50], entre otros.

En estudios anteriores se ha encontrado una eficiencia de síntesis para nanopartículas mediante bio-reducción superior al 94% a una temperatura de 25°C, además de obtenerse partículas esféricas de tamaño dentro del intervalo de 20 a 90 nm, siendo las menores concentraciones de los extractos las que producen partículas de menor tamaño [55].

En la técnica de bio-reducción, el tamaño de las nanoestructuras está ligado a la cinética de la formación y por lo tanto de la composición de la solución reactiva. La cinética determina el tamaño de partícula y el porcentaje de volumen-área superficial resultantes.

1.2.1.1 *Anemopsis Californica* como agente reductor y estabilizador.

Los extractos acuosos de las plantas son comúnmente utilizados como bio-reductores. Dichos extractos, están constituidos por sustancias tales como taninos, saponinas, azúcares reductores, y flavonoides [56]. Tales sustancias presentan una característica en común, tienen capacidad reductora o antioxidante. Las moléculas antioxidantes son compuestos capaces de donar electrones [57]; de esta forma favorecen la reducción de otras sustancias mientras estos se oxidan. Teniendo esto en cuenta es propuesta la síntesis de nanopartículas mediante extractos de *Anemopsis californica*.

Anemopsis es uno de los cinco géneros que pertenecen a la familia *Saururaceae*. El género contiene una sola especie de gancho, *A. californica*, comúnmente conocida como yerba mansa. Nativa del suroeste de Estados Unidos y el norte de México, las hojas y raíces de *A. californica* se han utilizado con fines medicinales para tratar el dolor, la inflamación y la infección; así como diferentes estudios que muestran sus propiedades antimicrobianas [58] y anticancerígenas [59].

En la literatura se ha reportado la identificación de 12 compuestos volátiles aislados a partir de las raíces y rizomas de *A. californica* recogidos en California. El compuesto más abundante en sus extractos es metil eugenol (57%). Otros componentes que se han detectados en el aceite de raíz en mayor que 1% (v/v) fueron los siguientes compuestos: timol, piperitona, éter timol metilo, R-pineno, 1,8-cineol, metilchavicol, y p-cimeno [58].

	compound ^a	std ^b	KI ^c	% peak area (<i>n</i> = 2)	
				oil	SPME
1	2-(<i>E</i>)-hexenal	-	853	0.3-1.1	ND ^d
2	2,4-(<i>E,E</i>)-hexadienal	-	909	ND	trace
3	tricyclene	+	928	ND	0.0-0.3
4	α -pinene	+	940	0.4-3.4	10.3-13.1
5	camphene	+	955	0.0-0.1	0.5-0.5
6	sabinene	+	977	0.0-0.1	4.4-5.7
7	β -pinene	+	981	0.3-1.5	0.0-0.3
8	myrcene	+	992	0.1-0.3	0.8-1.0
9	α -phellandrene	+	1006	0.2-0.5	0.2-0.2
10	<i>p</i> -cymene	+	1027	0.0-0.2	1.5-2.2
11	β -phellandrene	-	1032	0.9-2.3	8.6-8.7
12	1,8-cineole	+	1035	1.5-3.5	10.0-10.1
13	(<i>Z</i>)- β -ocimene	-	1041	0.2-0.3	0.6-0.6
14	(<i>E</i>)- β -ocimene	-	1052	1.1-2.1	2.0-2.3
15	<i>cis</i> -sabinene hydrate	-	1069	ND	trace
16	terpinolene	+	1089	ND	trace
17	linalool	+	1099	0.8-0.8	0.9-1.0
18	<i>cis</i> -pinene hydrate	-	1143	ND	trace
19	camphor	+	1145	ND	trace
20	borneol	+	1168	0.3-0.3	0.3-0.3
21	α -terpineol	+	1190	0.4-0.5	0.3-0.3
22	methylchavicol	-	1196	0.7-0.8	1.2-1.3
23	thymol methyl ether	-	1236	ND	Trace
24	piperitone	+	1254	10.4-11.7	16.0-16.4
25	thymol	+	1292	0.1-0.2	trace
26	δ -elemene	-	1339	0.0-0.1	0.1-0.1
27	α -copaene	-	1377	ND	trace
28	β -elemene	-	1392	0.1-0.3	0.1-0.1
29	methyl eugenol	+	1403	6.5-7.3	5.0-5.2
30	(<i>E</i>)-caryophyllene	+	1420	4.2-5.0	8.2-8.3
31	<i>trans</i> - α -bergamotene	-	1437	ND	0.1-0.1
32	α -guaiene	-	1440	1.0-1.3	1.7-1.8
32	α -humulene	+	1454	0.8-1.1	1.4-1.4
34	(<i>E</i>)- β -farnesene	-	1458	0.2-0.5	0.3-0.3
35	germacrene D	-	1485	0.0-0.1	trace
36	<i>cis</i> - β -guaiene	-	1488	1.2-1.5	1.2-1.3
37	elemicin	+	1552	52.5-53.7	13.1-13.3
38	caryophyllene oxide	+	1582	ND	trace

Figura 4. Compuestos volátiles identificados en hojas de *A. californica*: comparación en porcentajes de área detectados por Steam-Distilled Oil y SPME Samples en el GC/FID. Std, compuestos identificados; KI índice de Kováts y ND, no detectado.

Cabe mencionar que las hojas de *Anemopsis californica* no han sido ocupadas como agente reductor y estabilizador en la biosíntesis de nanopartículas, sin embargo, por tal motivo y dada su composición reportada en la literatura es propuesta su utilización en la generación de las mismas.

1.2.2 Granos de polen como agente reductor, estabilizador y biotemplate.

La naturaleza es una notable fuente de inspiración para el diseño de partículas con morfologías complejas adaptadas para una variedad de funciones [60]. Los organismos realizan un control a nivel molecular sobre las propiedades fisicoquímicas, lo que se refleja, directa o indirectamente en el control de la actividad de superficies biológicas orgánicas que son inmiscuidas en la formación de distintos materiales [61]. Por tal motivo, un diseño bioinspirado hace posible el control sobre distintos aspectos en la formación de nuevos materiales, incluyendo la localización precisa de las partículas, la densidad de nucleación, el tamaño, la estabilidad y la arquitectura [61].

En este tenor, las partículas de polen han recibido un notable interés como micropartículas biogénicas abundantes, renovables, robustas y adhesivas con características químicas y estructurales únicas [62]. La capa exterior (exina) del polen se compone predominantemente de esporopolenina; polímero entrecruzado de ácidos grasos y niveles moderados de compuestos de aromáticos, fenilpropanoides, polifenoles y carotenoides [63]. Las partículas de polen varían en tamaño de unas micras a cientos de micras en diámetro nominal, con una notable variedad de patrones estructurales de exina encontrados entre diferentes especies de polen, incluidos los complejos reticulados [64]. La composición química superficial conocida y el rango disponible de complejo, así como las morfologías específicas de la especie, hacen del polen nanoestructurado, atractivo como plantillas de microescala sostenibles para ser utilizadas como templates en la conformación de nanocompositos de interés.

Por lo tanto, en los últimos años distintos grupos de investigación han desarrollado metodologías precisas para la síntesis de nanopartículas metálicas y de óxidos utilizando como template granos de polen de diferentes especies [65], muy en especial, las nanopartículas de plata, oro [65][66] y magnetita [67, 68] han recibido considerable interés, dadas las propiedades que exhiben al conformarse como un composito y a las propiedades intrínsecas de dichos metales nobles y óxido. En este rubro Haisheng Lin y colaboradores en 2015 lograron la síntesis de micropartículas de polen con núcleo de magnetita [67]; por otra parte, Lucas Johnstone y colaboradores, en 2017, reportaron la síntesis de micropartículas de

polen decoradas con nanopartículas de plata y con nanopartículas de plata-óxido de silicio, determinando sus propiedades y promoviendo en mayor medida la luminiscencia, además de demostrar las propiedades SERS de las mismas [66], sin embargo los métodos de formación de composites se basan en la funcionalización de la exina por componentes que sirven como funcionalizadores de la superficie de la exina de los granos de polen uniendo las nanopartículas, compuestos como el aminopropil trimetoxicilano (APTES) [67]. Sin embargo, bajo un análisis de la composición de la exina, como ya se ha mencionado, ésta está compuesta entre otras cosas por polifenoles y fenilpropanoides, compuestos asociados a la síntesis de nanopartículas mediante biosíntesis, por tanto es posible pensar que la síntesis pueda ser mediada por el grano de polen.

1.2.3 Oxido de Grafeno como nanomaterial y templete

El Carbono es uno de los elementos más conocidos y abundantes de la tabla periódica. Este puede presentar diversas formas alotrópicas desde el grafito, pasando por el diamante y los fullerenos [69]. En los últimos años las formas alotrópicas del grafito han experimentado en su estudio un gran desarrollo a raíz del descubrimiento y sobre todo de la producción a nivel de laboratorio del grafeno. El grafeno es una estructura nanométrica bidimensional que constituye el grafito a partir de varias capas unidas a través del plano basal por fuerzas de Van Der Waals. Consta en su morfología de varios anillos hexagonales de carbono unidos por enlaces fuertes (configuración atómica de panal de abeja) [70]. Siendo la única diferencia entre grafeno y oxido de grafeno la presencia de grupos hidroxilo o carbonilo reducidos sobre la capa del mismo.

Para que el grafeno sea considerado como tal debe presentar una superposición máxima de diez capas [71]. Teniendo esto en cuenta, así como el arreglo hexagonal, le permite a cada átomo de carbono interactuar con una hibridación sp^2 con tres átomos de carbono, generando un enlace π deslocalizando, donde el par electrónico confiere las propiedades extraordinarias al grafeno. La hibridación sp^2 presente en los enlaces de carbono brinda la dureza y rigidez, confirmando que se trata de un nuevo material.

Otras características son: flexibilidad, maleabilidad y ductibilidad, propiedades nos permiten su deformación y tensión, sin que este pierda sus cualidades [71].

La síntesis del grafeno fue merecedora del premio Nobel de física en el 2010 otorgado a Andre Geim and Konstantin Novoselov y en los últimos años ha tomado considerable relevancia debido a las sorprendentes propiedades físicas y químicas del grafeno, al creciente número de potenciales aplicaciones; por ejemplo, en fabricación de transistores, componentes eléctricos, catalizadores, inhibición de crecimiento bacteriano y aplicaciones médicas.

En el desarrollo de métodos para la obtención del grafeno se han generado técnicas de manera diversificada como la exfoliación mecánica o ultrasónica [72, 73], la deposición química en fase vapor, el crecimiento epitaxial [74] y la reducción de óxido de grafeno [75]. A pesar de las ventajas distintivas del método químico húmedo por reducción de óxido de grafeno, los agentes reductores más ampliamente utilizados, tales como hidrazina, dimetilhidrazina y NaBH_4 , pueden ser tóxicos para algunas de sus aplicaciones, principalmente en el área biomédica; donde se tienen reportes de que cantidades traza de estos agentes reductores podrían tener un efecto perjudicial sobre aplicaciones en biomateriales exhibiendo amplia citotoxicidad [75].

Recientemente se ha iniciado la sustitución de agentes reductores tóxicos ocupados comúnmente por agentes biológicos, como el uso de vitamina C, la albumina del suero bovino o el té verde; este último se ha ocupado gracias a la estabilidad que genera en la unión de los polifenoles al material bidimensional, además que estos grupos exhibe propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad [75]. De esta manera, un estudio realizado con la utilización de extractos formados con distintos tipos de plantas ricas en polifenoles permitirá una estabilización deseada del grafeno, como es el caso de la planta *Anemopsis californica*. Sin embargo, el método de reducción del óxido de grafeno conlleva la desventaja de una alta producción de defectos estructurales por la adición de oxígeno, así como la dificultad de retirarlo del sistema [72].

Por su parte, se ha demostrado que es posible la exfoliación del grafito con la utilización de un sistema acuoso-surfactante [72] que no oxida al grafito ni mantiene los inconvenientes propios de solventes altamente tóxicos. En este sentido una producción de óxido de grafeno a partir de este método de exfoliación puede ser incluido con agentes estabilizadores, como lo son los polifenoles presentes en el extracto de *A. californica* como se busca comprobar.

Los grupos oxido funcionales del óxido de grafeno (OG), como los grupos epóxido, alcohol, ácidos carboxílicos, cetonas, y aldehídos proveen una excelente dispersabilidad acuosa y numerosos sitios de unión covalente lo cual incrementa la biocompatibilidad [76] en comparación con el grafeno. Adicionalmente la gran área superficial, incluyendo la reminiscencia de zonas hidrofóbicas permite la adsorción de moléculas orgánicas aromáticas [77], polímeros [78] e iones [79] mediante interacciones de puente de hidrógeno. Estas propiedades hacen del óxido de grafeno un material factible para la construcción de plataformas biocatalíticas.

Por su parte el óxido de grafeno y el grafeno han sido recientemente utilizados como templetas para la deposición de nanopartículas de oro [80] y plata [81], permitiendo la formación de un nanocomposito, conllevando a que las propiedades atribuibles a cada uno se vean maximizadas gracias a la interacción de estos dos distintos nanomateriales. Cabe destacar que tales nanocompositos se perfilan para diversas aplicaciones en la industria energética y en la amplificación de señales, así como sus propiedades antibacteriales [81].

1.3 Nanopartículas de Plata y Oro

La plata (Ag) es un elemento químico que se encuentra en la naturaleza formando parte de distintos minerales. Es un metal de transición cuyo orbital d está parcialmente lleno de electrones, tal situación es la responsable de muchas de sus propiedades. De entre los metales de transición, la plata es un metal especialmente atractivo debido a la dependencia de sus propiedades ópticas y alta eficiencia de la excitación de plasma con su forma, tamaño y dispersión además de su alta conductividad térmica y

eléctrica. Estas propiedades han permitido prometedoras aplicaciones de las nanopartículas de plata en catálisis para la oxidación selectiva de estireno, recubrimientos antimicrobianos amigables con el ambiente, sensores ópticos de tiempo real, fotocátalisis, impresiones electrónicas, fotónicas, entre otras [82].

El oro (Au), por su parte, es un metal de transición blando, brillante, amarillo, pesado, maleable y dúctil. En su forma coloidal, ha sido utilizado desde tiempos remotos con fines estéticos y decorativos, para dar coloraciones borgoñas y rojizas a los vidrios y cerámicas. A partir del siglo pasado se han reportado diversos métodos de preparación de coloides de oro y actualmente las nanopartículas de oro son de gran interés debido a sus propiedades [83].

Los nanomateriales metálicos son una clase importante de materiales debido a sus singulares propiedades catalíticas [84], ópticas [852], magnéticas [86] y eléctricas [87], entre otras; estas propiedades son consideradas como únicas debido, principalmente, a las diferencias que presenta la banda electrónica de un metal comparadas con la banda electrónica de un aislante [84].

Como ya se ha mencionado, las propiedades de las nanopartículas difieren considerablemente debido a su morfología, dimensión y composición. La dependencia de estas propiedades respecto al tamaño del material puede ser de dos tipos; por el incremento de energía causado por el confinamiento del sistema o por la resonancia del plasmón superficial.

La resonancia de plasmón superficial es un fenómeno causado por la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción como respuesta a una radiación ejercida sobre esta a través de un campo eléctrico externo [88]. En este sentido, cuando el campo electromagnético de un haz de luz incide en un material y el tamaño del nanocrystal metálico es menor que la longitud de onda incidente, entonces se produce la oscilación de los electrones de la banda de conducción, a la cual se le denomina, resonancia del plasmón superficial, y da origen a un intenso y sensible espectro de absorción de la luz en la región UV-Vis. La longitud de onda a la cual aparece la resonancia de plasmón superficial depende

del tamaño, morfología, orientación espacial, y las constantes ópticas tanto de las partículas como del medio en el que se encuentran [89].

Si el tamaño de la partícula es muy pequeño comparado con la longitud de onda del sistema ($a \ll \lambda$), el desplazamiento de las cargas en una partícula esférica es homogénea, por lo que se describe como una distribución dipolar (Fig. 5). Sin embargo, cuando la esfera crece el desplazamiento de la nube de electrones con respecto al núcleo ya no es homogénea, dando como resultado una distribución de carga en la superficie que ya no es dipolar, sino que el sistema se vuelve multipolar. Cuando se presenta este caso, el espectro de absorción muestra más de una resonancia y por lo tanto el espectro se hace más ancho y asimétrico [90].

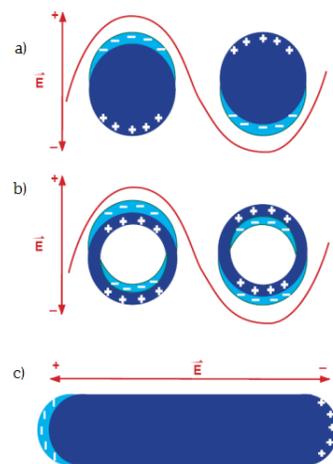


Figura 5. Representación esquemática del dipolo inducido derivado de la resonancia de plasmón superficial en: a) esferas, b) esferas huecas y c) nanobarras.

La resonancia del plasmón superficial provoca el desplazamiento de las cargas negativas y positivas del metal, y este desplazamiento provoca la polarización de la nanopartícula, lo cual origina que las cargas positivas actúen como una fuerza restauradora, generándose de esta forma la oscilación de los electrones. Es gracias a esta propiedad de resonancia que se ha podido caracterizar a las nanopartículas de plata y oro, además de poder determinar sus mecanismos de formación y crecimiento de las mismas.

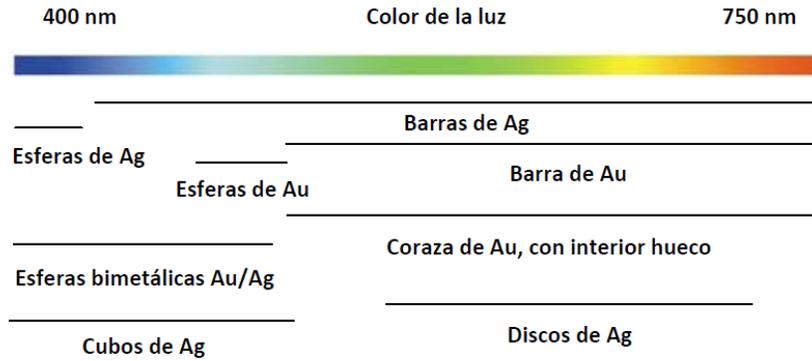


Figura 6. Localización en la región visible de resonancia del plasmón superficial de Au y Ag, dependiendo de su morfología y composición.

Así como el tamaño, la forma también juega un papel importante en el plasmón de superficie de las nanopartículas metálicas. Las nanopartículas metálicas pueden presentar diversas formas, dependiendo de distintos factores como la ruta de síntesis empleada para su obtención, la naturaleza y cantidad de agente reductor en el caso de la síntesis química o biológica, así como del ion metálico precursor, por lo cual se presentan formas simples como cúbica o esférica, pero también existen otras más complejas, tales como, icosaedros o decaedros con caras y vértices bien definidos, o bien, con vértices truncados. Se sabe que los vértices ejercen un fuerte efecto sobre la resonancia de plasmón superficial, esto se debe a que, al interactuar con la luz, la distribución de las cargas en la partícula se puede presentar de distintas maneras; estas distribuciones son las responsables de los picos de absorción del sistema [91]. En la figura 7 se representan los modos de distribución de carga en un cubo; si se aumenta el tamaño del cubo las resonancias se mantienen, sin embargo, la banda del plasmón superficial se ensancha y sufre un corrimiento a longitudes de onda mayores (red-shift) debido a los efectos de dispersión. Esto se debe a que el factor, asociado a la pérdida de energía por colisiones de las cargas obtiene un valor numérico pequeño conforme se aumenta el tamaño del nanocubo, dando lugar a mayor absorción de energía en el sistema, ensanchando la banda del plasmón superficial [91].

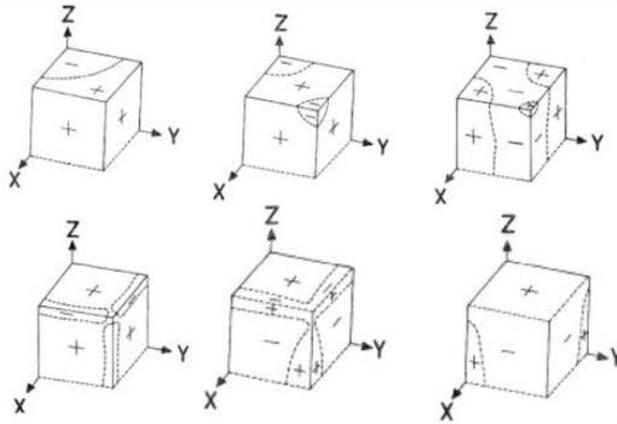


Figura 7. Modos de distribución de cargas en un cubo.

1.4 Efecto SERS

La Dispersión Raman Mejorada en la Superficie (SERS) es una técnica sensible a la superficie que mejora la dispersión de Raman por moléculas adsorbidas en superficies de metal rugosas (Fig. 8). Se sabe que las nanopartículas metálicas, especialmente las nanopartículas de oro y plata, presentan excelentes propiedades de SERS, lo que las hace muy atractivas para el desarrollo de biosensores y biocatalizadores [92].

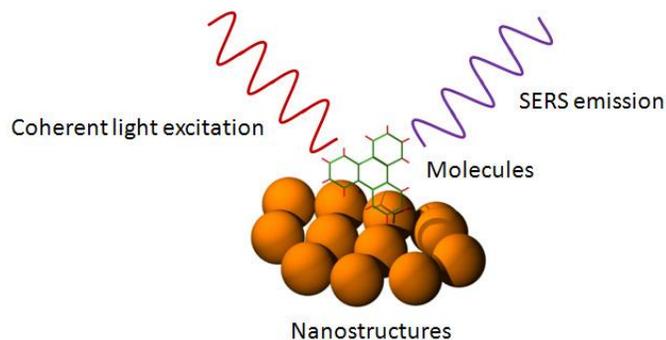


Figura 8. Esquematización de efecto SERS

Es bien sabido que las propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas son más sensibles a la forma y menos al tamaño (en contraste con los nanomateriales aislantes o semiconductores, que son más sensibles al tamaño y menos a la forma) [93]. Sin embargo, el mecanismo exacto de SERS aún no

se entiende completamente. Varias teorías diferentes se han desarrollado para explicar el origen de SERS, y hoy en día, generalmente se acepta que la principal fuente de mejora se debe al campo electromagnético amplificado (EM) en la superficie del sustrato de metal, que resulta de la resonancia del plasmón superficial de nanopartículas metálicas después de la excitación por la luz láser utilizada en la espectroscopía Raman. Las nanopartículas esféricas son, en principio, simétricas, por lo que presentan solo una resonancia de plasmón dipolar, mientras que las estructuras complejas suelen tener múltiples modos dipolo no degenerados, lo que da como resultado espectros de absorción de plasmón amplios, como ya ha sido definido. La nube electrónica inducida en las nanopartículas no esféricas no se distribuye de forma homogénea en la superficie, por lo que las distribuciones de carga multipolares superiores están claramente inducidas [93].

Se ha demostrado que el efecto SERS se produce por excitación de modos de Plasmón muy localizados que ocurren en las grietas o en los poros de la superficie de metal áspero [94]; por lo tanto, así mismo se ha demostrado que el campo electromagnético se potencia fuertemente en las esquinas de nanopartículas triangulares [95][96][97] y decaédrico [98][99][100], con mejoras de campo de hasta 400 veces.

Además, la reducción de la simetría de las nanopartículas con gran número de vértices da como resultado mejoras de campo locales mayores [96]. En este sentido, Lu et al. mostró que las nanoflores de plata potenciaron las señales Raman de Rodamina 6G mucho más fuerte que las nanoesferas de plata [101]. Se reporta un efecto similar para las nanoflores de oro, demostrando que estas nanoestructuras potenciaron las señales Raman de Rodamina B más de 10 veces más fuertes que las nanoesferas de oro, aunque estas últimas se concentraron más [102]. Kottmann et al. comparó la mejora de campo local de diferentes nanoestructuras con un volumen similar pero diferente forma y mostró mejoras de campo de 10 para elíptica, 40 para triangular y 60 para nanoestructuras triangulares asimétricas [96].

Esta ampliación se logra gracias a la generación de los llamados “hot-spots” que se refieren a una unión o interacción cercana de dos o más objetos plasmónicos donde al menos un objeto tiene un pequeño radio de curvatura en la escala de los nanómetros. Tal motivo estructural tiene la capacidad de concentrar un campo electromagnético incidente y amplificar eficazmente el campo cercano entre y alrededor de las nanoestructuras.

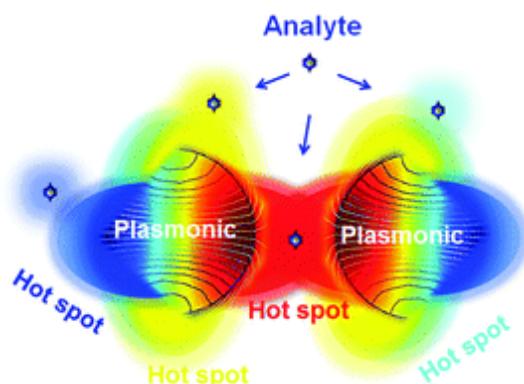


Figura 9. Esquematización de un “hot-spot” y del efecto SERS. Fuente:

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cp/c4cp04946b#!divAbstract>

Así mismo, una de las moléculas señal de mayor utilización para demostrar propiedades SERS es el azul de metileno cuyo espectro Raman se muestra en la Figura 10.

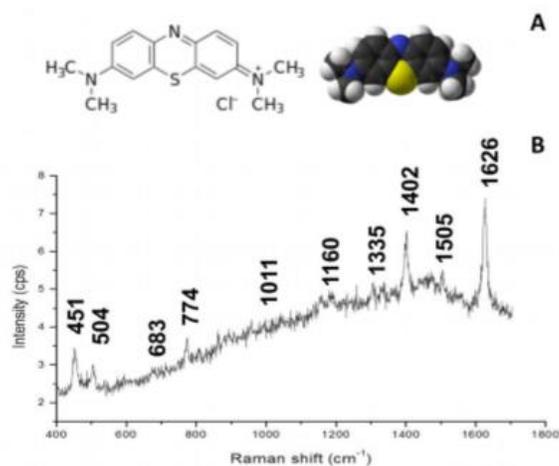


Figura 10. Espectro Raman de azul de metileno (AM). A: Estructura molecular de azul de metileno. Fuente:

<http://www.wikipedia.com>. B: Respuesta Raman del azul de metileno

De este modo, es como mediante la modificación de la superficie sobre la que se deposita la molécula señal es posible la amplificación de la señal generada por la dispersión Raman, como ha sido mostrado en las anteriores líneas, haciendo que el desarrollo de nuevos materiales y su disposición espacial para inducir la formación de hot-spots, sea un campo de investigación ante la infinidad de posibilidades en búsqueda de una mayor eficiencia en la misma.



CAPÍTULO DOS



2.1 Justificación

La nanociencia como una ciencia emergente, se consagra dentro de la interdisciplinariedad, haciéndose patente para su estudio la necesidad de los conocimientos subyacentes de la física, la química y la biología, de manera que sea posible el conocer y describir la materia y sus fenómenos a nanoescala. Por su parte la nanotecnología, como la aplicación tecnológica, necesita del conocimiento de lo ya mencionado y de la apertura de la mente a la creatividad y la innovación, de manera que se logre la generación de tecnologías de alto impacto partiendo desde la comprensión de la materia y sus propiedades.

Es en este sentido de la cooperatividad de las disciplinas, así como desde el conocimiento y reconocimiento de las investigaciones que se generan alrededor de la nanotecnología, que es posible y necesario la generación de nuevas metodologías que permitan la obtención de materiales nanoestructurados bajo nuevos estándares de amigabilidad con el ambiente y alta escalabilidad.

Por tal motivo es que se hace necesario que las nuevas metodologías de síntesis tomen como imperativo el cuidado del medio ambiente a través de síntesis amigables, sin menospreciar la calidad y la capacidad del escalamiento industrial, siendo de este modo, la biosíntesis, que es propuesta en este trabajo, la metodología por excelencia para generar nanomateriales plausibles de ser ocupados y aplicados.

En este sentido, *Anemopsis californica*, como planta endémica de México, nos abre las puertas a su utilización en la búsqueda de los fines ya mencionados, de manera que, siendo una planta endémica y de fácil acceso, permite tanto la escalabilidad como la productividad. Por otro lado los granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* son del mismo modo de fácil acceso y alta disponibilidad en la región, dada su nueva y amplia introducción como planta de ornato. Así, mediante la utilización de lo que se encuentra ante nuestras manos, es posible generar metodologías de síntesis, que sean económicas, amigables con el ambiente y de alta escalabilidad.

Por lo tanto, la propuesta de generación de nanopartículas de plata y oro mediante biosíntesis, de generación de nanocompositos de óxido de grafeno funcionalizados con nanopartículas de plata y oro, ambos obtenidos mediante biosíntesis, y por último la generación de micro/nano estructuras híbridas de nanopartículas de plata y oro utilizando granos de polen como biotemplates, permite mostrar la factibilidad de las rutas biológicas para la síntesis, en la cual se mantienen los objetivos ya mencionados, sin perder la calidad para la aplicación de lo sintetizado, como se hace patente mediante los análisis de propiedades SERS.

2.2 Hipótesis

Será posible la generación de nanopartículas de plata y nanopartículas de oro, la producción de nanocompositos utilizando óxido de grafeno y la obtención de micro/nano estructuras híbridas utilizando granos de polen, todos ellos generados por biosíntesis mediante el extracto de *Anemopsis californica*, y la utilización de granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis*. Mismas partículas y estructuras permitirán la amplificación de señal mediante propiedades SERS.

2.3 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar nanosistemas biogénicos con aplicación en SERS basados en distintos templates.

2.4 Objetivos Específicos

- I. Evaluar diferentes solventes en la elaboración de extractos de *A. californica* y su utilización en la síntesis de nanopartículas de oro y plata determinando diferencias significativas en la producción de nanopartículas.
- II. Evaluar la síntesis de estructuras 2D de óxido de grafeno mediante un sistema acuoso-surfactante-extracto de *A. californica* partiendo de la exfoliación del grafito.
- III. Determinar la síntesis nanocompositos de óxido de grafeno funcionalizados con nanopartículas de plata y oro
- IV. Sintetizar nano/microestructuras híbridas AgNPs/granos de polen y AuNPs/granos de polen, utilizando granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* como agente reductor, estabilizador y biotemplate.
- V. Caracterizar las nanopartículas obtenidas para determinar su morfología, tamaño y propiedades por medio de espectroscopia UV-Visible
- VI. Caracterizar las nanopartículas y estructuras obtenidas mediante Microscopia electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para su determinación morfológica estructural
- VII. Caracterizar las estructuras y nanopartículas mediante Microanálisis por dispersión de energía (EDS) para caracterización química.
- VIII. Evaluar las propiedades ópticas y las propiedades SERS de las nanopartículas y estructuras mediante espectroscopia Raman utilizando azul de metileno como molécula señal



CAPÍTULO TRES

Métodos de Caracterización



El creciente desarrollo de la nanotecnología, ha demandado un gran número de métodos físicos para estudiar, describir y analizar la estructura, composición y morfología de los materiales nanométricos. Algunas técnicas sirven para estudiar el ambiente químico de un solo átomo, mientras que otras sirven para conocer el orden y estructura a largo alcance [103]. Por tal motivo es que en el presente capítulo, se da una breve introducción a los fundamentos de las técnicas fisicoquímicas que son utilizadas para caracterizar las nanopartículas y estructuras sintetizadas.

3.1 Espectroscopía UV-Visible

La radiación electromagnética es una forma de energía transmitida a través del espacio, llamando luz a la radiación electromagnética comprendida en la región UV/visible. La radiación electromagnética puede describirse como una onda caracterizada por una longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud [104].

Teniendo esto en cuenta la espectroscopia de absorción electrónica está basada en la medición de la transmitancia T o de la absorbancia A de luz durante las transiciones electrónicas de una muestra cuando la radiación viaja a través de ella; cuando es una disolución, se encuentran en celdas transparentes, las cuales tienen un camino óptico de n cm. Esta técnica analítica se denomina UV-Vis debido a que la longitud de onda de la luz requerida para transiciones electrónicas se debe encontrar en

la región UV y/o Visible del espectro electromagnético; dicha región se encuentra aproximadamente de los 180 a los 780 nm [105]

El fenómeno de absorción se encuentra descrito mediante la ley de Beer-Lambert, la cual expresa cuantitativamente como la disminución en la atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y la longitud de la trayectoria donde ocurre la absorción, así como el coeficiente de absorción caracterizando al sistema; conforme la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, la intensidad disminuye a medida que el analito es excitado [104]. Basándonos en la ley de Beer-Lambert, la concentración c de un analito se relaciona con la intensidad de la luz incidente I_0 y la intensidad de la luz transmitida I lo cual se representa en la siguiente ecuación:

$$A = \log_{10} T = \log \frac{I_0}{I}$$

En esta ecuación T es la transmitancia (luz que atraviesa la muestra) I_0 representa la radiación incidente e I la correspondiente a la radiación emergente o transmitida. Ahora bien, la ley de Beer-Lambert se puede explicar de la siguiente manera, un haz de radiación monocromático de potencia I_0 choca de forma perpendicular contra un bloque de material absorbente (sólido, líquido o gas), después de pasar a través de una longitud l de material, que contiene n átomos, iones o moléculas absorbentes, su potencia disminuye hasta un valor I como resultado de la absorción.

Esta técnica se basa en la medición de la absorción de luz por una muestra, la radiación proviene de una fuente de luz, generalmente es una lámpara que puede ser de deuterio e hidrógeno, filamento de wolframio o un arco de xenón; posteriormente, se encuentra el monocromador o filtro para la selección de una longitud de onda específica, después se coloca la muestra en una celda de cuarzo y, finalmente está el detector el cual resta la luz incidente (I_0) a la luz final que atraviesa la muestra (I). La diferencia de la luz transmitida es graficada en función de la longitud de onda, dando el espectro de la absorción de la muestra. [104]

En este sentido una partícula está bajo la acción de un campo electromagnético (EM), sus electrones comienzan a oscilar, transformando la energía de la onda incidente en, por ejemplo, energía térmica en un proceso de absorción. Los electrones también se pueden acelerar, y luego, pueden irradiar energía en un proceso de dispersión. En una configuración experimental típica, la atenuación por la suma de dispersión y absorción de una onda electromagnética que atraviesa un material se denomina extinción. Considerando un medio compuesto por NPs dispersas en un medio homogéneo, de tal manera que las interacciones entre las partículas son insignificantes, la extinción, σ_{ext} , se puede modelar como la respuesta óptica de una NP multiplicado por la concentración de las mismas.

$$\sigma_{ext} = N(C_{abs} + C_{sca})$$

Siendo N el número de partículas por unidad de volumen, y C_{abs} y C_{sca} secciones transversales de absorción y dispersión de una partícula. En general, para una disolución coloidal es de esperar que el espectro de absorción en el visible muestre una banda ancha de absorción-dispersión indefinida y monótona sin señal destacable alguna [105].

Sin embargo, para aquellos casos en que se produzca la condición de resonancia, el coeficiente de extinción alcanza un máximo nítido y definido a cierta longitud de onda característica y el espectro colapsa en un pico claro, apareciendo por tanto en su espectro de absorción una banda característica que es lo que se denomina banda de plasmón. Por ejemplo, en el caso de nanopartículas de oro presentan una banda de absorción en la resonancia de plasmón superficial que se centra a 550 nm, mientras que la misma en nanopartículas de plata se observa a 400 nm, aproximadamente; como se muestra en la Figura 11.

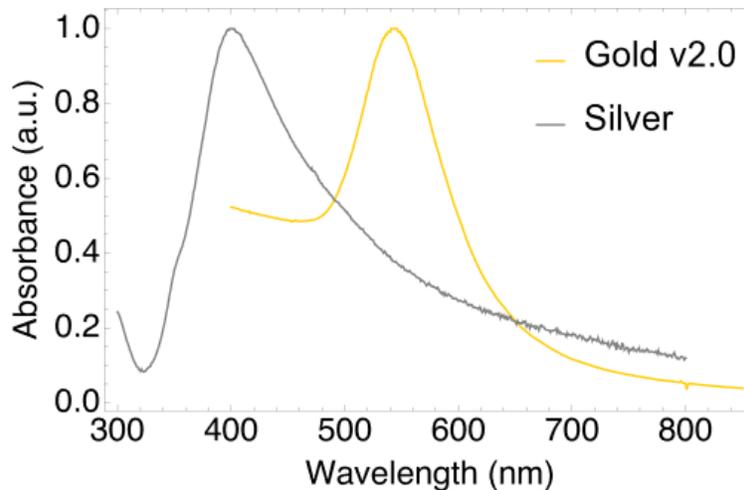


Figura 11. Espectro UV-vis de nanopartículas de oro y nanopartículas de plata. Fuente: <http://www.diagnosticsensers.com>

3.2 Microscopía Electrónica

La microscopía electrónica es una técnica que permite la caracterización de los nanomateriales mediante su forma y tamaño, así como su rugosidad y cristalinidad. Así mismo, la microscopía electrónica permite extender la resolución para estudios morfológicos debido a la diferente magnitud entre la longitud de onda de la luz visible y el intervalo requerido para dimensionar los planos en cualquier estructura cristalina, la cual se encuentra entre 0.3 μm y hasta 0.15 nm. La resolución es ampliada debido a que en la microscopía electrónica no se utiliza radiación electromagnética y sus interacciones para ampliar una magnificación, sino que se emplean electrones para poder “ver”, esto es posible gracias a la dualidad onda-partícula como propiedad de los electrones.

Dicha dualidad se expresa claramente en la ecuación de De Broglie para la longitud de onda de una partícula:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Donde m es la masa de la partícula, v es su velocidad y h es la constante de Planck. Si se asume que la aceleración del voltaje en el cañón de electrones es V, entonces la energía del electrón está dada por:

$$\frac{mv^2}{2} = eV$$

donde e es la carga del electrón, entonces se tiene que $\lambda = \frac{h}{(2meV)^{0.5}}$ o bien, $\lambda = (1.5/V)^{0.5}$ nm. [105] Esto permite que con un microscopio electrónico se puedan obtener electrones acelerados con λ asociada bastante menor de 1 Å, y por tanto se puede obtener resolución a escala atómica, considerando que la distancia interatómica es menor a 1 Å.

Los electrones en el microscopio electrónico se generan por efecto termo-iónico en un filamento (cátodo) que es generalmente wolframio, y se monocromatizan acelerándolos a través de un potencial (E) en un sistema sometido a vacío. Para un voltaje de 100 kV, la longitud de onda asociada a los electrones es 0.037 Å (0.01 Å para 1 MV). Por tanto, los electrones interactúan con el material originando distintas interacciones como se muestran en la Figura 12, siendo transmitidos, difractados de manera elástica o inelástica, absorbidos o retrodispersados.

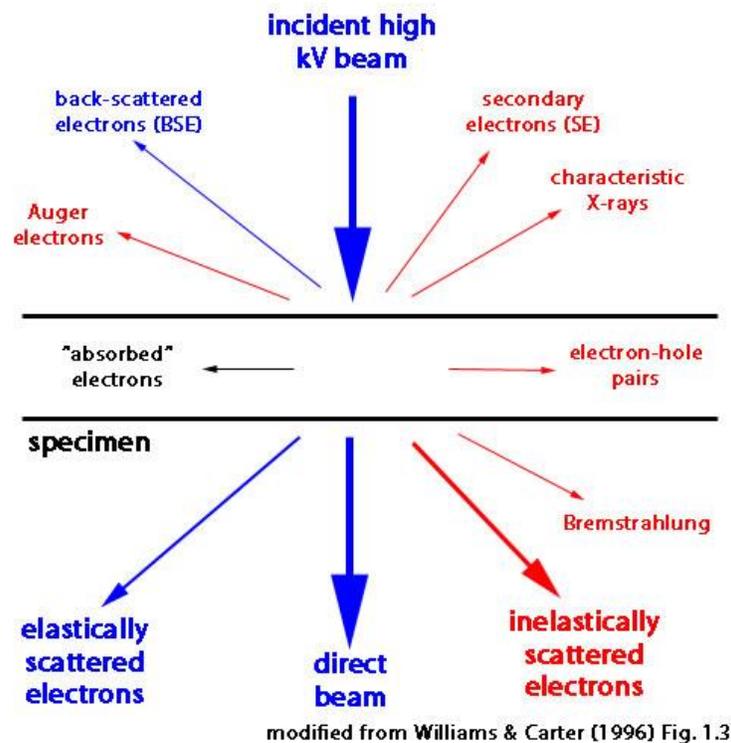


Figura 12. Interacción del haz de electrones con la muestra. Fuente: <http://iubemcenter.indiana.edu/eftem.html>

Estas interacciones de los electrones con la muestra generarán diferentes técnicas de caracterización del material, así como distinta información que es obtenida.

3.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El haz de electrones se puede concentrar en una zona diminuta ($\sim 20 \text{ \AA}$) que puede barrer la superficie del espécimen al ser deflectado por bobinas adecuadas. Lo anterior es el fundamento principal de un microscopio electrónico de barrido, como se muestra en el Figura 13.

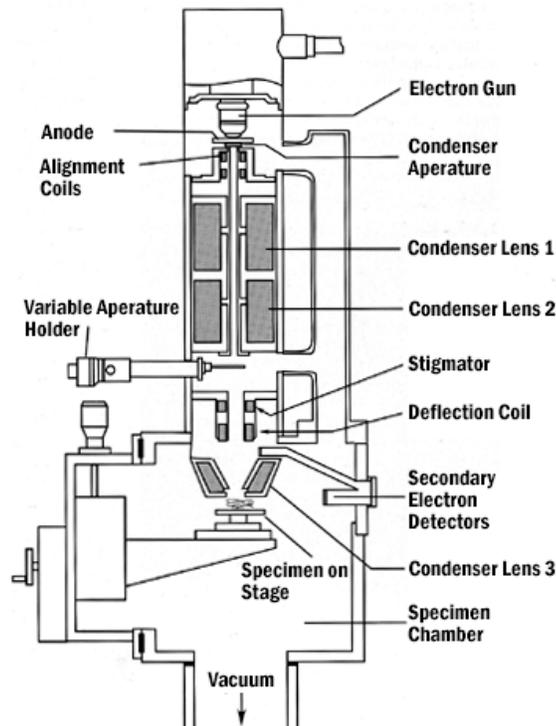


Figura 13. Esquema de microscopio electrónico de barrido (SEM). Fuente: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-13->

Esquema-del-funcionamiento-de-un-microscopio-electronico-de-barrido_fig1_314114976

Los electrones secundarios (se observa que cuando la superficie de un sólido se bombardea con un haz de electrones del orden de varios keV, se emiten de la superficie electrones con energías de menos de 50 eV, los cuales se producen como resultado de interacciones entre los electrones de elevada energía del haz y los electrones de la banda de conducción del sólido lo que da lugar a la expulsión de estos electrones) se detectan por encima del espécimen y la imagen muestra la intensidad de los electrones

secundarios emitidos por las diferentes partes de la muestra. Dado que estos electrones, provenientes de la muestra arriban al detector dependiendo de su posición espacial dan información sobre la morfología de la muestra. Por otra parte, algunos de los electrones pierden su energía; provenientes del haz, pierden su energía, sin embargo, la mayoría experimenta numerosas colisiones y como resultado, son expulsados de la superficie como electrones retrodispersados. Debido a que estas colisiones dependen del tipo de átomo con el que interacciona, estos electrones detectados permiten dar información no sólo sobre la morfología sino también sobre la composición química. [106] Las muestras destinadas al SEM han de cumplir dos condiciones: deben estar secas y ser conductoras. El proceso de secado ha de llevarse a cabo preservando al máximo la estructura original de la muestra, mediante el método clásico de fijación y deshidratación química que finaliza con el secado por punto crítico en nuestras, y es necesario recubrirse después con un material que la haga conductora y permita su observación en el microscopio; para muestras que no lo sean, como muestras biológicas.

3.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión es, de muchas maneras, similar a un microscopio óptico, pero en una estructura invertida, dado que la fuente de electrones es la parte más alta de la columna del microscopio; la fuente o cañón de electrones reemplaza la fuente de luz y se debe mantener a un voltaje alto (100-400 kV). El calentamiento de un filamento de tungsteno es capaz de generar una densidad de corriente del haz de electrones de hasta $5 \times 10^4 \text{ A/m}^2$, mientras que el hexaboruro de lantano, el cual también es una fuente común de electrones para microscopia electrónica, genera, aproximadamente, densidades de $1 \times 10^{10} \text{ A/m}^2$.

Los electrones con elevada energía, generados en el cañón de electrones, son enfocados por un sistema de lentes condensadoras electromagnéticas, dicho enfoque se ajusta al controlar la corriente de las lentes. El portamuestras permite inclinar la muestra, además de ajustar la posición en el eje z (altura de la muestra). Por otro lado, el sistema que genera la imagen también emplea lentes electromagnéticas y al final, la imagen se observa en una pantalla fluorescente; la densidad de corriente de la pantalla se

encuentra entre 10^{-10} a 10^{-11} A/m², sin embargo, puede ser menor cuando se aumenta la magnificación. Asimismo, debido a que el haz de electrones tiene una longitud de camino muy corta en el aire se requiere que el equipo se encuentre al vacío. Un esquema del mismo se muestra en la Figura 14.

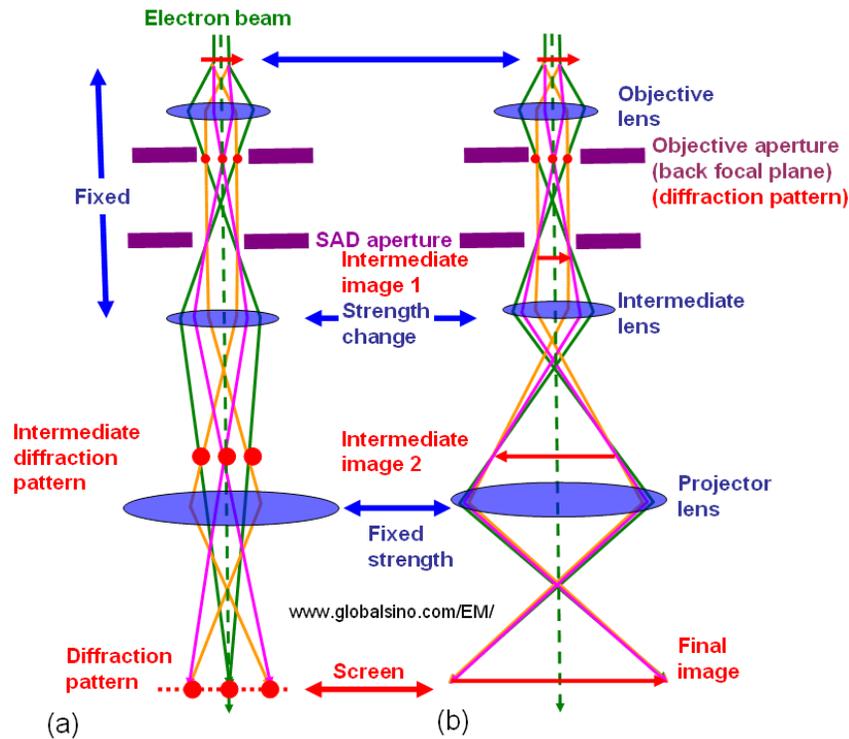


Figura 14. Esquema de microscopio electrónico de transmisión (TEM). Fuente: <http://www.globalsino.com/EM/page3578.html>

a) muestra el esquema para la obtención de un patrón de difracción y b) muestra el esquema de obtención de imágenes de electrones transmitidos o modo normal

El proceso de formación de una imagen de TEM involucra electrones que se transmiten a través de la muestra sobre la que hizo incidir un haz de electrones coherentes. De acuerdo a la interacción que se produzca entre el haz de electrones y la muestra al atravesar ésta, los electrones se pueden clasificar en electrones no desviados, electrones desviados elásticamente y electrones inelásticos [107]. El haz que atraviesa directamente la muestra es detectado formando una proyección bidimensional de ésta (imagen de campo claro), o también se puede detectar el haz difractado (imagen de campo oscuro) [106].

Por su parte la difracción de electrones es una poderosa técnica de caracterización de la estructura de materiales, este permite ver como los electrones son difractados, esto es dependiente de la cristalinidad del material y la composición lo cual permite determinar el tipo de cristalinidad del mismo y gracias a la determinación de la distancia interatómica es también posible determinar la composición.

Como la imagen que se forma en el TEM depende de que los electrones puedan atravesar la muestra, ésta ha de ser suficientemente delgada para permitirlo. Todas las técnicas de preparación, tanto de muestras materiales como biológicas, persiguen el objetivo de adelgazar o conseguir secciones muy finas del espécimen, menores a 100 nm., afectando al mínimo su estructura original.

3.5 Microanálisis por dispersión de energía (EDS)

El proceso de producción del espectro característico, puede esquematizarse del modo siguiente (Fig. 15): El choque de un electrón incidente (procedente del cátodo) con un electrón de las capas internas de un átomo (del elemento al que corresponde el ánodo), produce la expulsión de dicho electrón quedando el átomo en estado excitado; el cual tiende a volver inmediatamente a su estado fundamental, para lo cual se producen saltos de electrones de niveles más externos para cubrir el hueco producido.

En este proceso hay un desprendimiento de energía, igual a la diferencia de energía entre los dos niveles en los que se produce el salto electrónico, en forma de radiación electromagnética correspondiente a la región de los rayos X. Cada señal obtenida después de la absorción y otros efectos sobre la muestra es separada por un detector de Li-Si, amplificada y corregida para dar un análisis cualitativo y cuantitativo de los elementos presentes (solo elementos con número atómico mayor a 11) [106]

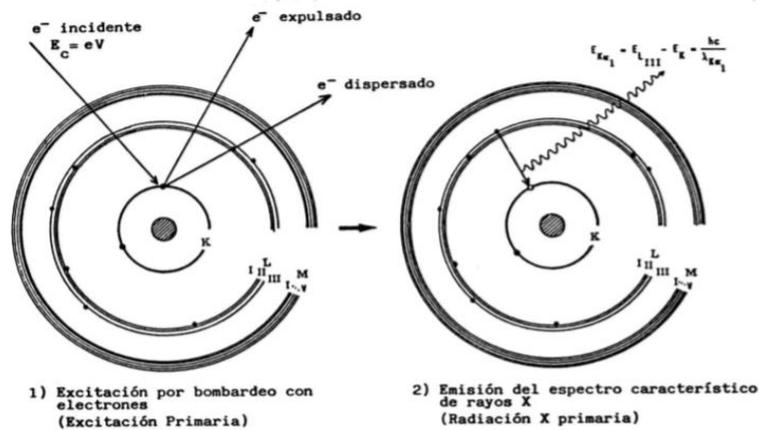


Figura 15. Proceso de generación de un rayo X característico. Fuente: http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/practicas-2/Practicas_de_SEM.pdf

3.6 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La incidencia de un fotón de energía $h\nu$ sobre los átomos situados más superficialmente en la muestra provoca, por efecto fotoeléctrico, la emisión de fotoelectrones (Fig. 16a) con una energía de ligadura:

$$E_B = h\nu - E_K - W$$

donde $h\nu$ es la energía de los fotones, E_K , la energía cinética del fotoelectrón producido, W , la función de trabajo del espectrómetro y E_B , la energía de ligadura (parámetro que identifica al electrón de forma específica, en términos del elemento y nivel atómico). Una vez se ha emitido el fotoelectrón, el átomo se relaja, emitiendo un fotón o un electrón (electrón Auger) (Fig. 16b) [108].

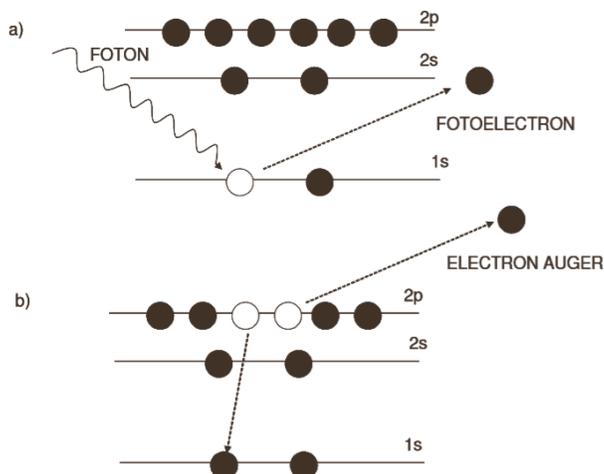


Figura 16. Diagrama del proceso fotoelectrónico. Fuente: www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/articulo_feliu.pdf

La técnica XPS permite el análisis cuantitativo y cualitativo de todos los elementos, excepto el hidrógeno. La energía de ligadura de los picos asociados a la emisión de fotoelectrones está muy bien definida, permitiendo identificar el estado de oxidación de cationes y aniones. Así, átomos no equivalentes del mismo elemento (diferencia en el estado de oxidación, en las moléculas que lo rodean o en la posición en la red) provocan un cambio apreciable (típicamente entre 1-3 eV) en la energía de ligadura llamado "chemical shift". [109]

3.7 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico, permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente, experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente [110].

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν_0 sobre una muestra cuyas características moleculares se desea determinar, y examinar la

luz dispersada por dicha muestra; la mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial, resultado de la interacción de la luz con la materia. Las variaciones de frecuencias observadas en el fenómeno de dispersión Raman son equivalentes a variaciones de energía [110]. En la dispersión el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional superior, el cual abandonará rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón, la frecuencia a la cual es liberado dependerá del salto energético realizado por la molécula. Pueden distinguirse los siguientes casos [111], ejemplificados en la Figura 17:

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico, la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque, siendo esta la dispersión Rayleigh.
- Si el resultado de la interacción es un fotón dispersado a una frecuencia distinta de la incidente, se dice que el choque es inelástico, por tanto existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón; en este caso pueden darse dos fenómenos:
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía, vuelve a uno mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la dispersión Raman Stokes.
 - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce una dispersión Raman anti-Stokes.

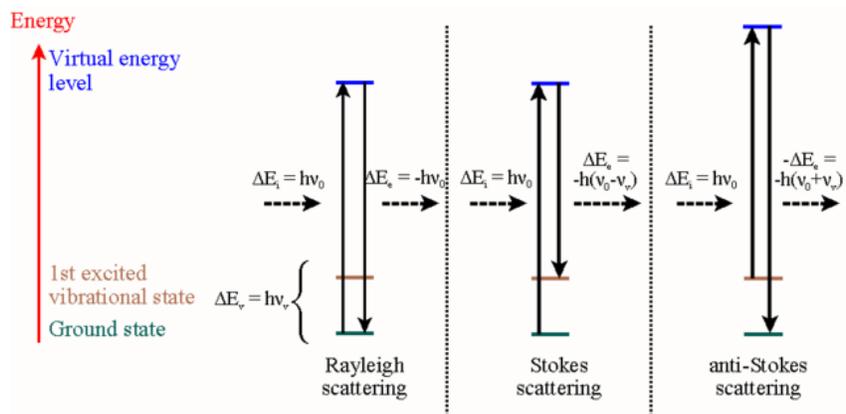


Figura 17. Esquematación de la dispersión Rayleigh y dispersión Raman. Fuente:

https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_Raman

Cada material tendrá un conjunto de valores ν_r característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado u al que se produce. El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, que se expresa en cm^{-1} como se muestra en la siguiente ecuación:

$$u = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda}$$



CAPÍTULO CUATRO

Materiales y Métodos



4.1 Materiales

El nitrato de plata (AgNO_3) y el ácido tetracloroaurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich Chemicals, del mismo modo que el Dioctil Sulfosuccinato de Sodio (SDS) y fueron usados como se recibieron. Los solventes como metanol e isopropanol, ambos en grado reactivo, fueron obtenidos de Fermont Company y se usaron sin ninguna purificación. El agua desionizada fue empleada en todos los pasos de las síntesis.

4.2 Preparación de Extractos de *A. californica*

Las hojas de *A. californica* fueron obtenidas de Ensenada, México. Para el proceso de extracción, fueron secadas a temperatura ambiente, posteriormente fraccionadas con el objetivo de promover el incremento de la superficie de contacto, acto seguido se lavaron con agua desionizada para limpiarlas. El extracto acuoso de *A. californica* fue preparado mezclando la biomasa en agua desionizada a punto de ebullición (5% p/v) por dos minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a 20°C y filtrado para remover la biomasa. La misma metodología fue ocupada para preparar los extractos con metanol e isopropanol, los cuales, como se describirá más adelante, fueron ocupados para la síntesis de nanopartículas de oro y plata.

Para la síntesis de óxido de grafeno el extracto acuoso fue realizado con una proporción 2% p/v, y para la funcionalización del óxido de grafeno el extracto base isopropanol se realizó a una proporción 1% p/v de hojas de *A. californica*, siguiendo la metodología antes mencionada.

4.3 Síntesis de nanopartículas de plata y oro

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas variando el tipo de solvente (agua, metanol e isopropanol) de la manera siguiente: 1mL de extracto de *A. californica* respectivamente fue añadido a 5mL de una solución acuosa 10^{-3} M de nitrato de plata (preparada con anterioridad), y el volumen fue finalmente ajustado a 20mL añadiendo agua desionizada. Tras 24 hrs de reacción las nanopartículas fueron caracterizadas.

La misma metodología fue utilizada para la síntesis de nanopartículas de oro a partir de una solución 10^{-3} M de HAuCl_4 , aforando a 10mL con agua desionizada.

4.4 Síntesis de Oxido de Grafeno

Para la síntesis de óxido de grafeno, se mezcla el extracto acuoso de *A. californica* realizado a una concentración (2% p/v), al cual se le añade 0.1mg de grafito por mililitro y 0.5mg por mililitro de Dioctil sulfosuccinato de sodio (surfactante); una vez mezclados se someten a tres tiempos de exfoliación de 20 min con intervalos de reposo de 10 min (Licuadora Osterizer 6662 con motor de 450 WAT). Terminada la síntesis se filtra al vacío utilizando un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 1.2 micrómetros. El filtrado se desecha y lo recuperado se resuspende en agua desionizada al 80% del volumen original.

4.5 Síntesis de nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG

Los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG son sintetizados mezclando 20 mL de una solución acuosa 10^{-3} M de la sal precursora, AgNO_3 o HAuCl_4 , respectivamente, 80 mL de óxido de grafeno sintetizado anteriormente, y 10mL de extracto isopropanoico de *A californica* (1%), el mismo se deja en agitación por 24hrs. Terminada la agitación, se mantiene como solución coloidal, o se filtra al vacío ocupando un filtro de nitrocelulosa de 1.2 micrómetros.

4.6 Síntesis de nano/microestructuras híbridas de AgNPs/GP y AuNPs/GP

Los granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* fueron recolectados en Toluca, Estado de México, México, de productores locales. Para la síntesis de las nano/microestructuras híbridas, fueron tomados 10mg de granos de polen recién colectados y mezclados en 2 ml de una solución 0.1M de AgNO₃, mantenidos en agitación magnética durante cuatro horas. Posteriormente la solución fue filtrada al vacío ocupando un filtro de nitrocelulosa de 1.2 micrómetros, las nano/microestructuras fueron recuperados y calcinados a 180°C durante 12 hrs. Acto seguido las nano/microestructuras híbridas AgNPs/GP fueron recuperadas y caracterizadas.

La misma metodología fue utilizada para la síntesis de AuNPs/PG, ocupando una solución 0.01M de H₂AuCl₄.

4.7 Análisis mediante espectroscopía UV-visible

Los análisis por espectroscopía UV-visible de las nanopartículas biogénicas de oro y plata, así como de los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG se realizaron usando un espectrómetro Varian Cary-5000 UV/Vis/NIR operado a una resolución de 1nm. Los espectros fueron colectados con una ventana de adquisición de 300 nm a 800 nm de longitud de onda al inicio de la síntesis y a 24 horas de tiempo de reacción.

4.8 Microscopía electrónica de Barrido y análisis EDS acoplado

Tras 24 horas de reacción para cada síntesis de óxido de grafeno, de los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG, fueron filtrados al vacío usando un filtro de nitrocelulosa de 1.2 micrómetros, y secado a temperatura ambiente, las películas resultantes fueron montadas sobre un trozo de silicio orientado para su análisis. Por su parte las nano/microestructuras híbridas tras la calcinación fueron montadas sobre cinta de cobre para su análisis por microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de energía (EDS) acoplado. Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6510LV, con un voltaje de aceleración de 1 a 30 kV, que cuenta con detectores de electrones

secundarios y retrodispersos, en modalidad de alto vacío y tiene resolución máxima de 5nm en modalidad de alto vacío y con electrones secundarios. Así mismo el microscopio tiene acoplado a detector de rayos X, para hacer análisis químico por medio de Dispersión de Energía (EDS) marca BRUKER, con resolución de 137 eV y un detector de rayos X para el mismo análisis (EDS) marca

4.9 Microscopía electrónica de Transmisión

Tras 24 horas de reacción para cada síntesis, las nanopartículas y los nanocompositos fueron mezclados con agua desionizada a una proporción 1:1. Cinco microlitros de cada muestra fueron puestos en una rejilla de cobre (SPI-supplies) previamente dotada por una capa fina de Formvar y recubierta con grafito mediante la deposición con un Sputtering DENTON a 30 mTorr de presión. Tras permitir el secado por completo, las muestras fueron analizadas con un microscopio de transmisión (TEM) JEOL-2100 operado con una aceleración de voltaje de 200 kV y equipado con dos detectores para STEM, de campo claro (BF-detector) y anular de campo oscuro (ADF-detector). Las micrografías TEM, HRTEM, SAED y STEM-ADF fueron analizadas usando el software Gatan DigitalMicrograph™ y el software ImageJ en orden para determinar el tamaño de partícula. Para los análisis realizados con HRTEM y SAED, los datos experimentales fueron indexados en base a la carta JCPDS No. 0-004-0783 para plata y No. 00-004-0784 para oro con estructura FCC. En orden a determinar la polidispersidad de las nanopartículas más de 500 nanopartículas fueron consideradas para medición en cada muestra.

4.10 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Para la caracterización del óxido de grafeno sintetizado, el mismo, previamente filtrado al vacío y secado, fue depositado en cinta carbón y analizado mediante un espectrómetro fotoelectrónico de Rayos X JEOL JPS-9200, el cual cuenta con una fuente estándar de Aluminio y Magnesio, y una fuente monocromática de Aluminio.

4.11 Análisis de Fluorescencia mediante microscopía confocal

Las nano/microestructuras híbridas AgNPs/GP y AuNPs/GP fueron analizadas en sus propiedades de fluorescencia utilizando un microscopio confocal modelo TCS SPE / CTR 4000, marca LEICA, dotado de una lámpara de mercurio para análisis por fluorescencia y objetivos 10X y de inmersión (40X y 63X).

4.12 Preparación de sustratos SERS para mediciones SERS

La molécula de azul de metileno fue usada como molécula señal para las pruebas SERS. Los sustratos SERS basados en nanopartículas de oro y plata fueron preparados de la siguiente manera; cada suspensión de las síntesis mencionadas fueron depositados en portaobjetos, depositando una gota de 10 microlitros y permitiendo la evaporación, proceso repetido hasta completar 200 microlitros; subsecuentemente, las muestras fueron sometidas a un gradiente de temperatura en orden a remover la materia orgánica, la rampa comprende dejar las muestras por 20 min a 100°C, 200°C, 300°C y 400°C, finalmente se mantuvieron a 500°C por una hora. Acto seguido, gotas de 10 microlitros de una solución acuosa de azul de metileno (0.012% p/v) fue añadido a las muestras permitiendo que se evapore hasta completar 150 microlitros.

Para la preparación de los sustratos SERS basados en los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG un total de 200 microlitros fueron depositados sobre un portaobjetos respectivamente, a partir de gotas de 10 microlitros; posteriormente se añadieron 50 microlitros de una solución acuosa de azul de metileno (previamente reportada). Por último, para la preparación de los sustratos basados en las nano/microestructuras híbridas, las mismas fueron depositadas en un portaobjetos, y acto seguido se depositaron 50 microlitros de azul de metileno bajo la metodología ya mostrada.

Los análisis SERS para las nanopartículas de plata y oro, y para las nano/microestructuras híbridas se ocupó un espectrómetro Raman HR-800 LabRam (Jobin Yvon Horiba) usando un láser de excitación de He-Ne ($\lambda=632,8$ nm) para excitar los modos vibracionales del azul de metileno; el poder del láser es de

5 μW . Todos los espectros Raman fueron tomados en un promedio de 10 acumulaciones de 60 segundos cada una, monitoreando una ventana de 400 a 2000 cm^{-1} para todas las muestras.

El análisis Raman para la síntesis de óxido de grafeno y para el análisis SERS de los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG fueron realizados con un espectrómetro InVía MICRORAMAN: RENISHAW, Equipado con láseres de longitud de onda de 514 nm y 633 nm, filtros holográficos Notch o filtros dieléctricos y un fotodetector para medir la luz dispersada.

4.13 Análisis estadísticos

Análisis de varianza (ANOVA) fueron realizados sobre los datos obtenidos mediante el software OriginPro 8. Así mismo, la significancia fue calculada mediante pruebas Tukey's HSD (Honesty Significant Difference) post hoc. Los intervalos de confianza para todos los análisis fueron determinados en 0.95.



CAPÍTULO CINCO

Resultados y Discusión



5.1 Síntesis, caracterización y evaluación de propiedades SERS de nanopartículas biogénicas de plata y oro

La obtención de AgNPs y AuNPs mediante la síntesis biogénica descrita fue corroborada mediante espectroscopía UV-vis, analizando las características de la banda de plasmón superficial atribuida a la presencia de nanopartículas metálicas, hecho que evidencia su formación. Como se mencionó anteriormente, la posición de la banda de absorción depende en su mayoría del tamaño y la forma de las nanopartículas [112], así como del medio en el que se encuentran [113], por esta razón las mediciones realizadas mediante UV-vis son comúnmente utilizadas para la caracterización de nanopartículas metálicas en una dispersión coloidal [114].

Los espectros UV-vis para las nanopartículas biogénicas sintetizadas bajo las diferentes condiciones experimentales descritas en el capítulo anterior, fueron obtenidos al inicio del proceso de síntesis y 24 horas después, como evidencia de formación de las nanopartículas. Las nanopartículas de plata obtenidas utilizando el extracto de *A. californica* exhiben una banda de absorción plasmónica en la región visible localizada entre 350 y 500 nm de longitud de onda [42] (Fig.18-A). En el caso de las AgNPs sintetizadas con extracto base metanol y con extracto base isopropanol, se observó que la forma del espectro de absorción, mostrando diversos picos de absorción, puede ser indicativo de una morfología poliédrica, como ha sido reportado con anterioridad [115]. Por su parte, se observó que las AuNPs

exhiben una banda de absorción plasmónica entre 530 y 560 nm de longitud de onda (Fig. 18-B). En específico las nanopartículas de oro sintetizadas en con extracto base agua, metanol e isopropanol indican la presencia de nanopartículas de oro con morfologías poliédricas y triangulares [116].

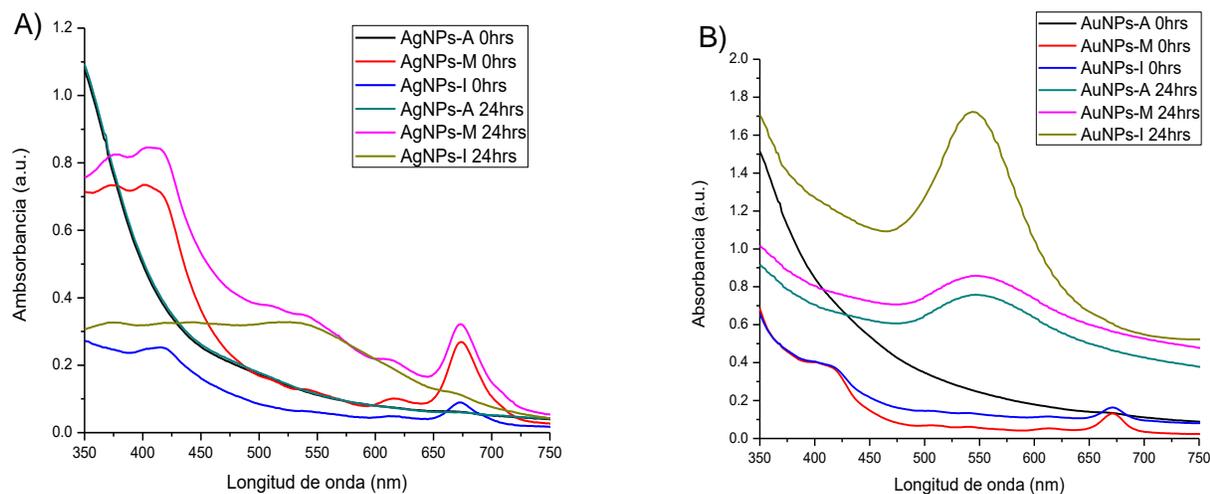


Figura 18. Espectros UV-Vis de nanopartículas de plata (A) y nanopartículas de oro (B) sintetizadas con extracto de *A. californica* utilizando agua (A), metanol (M) e isopropanol (I) como solventes. Las mediciones están reportadas al inicio de la síntesis y a las 24 hrs de reacción.

En el caso específico de las nanoestructuras de plata sintetizadas mediante extracto acuoso, el espectro UV-vis exhibe una banda de absorción plasmónica más relajada y distendida, efecto que se atribuye a la gran polidispersidad provocada por la formación de nanoestructuras con diferentes morfologías y tamaños. Por su parte dos morfologías fueron obtenidas en la síntesis de AuNPs, nanopartículas poliédricas y partículas planas como triángulos, con extracto acuoso y base metanol, sin embargo, solamente nanopartículas poliédricas fueron obtenidas con extracto base isopropanol. La presencia de partículas con geometría plana generan al igual que la presencia de nanoestructuras en la plata una banda de absorción plasmónica más relajada como se muestra en los espectros correspondientes a las AuNPs sintetizadas con extracto acuoso y base metanol en contraste con la banda de absorción de las nanopartículas sintetizadas con extracto base isopropanol.

Diferentes morfologías fueron obtenidas usando diferentes solventes, en la síntesis de AgNPs, morfologías como: flores, icosaedros, rodillos, e inukshuks (Fig. 19); las cuales fueron producidas utilizando un extracto acuoso de *A. californica*, en contraste con solo las nanopartículas poliédricas de plata obtenidas con las remanentes síntesis.

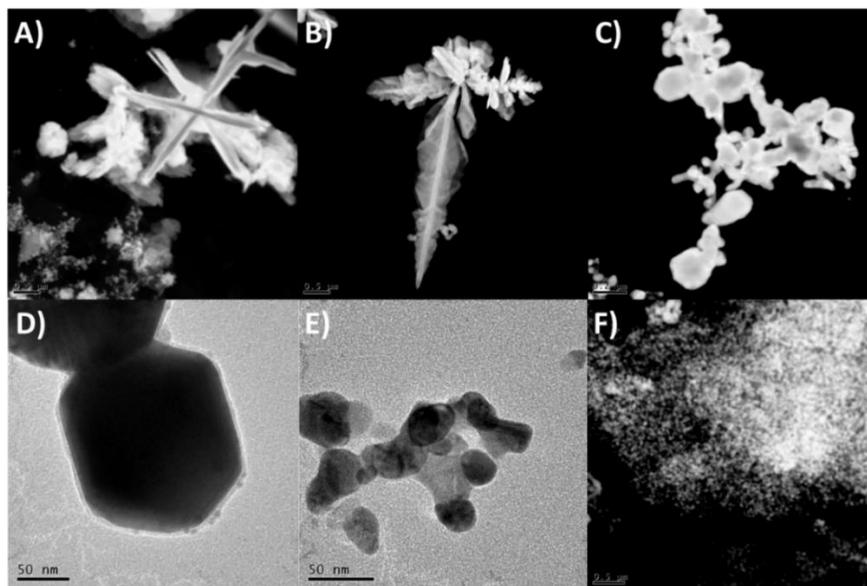


Figura 19. Nanoestructuras de plata obtenidas con extracto acuoso de *A. californica*: A) rodillos (STEM ADF), B) inukshuks (STEM ADF), C) flores (STEM ADF), D) icosaedros (TEM), E) esferas (TEM) y F) aglomerados de partículas (STEM ADF)

Las diferencias morfológicas determinadas en la producción de nanopartículas de plata y oro mediante la reducción promovida por el extracto de *A. californica* puede atribuirse a la distinta polaridad de los solventes, de este modo distintas polaridades en la realización del extracto inducen que diferentes compuestos y en diferentes proporciones de las hojas de la planta sean extraídos, lo cual produce las diferencias significativas en las morfologías obtenidas.

Las AgNPs sintetizadas con extracto acuoso presentan tamaños de 70.53 ± 20.76 nm en promedio con distancias planares 2.38 ± 0.05 Å comparado con 2.359 Å para el plano cristalográfico (111) y 2.03 ± 0.02 Å con respecto a 2.044 Å para (200). Para las AgNPs sintetizadas con extracto base metanol su tamaño es de 21.31 ± 13.96 nm en promedio con distancias planares 2.387 ± 0.05 Å comparado con 2.359 Å para

el plano cristalográfico (111) y $2.06 \pm 0.02 \text{ \AA}$ con respecto a 2.044 \AA para (200). Con respecto a AgNPs sintetizadas con extracto base isopropanol, se encuentran en promedio en $29.91 \pm 12.45 \text{ nm}$, mostrando distancias planares $2.38 \pm 0.05 \text{ \AA}$ para el plano (111) (Fig. 20-A-D-G). Los patrones SAED (Fig. 20-C-F-I) sugieren claramente la naturaleza policristalina de las muestras; en este sentido los planos cristalográficos mostrados en las micrografías HRTEM (Fig. 20-B-H-E) tienen un espaciamiento ya reportado, e indexado como (111) y (200) asociados a la estructura FCC de la plata.

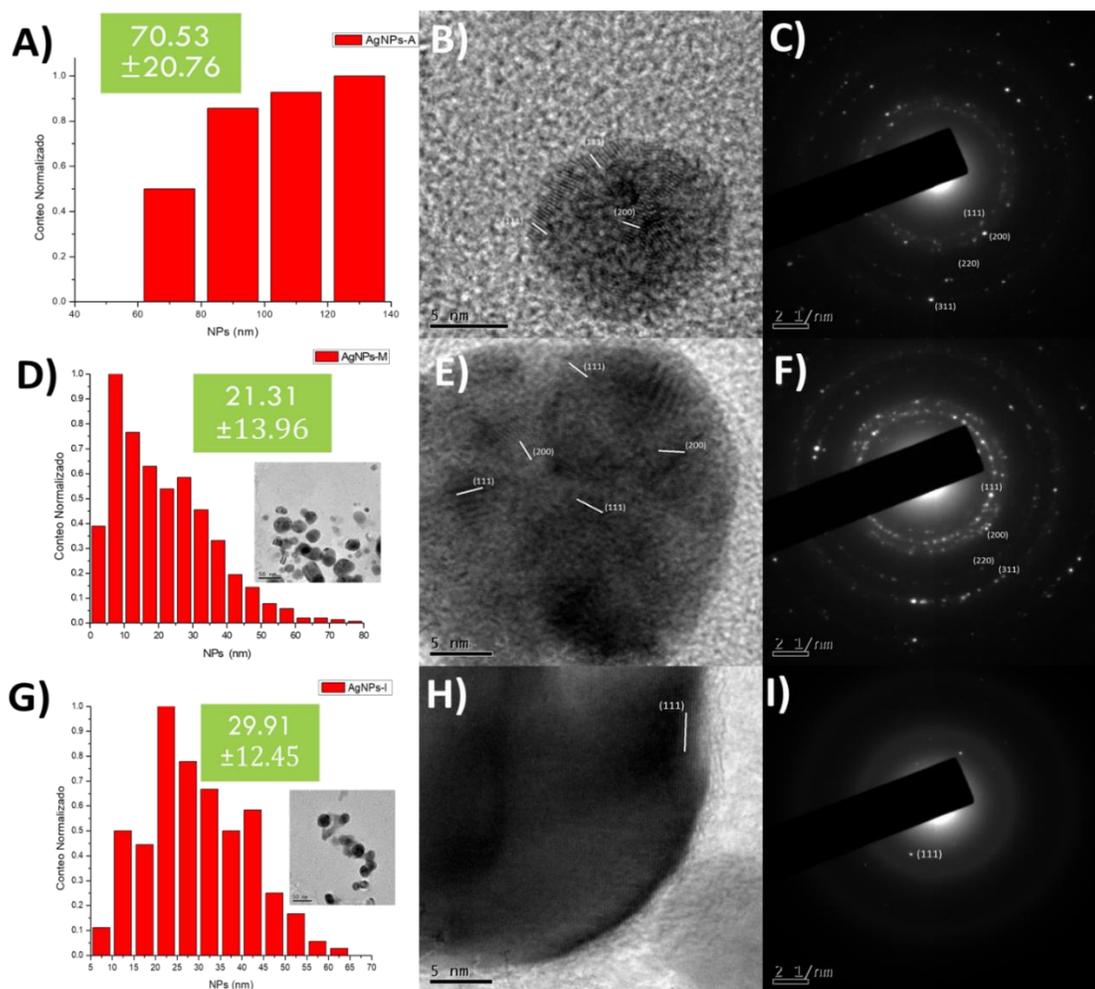


Figura 20. A) Dispersidad de nanopartículas poliédricas de plata obtenidas con extracto acuoso de *A. californica*, B) micrografía de HRTEM y C) Patrón SAED. D) Polidispersidad de nanopartículas biogénicas base metanol, E) micrografía HRTEM y F) Patrón SAED. G) nanopartículas biogénicas de plata sintetizadas con extracto base isopropanol, H) HRTEM y I) patrón SAED.

Por su parte las AuNPs poliédricas (Fig. 21-A) obtenidas mediante extracto acuoso se encuentran en promedio entre los 10 y los 180 nm, siendo 40 nm el rango más abundante de nanopartículas, por otra parte, las nanopartículas planas (Fig. 21-B) se encuentran en menor abundancia en un rango de 5 a 100 nm y en un rango de 200 a 250 nm, la distancia planar es de $2.46 \pm 0.003 \text{ \AA}$ comparado con 2.355 \AA para el plano cristalográfico (111).

Las AuNPs (Fig. 21-C) sintetizadas con extracto base metanol se encuentra en un rango de 2nm a 140nm, con un rango de mayor abundancia entre 10-20nm, las nanopartículas triangulares (Fig. 21-D) se encuentran situadas en un rango de 5nm a 30 nm y en menos cantidad de entre 40nm a 120nm; estas partículas tienen distancias planares alrededor de $2.21 \pm 0.01 \text{ \AA}$ para (111), y $2.11 \pm 0.04 \text{ \AA}$ para (200) respectivamente. Las nanopartículas poliédricas (Fig. 21-E) de oro sintetizadas con extracto base isopropanol exhiben tamaños ubicados entre los 2nm a los 130nm, mostrando un rango de mayor abundancia de 2-10nm, las mismas tienen distancias interatómicas alrededor de $2.387 \pm 0.05 \text{ \AA}$ y $2.06 \pm 0.02 \text{ \AA}$ para los planos (111) y (200) respectivamente.

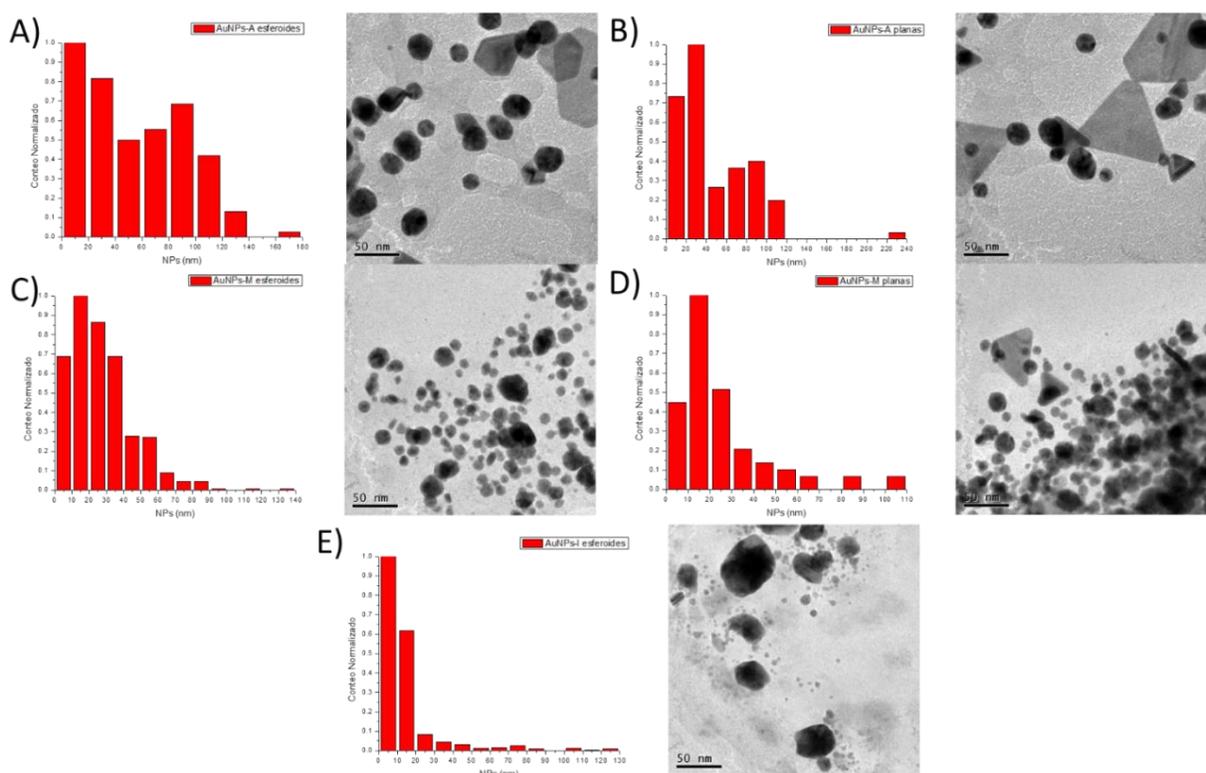


Figura 21. A) Dispersidad de nanopartículas poliédricas de oro obtenidas con extracto acuoso de *A. californica*, B) nanopartículas planas. C) Polidispersidad de nanopartículas biogénicas base metanol y D) nanopartículas planas. E) nanopartículas sintetizadas con extracto base isopropanol.

Los aros de difracción (Fig. 22-C-F-I) y las distancias interatómicas mostradas en las micrografías HRTEM (Fig. 22-A-B-D-E-G-H), tienen un espaciamiento ya reportado e indexado como planos (111) y (200) asociados a la estructura FCC del oro. Las grandes diferencias entre las distancias planares obtenidas y las reportadas son atribuidas a fallos paralelos de la superficie (111) característico de las partículas planas [117].

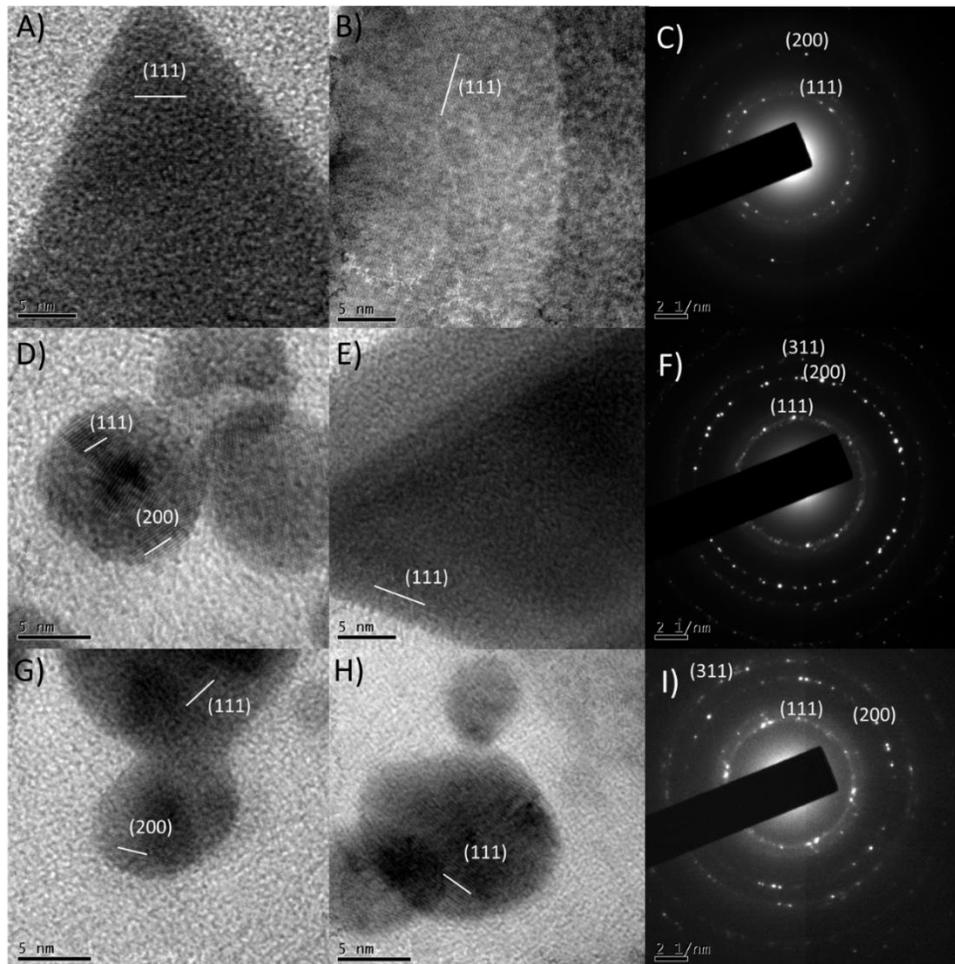


Figura 22. A) B) Micrografía HRTEM de nanopartículas de oro obtenidas con extracto acuoso de *A. californica* y C) Patrón SAED. D) E) HRTEM de nanopartículas biogénicas base metanol, F) Patrón SAED. G) Micrografías HRTEM de nanopartículas biogénicas de oro sintetizadas con extracto base isopropanol y I) patrón SAED.

Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas en el tamaño de las AgNPs obtenidas (considerando solo las nanopartículas poliédricas), dependiente del tipo de solvente usado para la preparación del extracto ($p < 0.05$). Por su parte, las nanopartículas de oro sintetizadas manifiestan diferencias significativas en relación al tamaño de las mismas (para partículas poliédricas y partículas planas, tratadas por separado) dependiendo del tipo de solvente utilizado para la preparación de extracto ($p < 0.05$). Tales diferencias son atribuidas a la distinta polaridad de los solventes, lo cual influye en la distinta extracción de los compuestos de la planta, compuestos como Metileugenol, timol, piperitona, timol metil éter, R-pineno, 1,8-cineola, metilcavicol y p-cimeno que han sido reportados en extractos de *A. californica* [58].

Es conocido que partículas ansiotrópicas exhiben grandes resultados en mediciones SERS debido a la gran cantidad de esquinas y vértices, los cuales permiten una mayor amplificación de intensidad [118]; por tal motivo partículas no esféricas obtenidas mediante biosíntesis son consideradas con un gran potencial para promover el efecto SERS. En base a ello, se realizó la evaluación de las nanopartículas de oro y plata sintetizadas mediante extracto de *A. californica*, para la aplicación SERS, usando azul de metileno como molécula señal. Los resultados mostraron que AgNPs y AuNPs sintetizadas mediante diferentes extractos de *A. californica* tienen la capacidad de amplificar la señal Raman generada. (Fig. 23). En este sentido el tratamiento térmico previo al cual se sometieron las nanopartículas asegura la remoción de todo contenido orgánico, mostrando que la amplificación de la señal Raman del azul de metileno no puede ser atribuida a ninguna molécula orgánica utilizada en la síntesis de las mismas.

Tomando como referencia la línea base de cada espectro, se muestra que la amplificación de la señal por las nanopartículas de plata sintetizadas base metanol, es de 2.5 veces, mientras que las AgNPs base isopropanol es de 1.75 veces la señal de azul de metileno; por su parte AgNPs sintetizadas por extracto acuoso incrementan la señal en 32.5 veces. En el caso de AuNPs sintetizadas con extracto acuoso es de 3.77 veces, para las mismas sintetizadas con extracto base metanol es de 6.66 veces y para las sintetizadas por extracto base isopropanol es de 1.6 veces la señal del azul de metileno. De

este modo se muestra como partículas anisotrópicas como los nanoinukshuks incrementan la señal de manera considerable, del mismo modo nanopartículas planas como los nanotriángulos de oro realizan una amplificación superior a nanopartículas poliédricas. (Fig. 23)

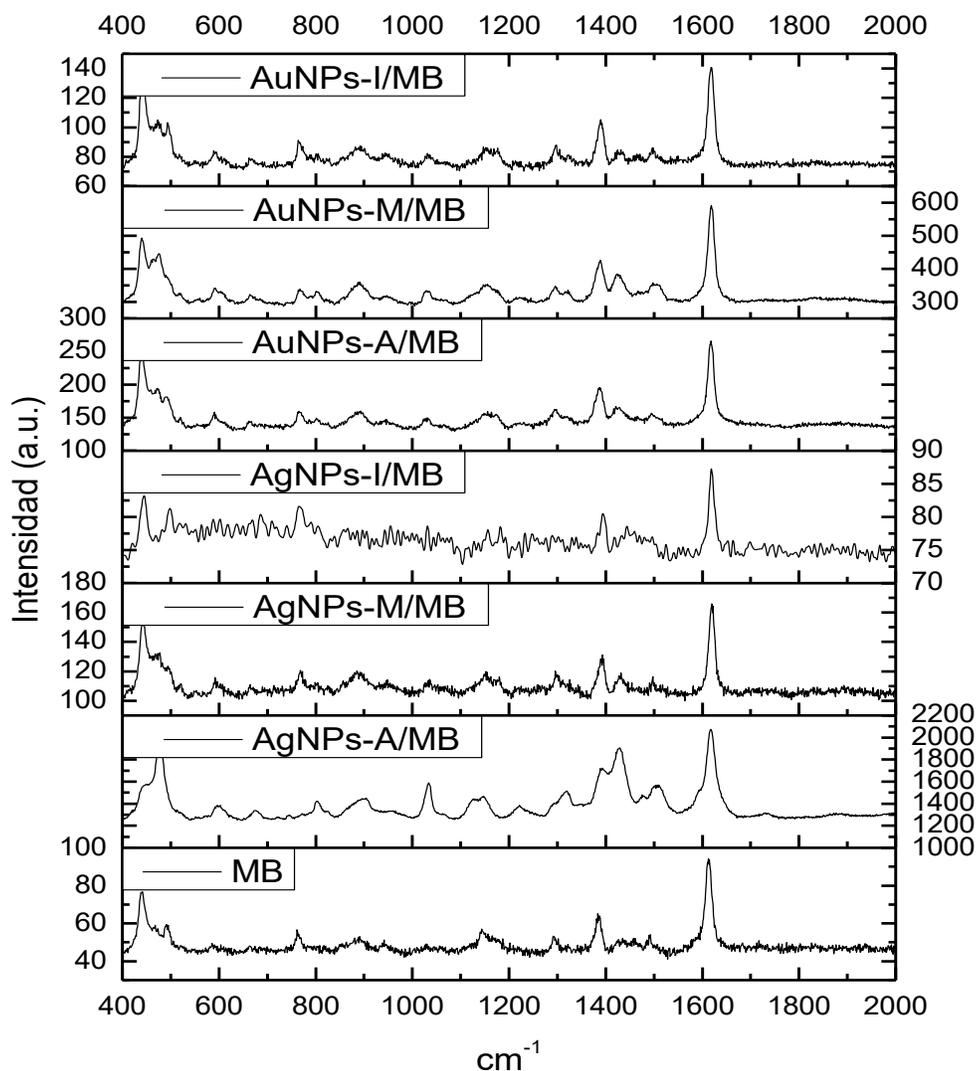


Figura 23. Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB+AgNPs sintetizadas con extracto acuoso, MB+AgNPs sintetizadas con extracto base metanol, MB+AgNPs sintetizadas con extracto base isopropanol, MB+AuNPs sintetizadas con extracto acuoso, MB+AuNPs sintetizadas con extracto base metanol y MB+AuNPs sintetizadas con extracto base isopropanol

El pico situado en 442 cm^{-1} con un hombro en 491 cm^{-1} , como puede verse en la Figura 23, corresponden a la vibración de deformación esquelética de C-N-C y C-S-C respectivamente [119] [121]. El enlace fuera de plano C-H genera el pico en 674 cm^{-1} [120] [121] (no generado en el espectro del azul de metileno, pero si en las ampliaciones), en 761 cm^{-1} se genera por las deformaciones esqueléticas C-N-C y C-S-C así como N-CH₃ [121]. El pico que aparece en 1029 cm^{-1} corresponde al enlace C-H en plano y el pico 1143 cm^{-1} puede atribuirse tanto al enlace fuera de plano C-H [121] o por la extensión C-N [121]. El pico 1385 cm^{-1} corresponde a la deformación en plano del anillo C-H [120]. Los picos a 1492 cm^{-1} y 1612 cm^{-1} son producidos por la deformación esquelética asimétrica de C-C-C [123] y la extensión del anillo C-C [120] [123], respectivamente. Por otra parte, otros picos fueron encontrados en otros espectros del azul de metileno con distintas nanopartículas biogénicas, pero que no fueron encontrados en el espectro de sólo el azul de metileno, estos son los picos 1428 cm^{-1} correspondiente a la extensión asimétrica C-N [123] y 603 cm^{-1} a la deformación esquelética de C-N-C [120] [121], Un resumen de los picos observados es presentado en la Tabla 1.

Tabla 1. Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman. Abreviaciones: α , deformación del anillo en plano; β , flexión en plano; γ , flexión fuera de plano; δ , deformación esquelética; y u, extensión. ¹[119], ²[120], ³[121], ⁴[122], ⁵[123]

MB	AgNPs-A + MB	AgNPs- M + MB	AgNPs-I + MB	AuNPs-A + MB	AuNPs- M + MB	AuNPs-I + MB	Referencia	Asignación de banda
442	453	440	440	439	439	440	480 ¹ 445 ² 449 ³	δ (C-N-C) δ (C-N-C) δ (C-S-C)
491	-	494	494	490	477	494	497 ² 502 ³	δ (C-N-C)
-	603	592	-	591	589	592	613 ¹	δ (C-N-C)
-	674	664	-	664	664	666	677 ² 688 ³	γ (C-H)

761	772	768	-	765	766	463	769 ³	$\delta(\text{C-N-C}), \delta(\text{C-S-C}), \nu(\text{N-CH}_3)$
1029	1033	-	-	1031	1029	1032	1032 ¹ 1036 ² 1003 ³	$\beta(\text{C-H})$
1143	1147	1153	1155	1156	1152	1152	1123 ¹ 1181 ²	$\gamma(\text{C-H}) \nu(\text{C-N})$
1385	1392	1392	1396	1386	1388	1391	1396 ²	$\alpha(\text{C-H})$
-	1428	1431	1416	1423	1426	1429	1413 ⁴	$\nu_{\text{asym}}(\text{C-N})$
1492	1498	1498	-	1495	1497	1499	1512 ⁵	$\delta_{\text{asym}}(\text{C-C-C})$
1612	1617	1619	1617	1616	1616	1616	1618 ² 1617 ⁴	$\nu(\text{C-C})$ ring

5.2 Síntesis y caracterización y evaluación de propiedades SERS de Óxido de grafeno y nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG

Durante la última década se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los grafenos químicamente modificados. Estos se llevan a cabo a partir de la exfoliación química de óxidos de grafito o de grafito, como en el presente trabajo, dando lugar a lo que se conoce como óxido de grafeno (OG). A diferencia del grafeno convencional, el óxido de grafeno posee en su superficie grupos funcionales con oxígeno, que permiten a este ser funcionalizado por diferentes grupos químicos. [124] El grafeno obtenido mediante exfoliación a partir del grafito en presencia de surfactante, fue por primera vez sintetizado por Lotya y cols. en 2008, en la cual el surfactante actúa como un estabilizador rodeando a la estructura 2D permitiendo su estabilidad [72]. Sin embargo, la introducción en la síntesis de un extracto de *A. californica* permite no solo la estabilización del sistema por una barrera física, sino que la introducción de moléculas oxidantes como los polifenoles contenidos, permiten la producción de óxido de grafeno en lugar de la producción de grafeno, así mismo promueven la estabilidad y la solubilidad del sistema como lo reporta Wang y colaboradores en 2011 [75].

De manera tradicional la síntesis de óxido de grafeno es comprobada mediante espectroscopía Raman, gracias al espectro característico del Óxido de grafeno, en el que resaltan dos picos característicos (Fig. 24); la banda D que corresponde a defectos inducidos en plano del modo A_{1g} que representa la región defectiva de la hibridación sp^3 del carbono, mientras que la banda G es atribuida al modo vibracional E_{2g} de los orbitales sp^2 y sus dominios, dichos picos se encuentran situados en 1333 cm^{-1} y 1583 cm^{-1} , respectivamente [73].

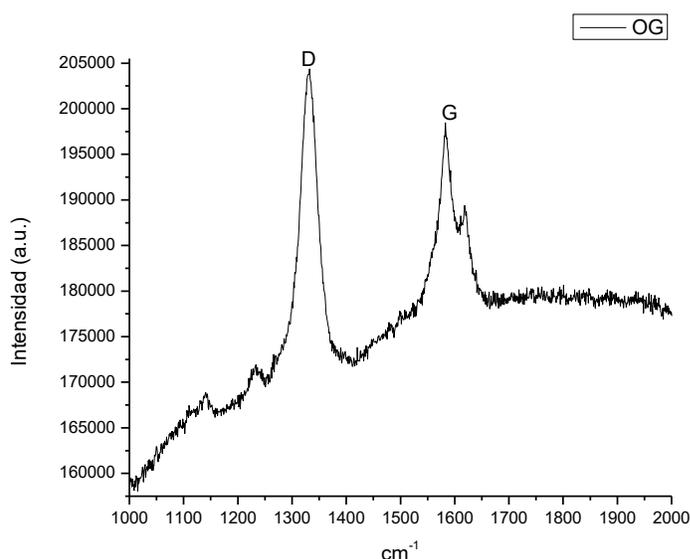


Figura 24. Espectro Raman del Óxido de grafeno sintetizado

Si bien mediante espectroscopía Raman se obtiene información sobre la composición química del óxido de grafeno, no es sino con espectroscopía de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS), la técnica mediante la cual es posible determinar la composición exacta de la muestra y determinar el grado de oxidación en la que se encuentran los elementos, en este sentido, el análisis de XPS muestra dos picos en la región $C1s$ y $O1s$ (Fig. 25-A) que muestran una composición de 62% C y 38% O que, mediante un proceso de deconvolución, fue posible determinar que la muestra contiene hibridaciones sp^2 y sp^3 para el enlace C-C, concluido de los picos en 284.08 eV y 285.01 eV respectivamente. Así mismo se describe la energía de enlace para C-O y C=O en 286.65 eV y 287.90 eV [125] respectivamente (Fig. 25-B), lo cual muestra que el analito es óxido de grafeno. De igual forma se demuestra por el análisis mediante

deconvolución del pico O1s (Fig. 25-C). que da información sobre enlaces C-OH, O-C, O=C con una energía de enlace en 531.4 eV, 532.6 eV y 533.3 eV respectivamente [125] [126].

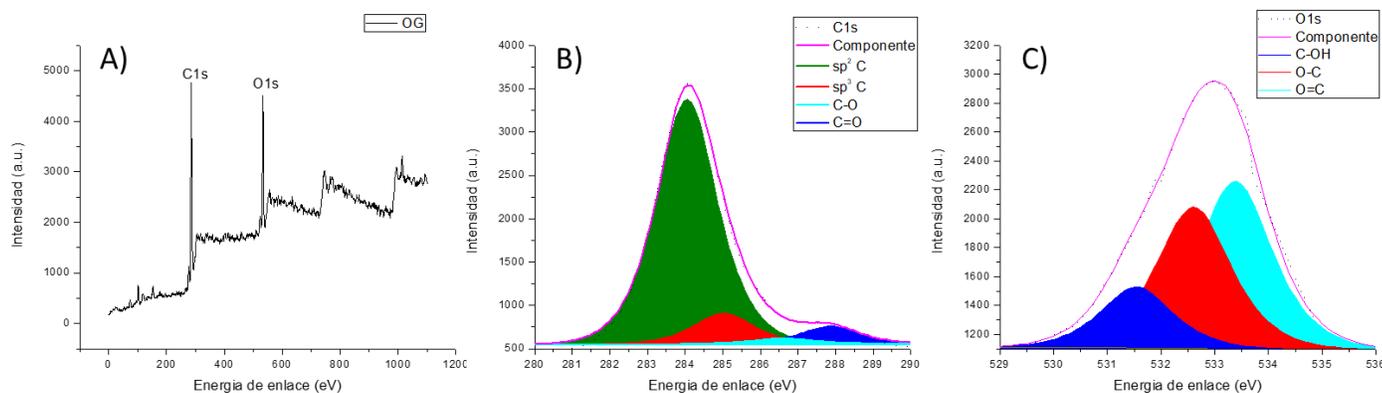


Figura 25. A) Espectro XPS del óxido de grafeno sintetizado, B) deconvoluciones del pico C1s y C) del pico correspondiente O1s.

El análisis morfológico mediante microscopía electrónica de transmisión muestra la evidencia de la exfoliación del grafito realizada mediante la síntesis, lo que lleva a la formación de óxido de grafeno, gracias al número limitado de capas de átomos (Fig. 26-A). Así mismo, las micrografías de HRTEM (Fig. 26-C) muestran la estructura hexagonal de acomodo de los átomos característico y la ausencia de defectos en la misma.

Por su parte la indexación de patrón de difracción (Fig. 26-B) muestra la estructura característica del óxido de grafeno, así como el proceso de exfoliación, dada la relación de los planos {1100} y {2100}, que demuestran la presencia de pocas capas a monocapas.

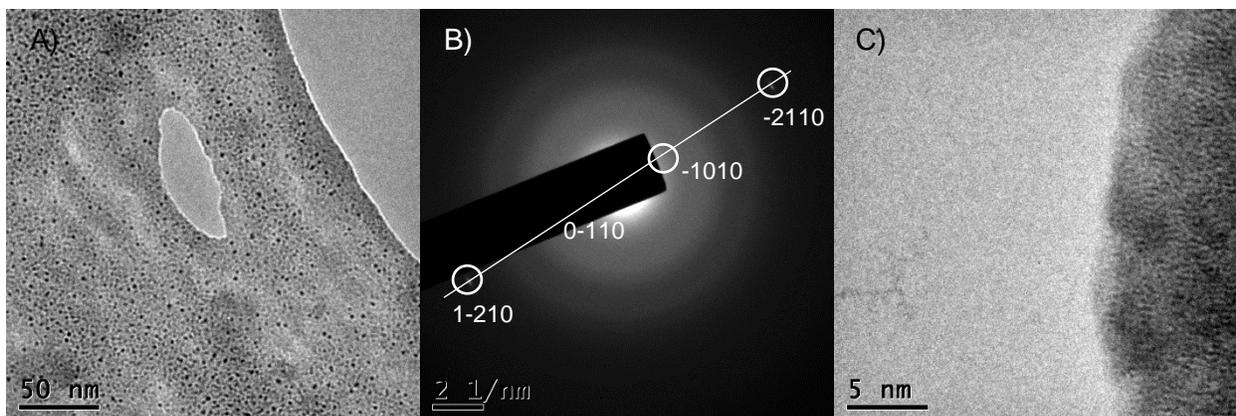


Figura 26. A) Micrografía TEM de óxido de grafeno biogénico, B) patrón SAED y C) micrografía HRTEM.

Por otra parte, la síntesis de los nanocompositos AgNPs/OG y AuNPs/OG fue monitoreada mediante espectroscopía UV-vis (Fig. 27), basándose en la aparición del plasmón superficial característico de las nanopartículas metálicas, de modo que el espectro UV-vis del óxido de grafeno, dada la ausencia de nanopartículas no manifiesta una banda de absorción plasmónica.

Sin embargo, la síntesis de las nanopartículas mediante el extracto base isopropanol de *A. californica* y la continuada mediante los grupos funcionales activos del óxido de grafeno, muestra una absorción plasmónica para el nanocomposito AgNPs/OG alrededor de los 395 nm de longitud de onda, el cual es característico de nanopartículas esféricas de plata [124]. En el caso del nanocomposito AuNPs/OG se observa una banda de absorción plasmónica que ronda los 530 nm de longitud de onda que a su vez es característico de las nanopartículas esféricas de oro [127].

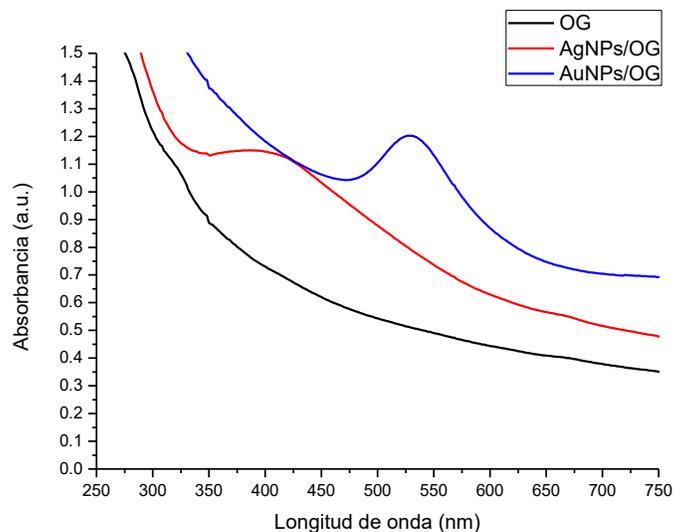


Figura 27. Espectros UV-Vis de óxido de grafeno (OG), nanocomposito AgNPs/OG, y nanocomposito AuNPs/OG. Las mediciones están reportadas a las 24 hrs de reacción.

La distribución homogénea de las nanopartículas soportados sobre el material 2D, así como su presencia se determinó mediante microscopía electrónica de Barrido y Microanálisis por dispersión de energía (EDS) acoplado (Fig. 28), cuyos resultados permiten demostrar la distribución homogénea de las nanopartículas de plata y oro sobre el óxido de grafeno para con ello, inferir de manera semicuantitativa la cantidad de nanopartículas de ambos metales distribuidas sobre los compositos. En el caso del óxido de grafeno el porcentaje en masa de C es de 64.02% mientras que de O es de 35.98% (Fig. 28-A-B), información que concuerda con lo determinado mediante XPS.

El análisis de la composición en el nanocomposito AgNPs/OG conllevó a que el porcentaje de C de 56.27%, para el O de 39.63% y para la Ag de 4.10% (Fig. 28-C-D). Con respecto a AuNPs/OG es para el C de 53.39%, para el O de 38.3% y para el Au de 8.57% (Fig. 28-E-F), de esta manera podemos comprobar que la síntesis y adhesión de las nanopartículas de oro es superior en contraste a la síntesis y adhesión de las nanopartículas de plata sobre la superficie del óxido de grafeno. Lo anterior, puede ser atribuido a la mayor afinidad de las nanopartículas de Au para formar compositos generando enlaces con grupos funcionales determinados sobre la superficie del OG.

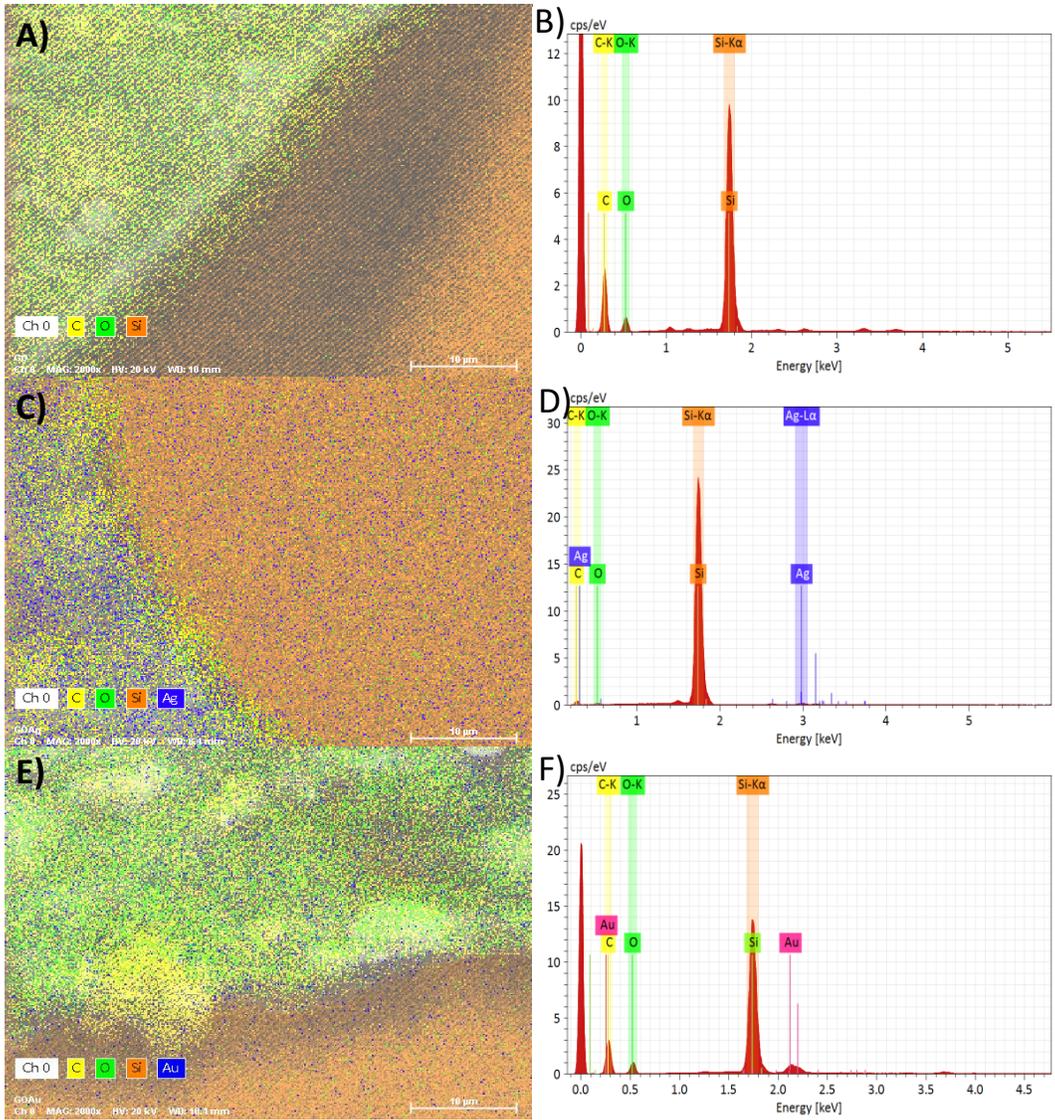


Figura 28. A) Mapeo por microanálisis por dispersión de energía (EDS) acoplado a microscopía electrónica de Barrido de Oxido de grafeno y B) espectro del análisis. C) Mapeo del Nanocomposito AgNPs/OG y D) espectro del microanálisis. E) mapeo del nanocomposito AuNPs/OG y F) espectro del microanálisis.

Las nanopartículas biogénicas sintetizadas en el nanocomposito AgNPs/OG muestran una distribución homogénea sobre el óxido de grafeno, como se muestra en las micrografías TEM (Fig. 29-A). La cantidad en la que se encuentran es menor como fue inferido por los análisis por EDS acoplado, por su parte se encuentran en un rango de los 5nm a los 45nm, con un rango de mayor abundancia de 15nm-20nm (Fig.

30-A); y distancias planares $2.387 \pm 0.05 \text{ \AA}$ comparado con 2.359 \AA para el plano cristalográfico (111) y $2.06 \pm 0.02 \text{ \AA}$ con respecto a 2.044 \AA para (200) (Fig. 29-B-C).

Por su parte las nanopartículas de oro sintetizadas en el nanocomposito AuNPs/OG (Fig. 29-A) muestran de igual forma una distribución homogénea a lo largo del material 2D, y su presencia en cantidad es mayor en contraste con el nanocomposito AgNPs/OG. Las nanopartículas se encuentran en un rango de 5 nm a 55 nm y en gran cantidad por debajo de los 5 nm, con un rango de mayor abundancia entre 10nm-15nm (Fig. 30-B); y con distancias planares $2.392 \pm 0.05 \text{ \AA}$ comparado con 2.355 \AA para el plano cristalográfico (111) (Fig. 29-E-F).

Los patrones SAED sugieren claramente la naturaleza policristalina de las muestras; en este sentido los planos cristalográficos mostrados en las micrografías HRTEM tienen un espaciamiento ya reportado, e indexado como (111) y (200) asociados a la estructura FCC de la plata y del oro, respectivamente.

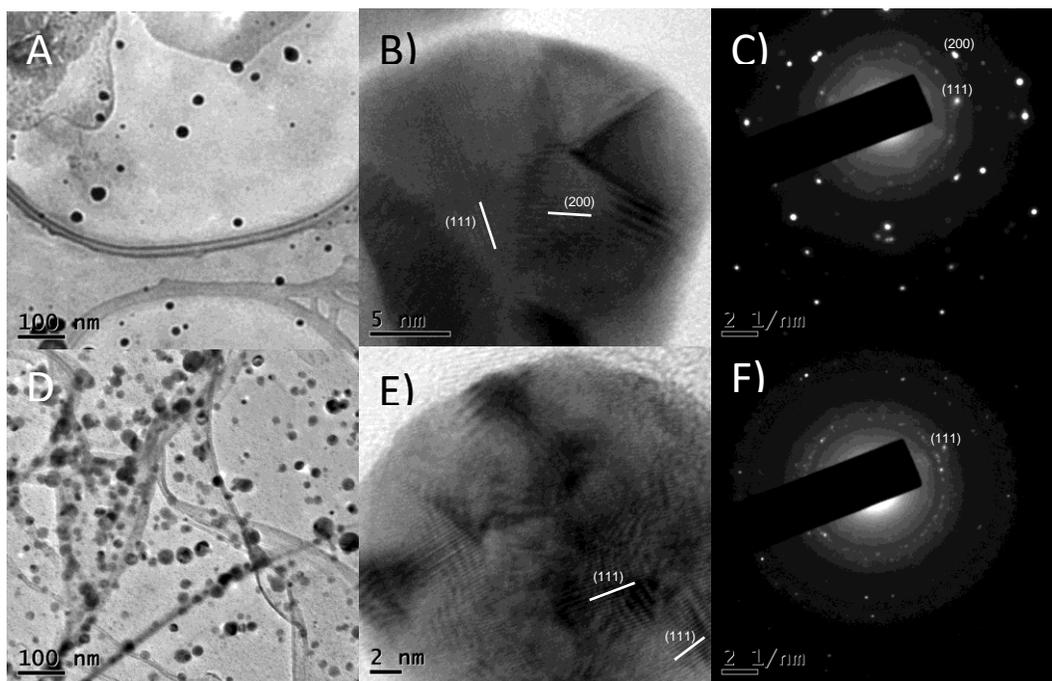


Figura 29. A) Micrografía TEM de nanocomposito AgNPs/OG, B) micrografía de HRTEM y C) Patrón SAED. D) Micrografía TEM de nanocomposito AuNPs/OG, E) micrografía de HRTEM y F) Patrón SAED.

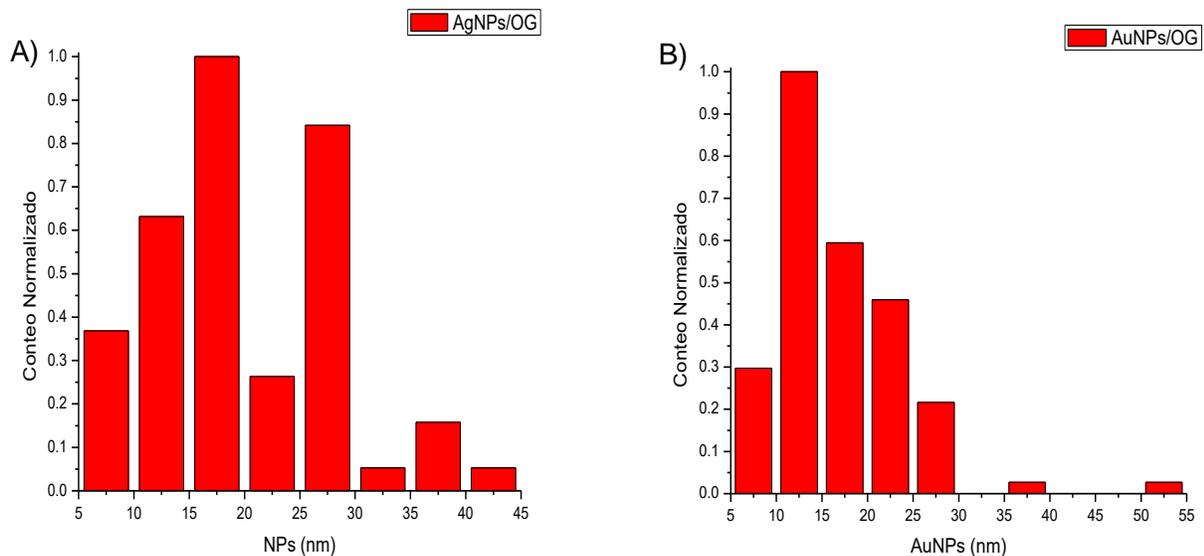


Figura 30. A) Poldispersidad de nanopartículas de plata en el nanocomposito AgNPs/OG; y B) poldispersidad de nanopartículas de oro en el nanocomposito AuNPs/OG,

Tomando como referencia el pico característico más alto en 1624cm^{-1} , no se muestra una amplificación de señal debida a la presencia del OG como templete, el cual al contrario de amplificar la señal la oculta, lo cual es muestra de que el templete no participa de manera activa en la amplificación de la señal. Por otra parte, el composito AgNPs/OG amplifica la señal Raman producida por el azul de metileno en 2.13 veces; mientras que el nanocomposito AuNPs/OG lo hace en 3.65 veces, esto es atribuible a la mayor cantidad de nanopartículas presentes en el nanocomposito AuNPs/OG con respecto al remanente, de modo que se comprueba que el efecto SERS depende de la naturaleza de la nanopartícula y del confinamiento físico de la misma (Fig. 31).

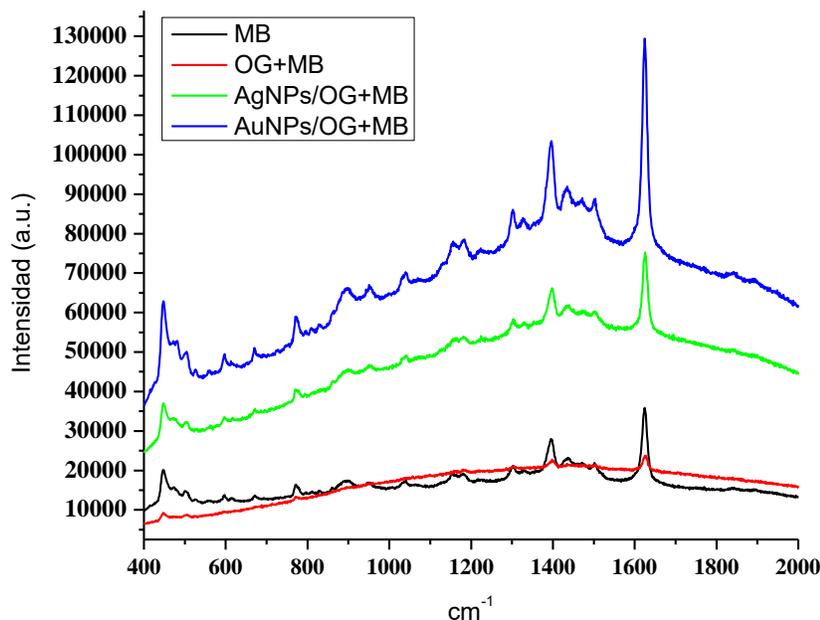


Figura 31. Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB con el sustrato del nanocomposito AgNPs/OG y MB más el nanocomposito AuNPs/OG.

El pico situado en 447 cm^{-1} con un hombro en 502 cm^{-1} corresponden a la vibración de deformación esquelética de C-N-C y C-S-C respectivamente [119] [121]. El pico 599 cm^{-1} corresponde a la deformación esquelética de C-N-C [120] [121]. El enlace fuera de plano C-H genera el pico en 669 cm^{-1} [120] [121] (no generado en el espectro del azul de metileno, pero si en la amplificación), en 767 cm^{-1} se genera por las deformaciones esqueléticas C-N-C y C-S-C así como N-CH₃ [121]. El pico que aparece en 1040 cm^{-1} corresponde al enlace C-H en plano y el pico 1153 cm^{-1} puede atribuirse tanto al enlace fuera de plano C-H [121] o por la extensión C-N [121]. El pico 1394 cm^{-1} corresponde a la deformación en plano del anillo C-H [120]. El pico 1437 cm^{-1} correspondiente a la extensión asimétrica C-N [123]. Los picos a 1503 cm^{-1} y 1624 cm^{-1} son producidos por la deformación esquelética asimétrica de C-C-C [123] y la extensión del anillo C-C [120] [123], respectivamente, como puede ser observado en el resumen de la Tabla 2.

Tabla 2. Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman. Abreviaciones: α , deformación del anillo en plano; β , flexión en plano; γ , flexión fuera de plano; δ , deformación esquelética; y u, extensión. ¹[119], ²[120], ³[121], ⁴[122], ⁵[123]

MB	AgNPs/OG + MB	AuNPs/OG + MB	Referencia	Asignación de banda
447	447	447	480 ¹ 445 ² 449 ³	δ (C-N-C) δ (C-N-C) δ (C-S-C)
502	506	502	497 ² 502 ³	δ (C-N-C)
599	596	596	613 ¹	δ (C-N-C)
669	673	669	677 ² 688 ³	γ (C-H)
767	771	771	769 ³	δ (C-N-C), δ (C-S-C), ν (N-CH ₃)
1040	1040	1040	1032 ¹ 1036 ² 1003 ³	β (C-H)
1153	1157	1161	1123 ¹ 1181 ²	γ (C-H) ν (C-N)
1394	1394	1398	1396 ²	α (C-H)
1437	1433	1429	1413 ⁴	ν_{asym} (C-N)
1503	1503	1503	1512 ⁵	δ_{asym} (C-C-C)
1624	1624	1624	1618 ² 1617 ⁴	ν (C-C) ring

5.3 Síntesis, caracterización y determinación de propiedades SERS de nano/microestructuras híbridas AgNPs/PG y AuNPs/PG

La naturaleza provee innumerables fuentes de inspiración para el diseño de partículas con morfología complejas, en este tenor la generación de partículas bioinspiradas permite el enriquecimiento de las funciones y promoción de las propiedades buscadas. Por tal motivo la utilización de granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* como templete permite que las nanopartículas que las propiedades de las nanopartículas que lo funcionalizan se ven incrementadas y desarrolladas, esto debido al confinamiento de las mismas y a la morfología.

La utilización de polen de *Dimorphotheca ecklonis*, bajo la metodología propuesta y descrita con anterioridad, supera la necesidad de generar las nanopartículas por distintitos métodos, así como la utilización de compuestos para la funcionalización que presentan requerimientos específicos y dificultan la realización metodológica.

Por su parte, los granos de polen de de *Dimorphotheca ecklonis* fueron utilizados en la formación de las nanopartículas, éstas son formadas gracias a la composición de la exina, la cual, contiene polifenoles que actúan como agentes reductores de las sales precursoras en la biosíntesis de nanopartículas.

La producción de las nanopartículas ha quedado demostrada gracias al cambio de coloración que presenta la síntesis, dado que el cambio a colores asociados a la formación de nanopartículas, como el cambio a color café en la síntesis de las micro/nanoestructuras con plata, o el cambio a un color morado en la síntesis de las micro/nanoestructuras con oro. Así mismo la funcionalización queda patentada por los análisis de dispersión de energía (EDS) acoplado a la microscopia electrónica de barrido realizada.

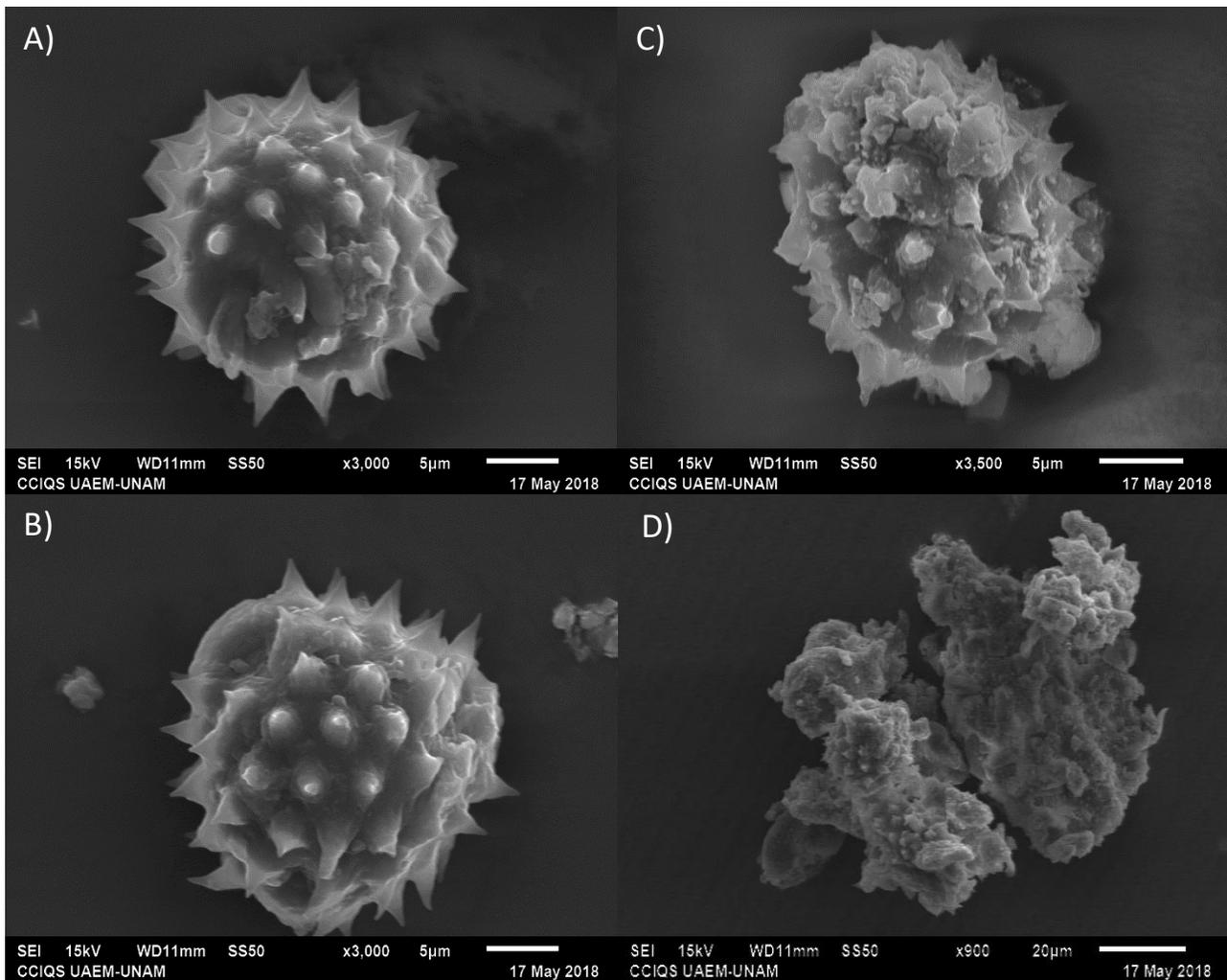


Figura 32. Micrografías SEM de nano/microestructuras AgNPs/GP (A,B) Y AuNPs/GP (C, D).

De manera que, como se puede apreciar en la micrografía SEM de las estructuras AgNPs/GP (Fig. 32-A,B), en estas las nanopartículas de plata se encuentran distribuidas homogéneamente sobre el templete, debido a que no forman conglomerados, a diferencia de lo que sucede en las estructuras AuNPs/GP (Fig. 32-C,D) en las que las nanopartículas de oro forman conglomerados e indujeron en la mayoría de los casos la ruptura del grano de polen formando agrupaciones de fragmentos del mismo, como se aprecia en la figura 32-D. De la misma manera se comprueba la distribución homogénea de las nanopartículas de plata y oro sobre el templete mediante EDS (Fig. 33), con el cual se determinó una concentración en masa de manera semicuantitativa para AgNPs/GP de 61.44% de carbono, 28.17% de

oxígeno y 10.39% de plata. En contraposición a lo obtenido en AuNPs/GP que corresponde a 65.85% de C, 16.69% de O y 17.45% de Au. Con lo que se demuestra la mayor factibilidad de la generación de las AuNPs con respecto a la formación de AgNPs, sin embargo, el crecimiento de las nanopartículas y su adhesión al templete es más homogéneo y controlado para la formación de nano/microestructuras AgNPs/GP.

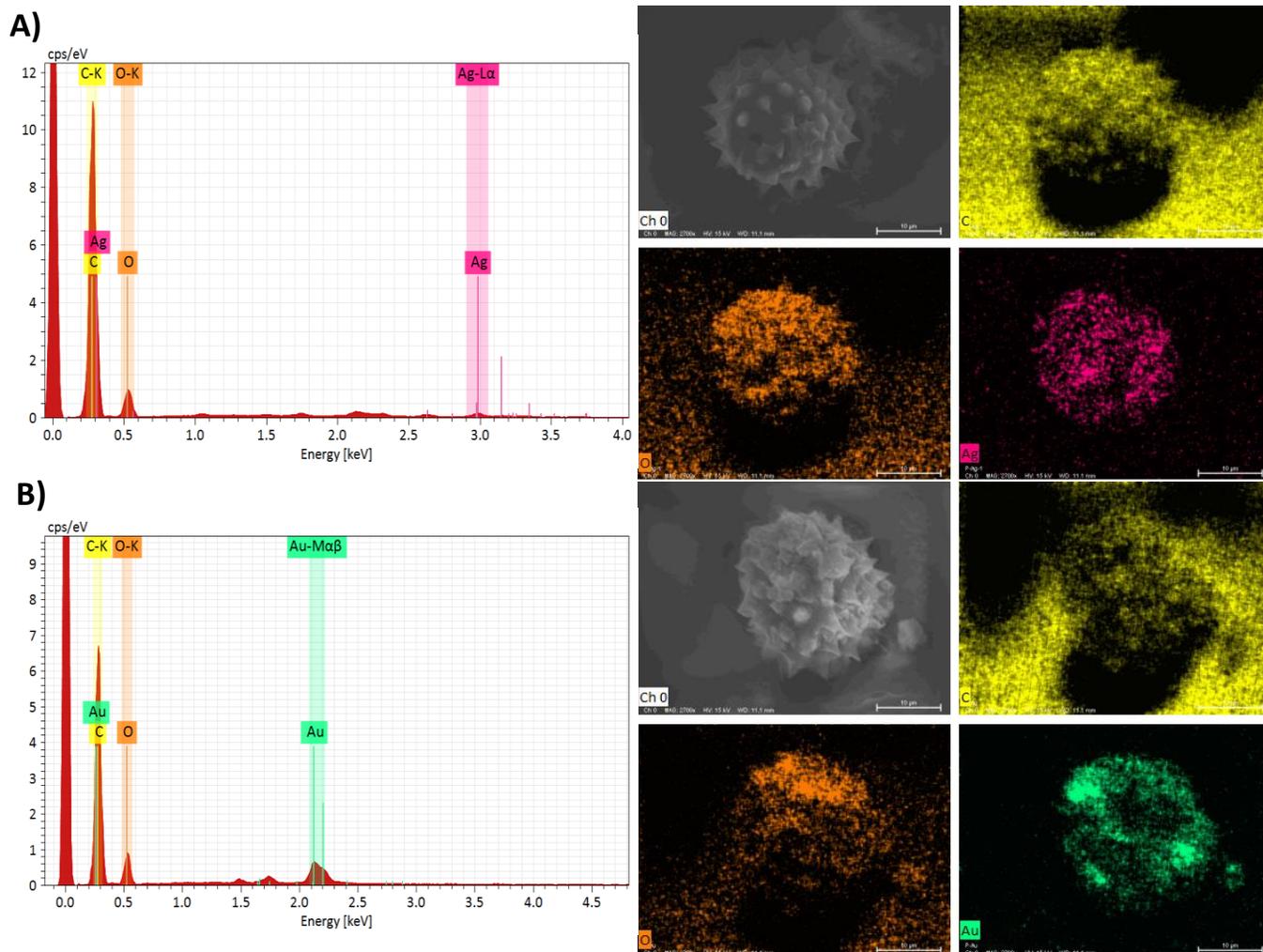


Figura 33. Mapeo por EDS de A) nano/microestructuras AgNPs/GP y B) AuNPs/GP, mostrando el espectro del análisis de dispersión de energía, y cada canal correspondiente a un elemento obtenido en el mapeo respectivo.

Tomando como referencia el pico característico más alto en 1622cm^{-1} , se muestra una amplificación de señal debida a la presencia nanopartículas utilizando granos de polen como templete, dependiente de

la cantidad de las mismas y de la naturaleza del metal, teniendo que las nano/microestructuras híbridas AgNPs dieron una amplificación de la señal del azul de metileno superior a las 50 veces, mientras que la nano/microestructura híbrida AuNPs/GP lo realiza solo en 2.5 veces, de modo que se comprueba que el efecto SERS depende de la naturaleza de la partícula (oro o plata) pero en su mayoría depende de la cantidad del confinamiento físico, esto se muestra en la amplificación de la señal generada por AgNPs/GP en la que las nanopartículas se encuentran en la superficie del grano de polen distribuida homogéneamente mientras que en AuNPs/GP las nanopartículas fueron sintetizadas sin embargo no fueron adheridas a la superficie del mismo; por tanto no solo la aglomeración de las partículas es necesaria sino su distribución ordenada sobre el templete (Fig. 34).

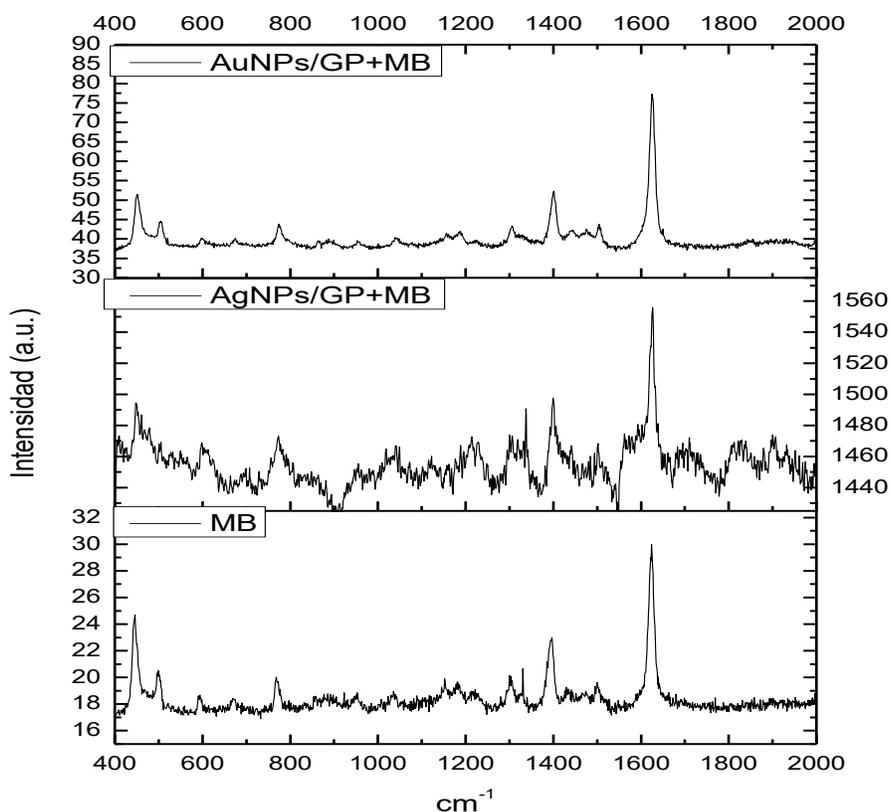


Figura 34. Espectro Raman SERS de azul de metileno (MB), MB con el sustrato de la nano/microestructura híbrida AgNPs/GP y MB más AuNPs/GP.

El pico situado en 443 cm^{-1} con un hombro en 504 cm^{-1} corresponden a la vibración de deformación esquelética de C-N-C y C-S-C respectivamente [119] [121]. El pico 592 cm^{-1} corresponde a la deformación esquelética de C-N-C [120] [121]. El enlace fuera de plano C-H genera el pico en 674 cm^{-1} [120] [121] (no generado en el espectro del azul de metileno, pero si en la amplificación), en 768 cm^{-1} se genera por las deformaciones esqueléticas C-N-C y C-S-C así como N-CH₃ [121]. El pico que aparece en 1038 cm^{-1} corresponde al enlace C-H en plano mientras que el pico 1154 cm^{-1} puede atribuirse tanto al enlace fuera de plano C-H [121] o por la extensión C-N [121]. El pico 1391 cm^{-1} corresponde a la deformación en plano del anillo C-H [120]. Los picos a 1506 cm^{-1} y 1622 cm^{-1} son producidos por la deformación esquelética asimétrica de C-C-C [123] y la extensión del anillo C-C [120] [123], respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Modos vibracionales del azul de metileno correspondientes al espectro Raman. Abreviaciones: α , deformación del anillo en plano; β , flexión en plano; γ , flexión fuera de plano; δ , deformación esquelética; y ν , extensión. ¹[119], ²[120], ³[121], ⁴[122], ⁵[123]

MB	AgNPs/GP + MB	AuNPs/GP + MB	Referencia	Asignación de banda
443	448	448	480 ¹ 445 ² 449 ³	$\delta(\text{C-N-C})$ $\delta(\text{C-N-C})$ $\delta(\text{C-S-C})$
504	---	504	497 ² 502 ³	$\delta(\text{C-N-C})$
592	597	597	613 ¹	$\delta(\text{C-N-C})$
674	----	680	677 ² 688 ³	$\gamma(\text{C-H})$
768	773	773	769 ³	$\delta(\text{C-N-C})$, $\delta(\text{C-S-C})$, $\nu(\text{N-CH}_3)$
1038	1044	1038	1032 ¹ 1036 ² 1003 ³	$\beta(\text{C-H})$

1154	1121	1165	1123 ¹ 1181 ²	$\gamma(\text{C-H}) \vee (\text{C-N})$
1391	1396	1396	1396 ²	$\alpha(\text{C-H})$
1506	1501	1512	1512 ⁵	$\delta_{\text{asym}}(\text{C-C-C})$
1622	1628	1628	1618 ² 1617 ⁴	$\nu(\text{C-C})$ ring

Así mismo se demostró la propiedad de fluorescencia de las nano/microestructuras AgNPs/GP y AuNPs/GP, mediante el modo de fluorescencia por microscopía confocal, de modo que de acuerdo a lo esperado el sistema se comportó de la misma manera que en el análisis por efecto SERS (Fig. 35).

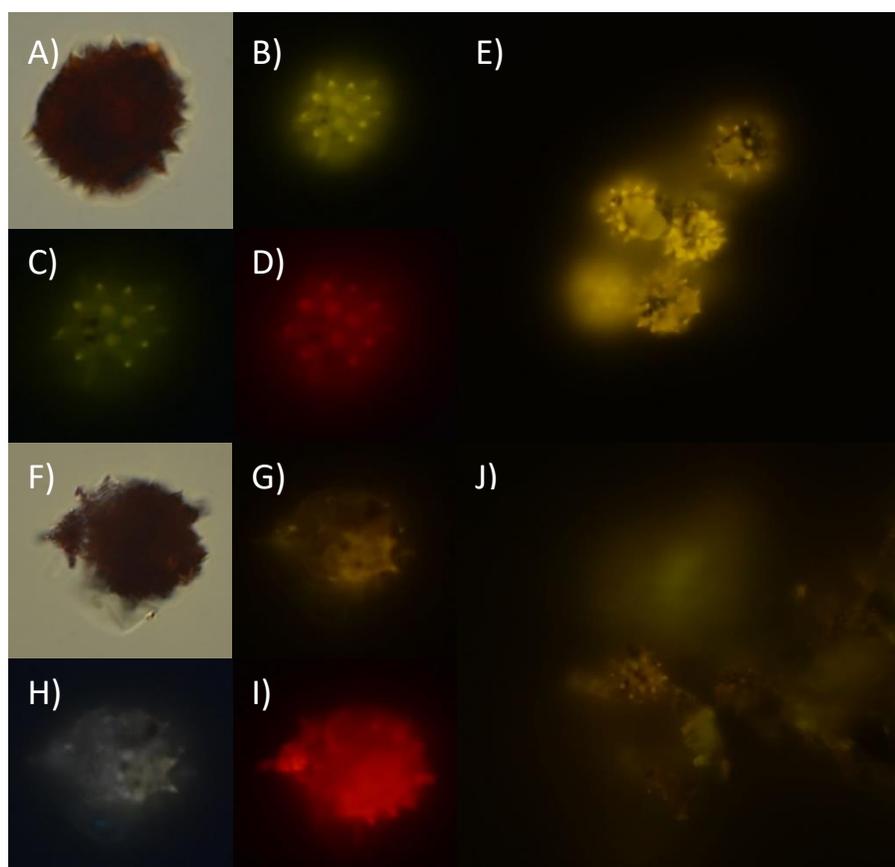


Figura 35. Micrografías de fluorescencia de nano/microestructuras híbridas. A) AgNPs/GP en campo claro, B) filtro amarillo, C) DAPI, D) rojo, E) amarillo de cúmulo. F) AuNPs/GP en campo claro, G) filtro amarillo, H) DAPI, I) rojo, J) amarillo de cúmulo.

5.4 Integración de Propiedades SERS

Son bien conocidas las propiedades ópticas de las nanoestructuras metálicas, así como la sensibilidad del mismo a la forma y en menor grado al tamaño (en contraste con los semiconductores que se comportan de manera opuesta). Sin embargo, el mecanismo del efecto SERS aun no se encuentra completamente entendido, distintas teorías han sido desarrolladas para explicar su origen del efecto SERS, de las cuales, en general, concuerdan con que el efecto se produce por una amplificación del campo electromagnético por la superficie del sustrato metálico, lo cual resulta de la resonancia de plasmón superficial que manifiestan las nanopartículas generada por la excitación de la luz laser usada en la espectrometría Raman.

Las nanopartículas esféricas son en principio simétricas, por lo tanto, presentan un plasmón de resonancia de manera dipolar, sin embargo, estructuras complejas exhiben típicamente múltiples momentos dipolares no-degenerados que dan como resultado espectros de absorción plasmónica amplios. En este sentido la nube de electrones inducida en las nanopartículas no esféricas no se distribuye homogéneamente en la superficie de manera que las distribuciones de carga multipolares superiores son claramente inducidas [98]. Se ha demostrado que el efecto SERS se produce por excitación de modos de Plasmón superficial muy localizados que ocurren en las grietas o en los poros de la superficie de un metal áspero [94]; por lo tanto, se ha sugerido que las nanopartículas que no mejoran los picos Raman producidos por el azul de metileno, probablemente no estén dispuestos lo suficientemente cerca como para poder producir campos electromagnéticos más altos. Así mismo se ha demostrado que el campo electromagnético se potencia fuertemente en las esquinas triangulares, además la reducción de la simetría de las partículas, lo cual da como resultado mejoras de campo locales mayores. Lu et al. mostró que las nanoflores de plata potenciaron las señales Raman de Rodamina 6G mucho más fuerte que las nanoesferas de plata [101]. Se reporta un efecto similar para las nanoflores de oro, demostrando que estas nanoestructuras potenciaron las señales Raman de Rodamina B más de 10 veces más fuertes que las nanoesferas de oro, aunque estas últimas se concentraron más [102].

Kottmann et al. comparó la mejora de campo local de diferentes nanoestructuras con un volumen similar pero diferente forma y mostró mejoras de campo de 10 para elíptica, 40 para triangular y 60 para nanoestructuras triangulares asimétricas. Además, las fuertes mejoras de campo de nanoestructuras de forma irregular mejoradas con el aumento del tamaño triangular (> 50 nm de longitud de borde) [96] y decaédrico (> 60 nm de longitud de borde) [98].

De esta manera se explica como las nanoestructuras de plata sintetizadas mediante extracto acuoso de *A. californica* exhiben una capacidad superior de amplificación de señal con respecto a las remanentes síntesis, hecho asociado a que las nanoestructuras anisotrópicas permiten la amplificación de la señal generando un campo electromagnético superior debido a la gran cantidad de esquinas y vórtices. De manera equiparable se muestra como la amplificación de señal en las síntesis con morfologías triangulares predominantes promueven una amplificación de la señal del azul de metileno superior a las síntesis que solo tienen morfologías esféricas, como se muestra en la síntesis de nanopartículas de oro mediante los distintos extractos de *A. californica*.

De manera homologa no solamente la morfología de las nanopartículas promueve el incremento de la señal, sino que el confinamiento físico de las mismas permite la interacción de las nanopartículas que a su vez permitirá entre una mayor aglomeración de las nanopartículas formando monocapa sobre los nanocompositos una mayor amplificación de la señal, y aumentando la cantidad de hot-spots generados como se muestra en el análisis SERS que se realizó en el nanocomposito AuNPs/OG en comparación con AgNPs/OG, por lo que la mayor cantidad de nanopartículas que se encuentran sobre el templete de oxido de grafeno y las propiedades ya conocidas del templete en la transmisión eléctrica permite una mayor amplificación de la señal, y aunque el oxido de grafeno por si solo no genera una amplificación de la señal como se ha mostrado, al funcionar como templete induciendo un confinamiento físico y al mismo tiempo un templete con propiedades eléctricas superiores a un sustrato de silicio, permiten subsanar las deficiencias de las nanopartículas esféricas en la amplificación de la señal, permitiendo la interacción y correlación entre las mismas.

Por su parte no solamente el confinamiento físico de las nanopartículas permite la mejora de la señal, sino que es mayormente inducida por la morfología de ese confinamiento, como se muestra en el análisis SERS de las nano/microestructuras AgNPs/GP y AuNPs/GP, en las cuales dado que la distribución de las nanopartículas de plata sobre el grano de polen se encuentra de manera homogénea y con una superficie de templete en la que predominan las esquinas y vórtices generan una amplificación de señal por mucho superior a las aglomeraciones de las nanopartículas de oro que se producen en AuNPs/GP, y del mismo modo superior incluso a nanopartículas por sí mismas anisotrópicas y de morfologías complejas, así la disposición espacial de las nanopartículas y la morfología del templete influyen de manera considerable sobre el comportamiento del efecto SERS en la amplificación de la señal en el azul de metileno.



CONCLUSIONES



Los nanosistemas funcionales analizados en el presente trabajo permitieron determinar y demostrar distintas propuestas de interacciones en la generación de los mismos y en la aplicación como sustratos en el efecto SERS.

En primer lugar, las nanopartículas AgNPs y AuNPs mostraron diferencias significativas en la polidispersidad y en la morfología dependiente del tipo de solvente ocupado en la producción del extracto de *A. californica*, sobre todo AgNPs sintetizadas con extracto acuoso exhibieron morfologías como flores, icosaedros, rodillos e inukshuks, del mismo modos AuNPs sintetizadas con extracto acuoso y con extracto base metanol generaron morfologías planas como triángulos y hexágonos; ambos caso diferentes a las nanopartículas poliédricas producidas en las remanentes síntesis. Por su parte los análisis estadísticos considerando solamente las nanopartículas poliédricas demostraron diferencias significativas en los tamaños de las mismas dependientes del tipo de solvente utilizado en la realización del extracto lo cual es atribuido a la extracción de diferentes componentes y en diferentes cantidades dependiendo de la polaridad del solvente que induce directamente cambios significativos en morfología y distribución de tamaños. Así mismo los análisis SERS demostraron la capacidad de las nanopartículas para amplificar la señal generada mediante el azul de metileno, en particular por estructuras con gran numero de picos y vórtices, y en estructuras planas triangulares sobre las remanentes morfologías, lo cual muestra la dependencia de la amplificación de la señal sobre la morfología de la partícula.

En segundo lugar, la síntesis de óxido de grafeno se logró mediante la exfoliación acuosa surfactante, como ha sido de mostrado y reportado con anterioridad en la literatura, sin embargo, la introducción del extracto acuoso de *A. californica* induce la formación de óxido de grafeno y no de grafeno como ha sido reportado, adhiriendo a la estructura hexagonal de carbono grupos funcionales que permiten mejorar la compatibilidad biológica, la funcionalización del material y la solvencia en compuestos polares, aumentando las interacciones posibles del material 2D con diferentes compuestos. La síntesis del óxido de grafeno bajo las condiciones que fueron reportadas, permitió y demostró la capacidad del material de ser funcionalizado por nanopartículas metálicas de plata y oro, y del mismo modo participar como agente reductor para la síntesis de las mismas nanopartículas, produciendo así un nanocomposito funcional AgNPs y AuNPs, de igual manera se demostró que existe una mayor afinidad para la funcionalización y para la síntesis de nanopartículas de oro sobre las nanopartículas de plata como se demostró por la cantidad de las mismas que funcionalizan la estructura ya mencionada. Por su parte ambos nanocompositos tienen la capacidad de amplificar la señal de azul de metileno, por efecto SERS, y los resultados de los mismos inducen a comprobar la teoría de la necesidad del confinamiento físico de las nanopartículas y la cercanía en la que se encuentren para generar una mayor amplificación de la señal, del mismo modo la intervención del templete de óxido de grafeno en el aumento del campo electromagnético para el mismo fin dadas sus propiedades eléctricas características.

Por último la síntesis de nano/microestructuras híbridas AgNPs/GP y AuNPs/GP fue posible mediante la metodología propuesta demostrando la capacidad que tienen los granos de polen de *Dimorphotheca ecklonis* para la biosíntesis de nanopartículas de plata y oro, gracias a la composición de los mismos, los cuales permiten la reducción de las sales precursoras y la estabilización y funcionalización de las mismas sobre la estructura del grano; en este sentido se demostró también las diferencias sobre la naturaleza química de la nanopartícula, ambas son sintetizadas mediante el grano de polen pero solo las nanopartículas de plata tienen la capacidad de funcionalizar las mismas estructuras y no formar conglomerados de las nanopartículas. Así mismo mediante el análisis por efecto SERS se demostró que

la amplificación de la señal depende en su mayoría del confinamiento físico de las nanopartículas y de la morfología del templete sobre la conglomeración y cantidad de nanopartículas, debido a que la amplificación es mayor incluso sobre las morfologías de nanoestructuras que inducen una mayor amplificación.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Wong, K. V. Nanotechnology and Energy. 1st ed. Pan Stanford. New York: 2017. 408 pp
2. Schummer, J. Multidisciplinarity, interdisciplinarity, and patterns of research collaboration in nanoscience and nanotechnology. *Scientometrics*. 2004. 59:3. 425-465
3. Egorova, E. M.; Amirkhanovich-Kubatiev, A.; Ivanovich-Schvet, V. Biological Effects of Metal Nanoparticles. Springer. Russia: 2016. 291 pp.
4. Borm, P.; Robbins, D.; Haubold, S.; Kuhlbusch, T.; Fissan, H.; Donaldson, K.; Schins, R.; Stone, V.; Kreyling, W.; Lademann, J.; Krutmann, J.; Warheit, D.; Oberdorster, E.; The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*. 2006. 3:11
5. Malik, B.; Pirzadah, T. B.; Kumar, M.; Ul-Rehman, R. Biosynthesis of nanoparticles and their application in pharmaceutical industry. *Nanotechnology*. 2017. 235-252.
6. Iravani, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem*. 2011. 13. 2638-2650.
7. Selvam, K.; Sudhakar, C.; Govarthanan, M.; Thiyagarajal, P.; Sengottaiyan, A.; Senthilkumar, B.; Selvankumar, T. Eco-friendly biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Tinospora cordifolia* (Thumb) Miers and evaluate its antibacterial, antioxidant potential. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2016. 30(1)1-8.
8. Zhang, C.; Zhou, Y.; Bao, J.; Fang, J.; Zhao, S.; Zhang, Y.; Sheng, X.; Chen, W. Structure regulation of ZnS@g-C₃N₄/TiO₂ nanospheres for efficient photocatalytic H₂ production under visible-light irradiation. *Chemical Engineering Journal*. 2018. 346. 226-237

9. Bhardwaj, S.; Parashar, P. K.; Roopak, S.; Alok Ji, R Uma, Sharma, R. P. Mediating broadband light into graphene–silicon Schottky photodiodes by asymmetric silver nanospheroids: effect of shape anisotropy. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2018. 51:17.
10. Zhu, Y.; Hu, A.; Tang, Q.; Zhang, S.; Deng, W.; Li, Y.; Liu, Z.; Fan, B.; Xiao, K., Liu. J.; Chen, X. Compact-Nanobox Engineering of Transition Metal Oxides with Enhanced Initial Coulombic Efficiency for Lithium-Ion Battery Anodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. 10:10 8955–8964
11. Du, M.; Chen, S.; Duan, W. H.; Chen, W.; Jing, H. Role of Multi-Walled Carbon Nanotubes as Shear Reinforcing Nano-pins in Quasi-Brittle Matrices. *ACS Appl. Nano Mater*. 2018. Just Accepted Manuscript
12. Liang, X.; Er-Wei, L.; Jing-Yu, Y.; Wen, M.; Bo-Hua, D.; Jin-Ping, L. Enhanced performance of solid-state Li–O₂ battery using a novel integrated architecture of gel polymer electrolyte and nanoarray cathode. *Rare Metals*. 2018. Just Accepted Manuscript
13. Watson, D. Collective scattering of subwavelength resonators in metamaterial systems. University of Southampton, Doctoral Thesis, 2017, 145pp.
14. Gao, J.; Cong, J.; Lu, M.; Wu, Y.; Li, Y.; He, P.; Yao, J.; Xu, H.; Xu, S. Two-dimensional Co@N-Carbon nanocomposites facilely derived from MOF nanosheets for efficient bifunctional electrocatalysis. *Chemistry, an Asian Journal*. 2018. Just Accepted Manuscript
15. Murty, B.S.; Shankar, P.; Raj, B., Rath; B.B.; Murday, J. *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*. Springer Science & Business Media. India. 2013. 244 pp
16. Mongillo, J. F. *Nanotechnology 101*. Greenwood Press. London. 2007. 274 pp
17. Wiley, B., Sun, Y., Chen, J., Cang, H., Li, ZY., Li, X., Xia, Y. Shape-controlled synthesis of silver and gold nanostructures. *MRS bulletin/Materials Research Society*. 2005. 30:5 356-361.
18. Buzea, C., Blandino-Pacheco, I., Rosie, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007. 2:4. 17-71.
19. Makisima, A. Possibility of hybrid materials. 2004. *Cer. Jap*. 39: 90-91

20. Uemura, M. Hybrid composites. Ed. By Uemura and H. Hukunda, CMC Publishing Co., Tokyo, Japan. 2002. 1-9
21. Nanko, M. Definitions and categories of hybrid materials. *Adv. In Tech. of Mat. And Mat. Proc. J.* 2009. 11:1. 1-8
22. López, J.; Vilchis, A.; Sánchez, V.; Avalos, M. Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón. *Superficies y Vacío.* 2013. 26:3. 73-78
23. Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beatte, D. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure, and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2009. 331. 251-262.
24. Wiley, b. j.; Im, S.; Li, Z.; McLellan, L.; Skkinen, A.; Xia, Y. Maneuvering the Surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *Journal of Physical Chemistry B,* 2006. 110, 15666-15675.
25. Iravanil, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V.; Zolfaghari, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical, and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences.* 2014, 9, 385-406.
26. Tarasenko, N.; Busten, A.; Nevar, E.; Savastenko, N. Synthesis of nanosized particles during laser ablation of gold in water. *Appl. Surf. Sci.* 2006, 252, 4439-4444.
27. Kawasaki, M.; Nishimura, N. Laser fragmentation of thin Au and Ag flakes in acetone for highly productive pathway to stable metal nanoparticles. *Appl Surf Sci.* 2006, 253, 2208-2216
28. Al-Mubaddel, F. S.; Haider, S.; Al-Masry, W. A.; Al Zeghayer, Y.; Imran, M.; Haider, A.; Ullah, Z. Engineered nanostructures: a review of their synthesis, characterization, and toxic Hazard considerations. *Arab. J. Chem.* 2012, 09, 10.
29. Hayelom, I.; Beyene, D.; Werkneh, A. A.; Bezabh, H. K.; Ambaye. T. G. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles, a review. *Sustainable Material and Technologies.* Accepted Manuscript. 2017
30. Shon, Y.-S.; Cutler, E. Aqueous Synthesis of Alkanethiolate Protected Ag Nanoparticles Using Bunte Salts. *Langmuir* 2004, 20, 6626–6630.

31. Jana, N. R.; Peng, X. Single-Phase and Gram-Scale Routes toward Nearly Monodisperse Au and Other Noble Metal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125, 14280–14281.
32. Tan, Y.; Li, Y.; Zhu, D. Preparation of Silver Nanocrystals in the Presence of Aniline. *J. Colloid Interface Sci.* 2003. 258, 244–251.
33. Yu, D.; Yam, V. W.-W. Controlled Synthesis of Monodisperse Silver Nanocubes in Water. *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126, 13200– 13201.
34. Giersig, M.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M. Evidence of an Aggregative Mechanism during the Formation of Silver Nanowires in N,N-Dimethylformamide. *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 607–610.
35. Tan, Y.; Dai, X.; Li, Y.; Zhu, D. Preparation of Gold, Platinum, Palladium and Silver Nanoparticles by the Reduction of Their Salts with a Weak Reductant-Potassium Bitartrate. *J. Mater. Chem.* 2003, 13, 1069–1075.
36. Lee, G.-J.; Shin, S.-I.; Kim, Y.-C.; Oh, S.-G. Preparation of Silver Nanorods through the Control of Temperature and pH of Reaction Medium. *Mater. Chem. Phys.* 2004, 84, 197–204.
37. Sun, Y.; Yin, Y.; Mayers, B. T.; Herricks, T.; Xia, Y. Uniform Silver Nanowires Synthesis by Reducing AgNO₃ with Ethylene Glycol in the Presence of Seeds and Poly(Vinyl Pyrrolidone). *Chem. Mater.* 2002, 14, 4736–4745.
38. Tan, S.; Erol, M.; Attygalle, A.; Du, H.; Sukhishvili, S. Synthesis of Positively Charged Silver Nanoparticles via Photoreduction of AgNO₃ in Branched Polyethyleneimine/HEPES Solutions. *Langmuir* 2007, 23, 9836–9843.
39. Zhu, Y.; Qian, Y.; Li, X.; Zhang, M. [gamma]-Radiation Synthesis and Characterization of Polyacrylamide-Silver Nanocomposites. *Chem. Commun.* 1997, 1081–1082.
40. Jiang, L.-P.; Xu, S.; Zhu, J.-M.; Zhang, J.-R.; Zhu, J.-J.; Chen, H.Y. Ultrasonic-Assisted Synthesis of Monodisperse Single-Crystalline Silver Nanoplates and Gold Nanorings. *Inorg. Chem.* 2004, 43, 5877– 5883.

41. Hu, B.; Wang, S.-B.; Wang, K.; Zhang, M.; Yu, S.-H. Microwave Assisted Rapid Facile “Green” Synthesis of Uniform Silver Nanoparticles: Self-Assembly into Multilayered Films and Their Optical Properties. *J. Phys. Chem. C*. 2008, 112, 11169–11174.
42. Shakeel Ahmed, Saifullah, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, Saiqa Ikram. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2016, 9:1, 1-7.
43. M. Gericke, A. Pinches. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*. 2006, 83, 132-140
44. Nanda, M. Saravanna Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*. 2009. 5(1), 452-456.
45. J. I. Husain, S. Kumar, A.A. Hashmi, Z. Khan. Silver nanoparticles: preparation, characterization, and kinetics. *Adv. Material let*. 2011, 2, 188-194.
46. P. Rauwel, E. Rauwel, S. Ferdov, M. P. Singh. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and applications. *Advance in materials science and engineering*. 2015, 2
47. N. Pantido, L. E. Horsfal. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi, and Plants. *Journal of nanomedicine and nanotechnology*. 2014, 5, 233
48. N. Krithinga, A. Rajalakshmi, A. Jayachitra. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of *clitoriaternatea* and *solanunmnigrum* study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. *Journal of Nanoscience*. 2015: 8.
49. Jayachandra R., Rani M., Arvind K., Sudha R. Biological activities of green silver nanoparticles synthesized with *Acorous calamus* rhizome extract. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014. 85, 784-794
50. Deenadayalan A., Palanichamy V., Selvaraj M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera dentata* leaf extract at room temperature and their antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 127, 168–171.

51. Seied M., Mehdi T., Vajihe M., Mehdi R. Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa* *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 136 1249–1254.
52. Thi Thanh T., Thi Thu H., Thi Hanh N. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia* leaf extract and their antimicrobial activity. *Materials Letters*, 2013, 105, 220–223.
53. Babu G., Arulvasu C., Prabhu D., Jegadeesh R., Manikandan R. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Datura innoxia* and its apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. *Materials Letters*, 2014, 122, 98–102.
54. Kasi, M., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Saleh, Al-S. Biosynthesis of silver nanoparticles using acacia leucophloea extract and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2014, 9, 2431–2438.
55. Qian S., Xiang C., Jiangwei L., Min Z., Zuliang C. Chang-Ping Y. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014, 444, 226–231.
56. Salem W, Haridy M, Sayed W, Hassan N. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from latex and leaf extract of *Ficus sycomorus*. *Industrial Crops and Products*. 2014, 62, 228–234.
57. Uttara B., Singh A., Zamboni P., Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 2009, 7, 65-74
58. Medina, A.; Lucero, M.; Holguin, O.; Estell, R.; Posakony, J.; O'Connell, M. Composition and antimicrobial activity of *Anemopsis californica* leaf oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005. 53:1, 8694-8698.
59. Catherine N. Kaminski, Seth L. Ferrey, Timothy Lowrey, Leo Guerra, Severine Van Slambrouck, Wim F.A. Steelant. In vitro anticancer activity of *Anemopsis californica*. *Oncology letters*. 2010, 1, 711-715

60. Wang, Y.; Liu, Z.; Han, B.; Huang, Y.; Yang, G. Carbon microspheres with supported silver nanoparticles prepared from pollen grains. *Langmuir*. 2005. 21: 10846-10849
61. McNally, H.; Pingle, M.; Lee, S.; Gou, D.; Bergstrom, D.; Bashir, R. Self-assembly of micro- and nano-scale particles using bio-inspired events. *Appl. Surf. Sci.* 2003. 214: 109-119
62. Goodwin, W.; Gomez, I.; Fang, Y. Conversion of pollen particles into three-dimensional ceramic replicas tailored for multimodal adhesion. *Chem Mater*. 2013. 25: 4529-4536
63. Scott, R.; "Pollen Exine – the sporopollenin enigma and the physics of pattern" *Soc. Exp. BIOL. Semin. S.* 1994. 55: 49-81
64. Blackmore, S.; Wortley, A.; Skvarla, J.; Rowley, J. Pollen Wall development in flowering plants. *New Phytol.* 2007. 174: 483-498
65. Shen, W.; Zhang, L.; Du, Y.; Zhao, B.; Zhou, X. Synthesis, characterization, and properties of porous silver spheres using rape pollen as novel bio-templates. *Mat. Let.* 2017. 213: 7-10
66. Johnstone, L.; Gomez, I.; Lin, H.; Fadiran, O.; Chen, V.; Meredith, C.; Perry, J. "Adhesion Enhancements and SERS activity of Ag and Ag@SiO₂ nanoparticle decorated ragweed pollen micro-particle sensor. 2017. Just accept Manuscript.
67. Lin, H.; Allen, M.; Wu, J.; deGlee, B.; Shin, D.; Cai, Y.; Sandhage, K.; Deheyn, D.; Meredith, C. "Dielectric-enabled core/shell microparticles with tailored multimodal adhesion and optical reflectivity. *Chem. Of Mat.* 2015. Nd.
68. Gomez, I.; Goodwin W.; Sbo, D.; Zhang, Z.; Sandhage, K.; Meredith, J. Three-dimensional magnetite replicas of pollen particles with tailorable and predictable multimodal adhesion. *J. Mater. Chem. C.* 2015. 3: 632-643.
69. K.S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov. "Electric Field Effect in Atomically thin Carbon Films". *Science*. 2004. 306
70. M.I. Katsnelson, K. S. Novoselov y A. K. Geim. "Chiral tunnelling and the Klein paradox in Graphene" *Nature materials (UK)*. 2006. 2. 620-625.

71. Huawen Hu et al. "Metal-free graphene-based catalyst-Insight into the catalytic activity: A short review". *Applied Catalysis A: General*. 2015. 492. 1-9.
72. Lotya, M.; Hernandez, Y.; King, P.; Smith, R.; Nicolosi, R.; Karlsson, L.; Blighe, F.; Sukanta De, G.; Wang, Z.; McGovern, I.; Duesberg, G.; Coleman, J. Liquid Phase Production of Graphene by Exfoliation of Graphite in Surfactant/Water Solutions. *Journal of American Chemical Society*. 2009. 131(1), 3611-3620.
73. Hernandez, Y.; Nicolosi, V.; Lotya, M.; Blighe, F.; Sun, Z.; McGovern, S.; Holland, B.; Byrne, M.; Gun'Ko, Y.; Boland, J.; Niraj, P.; Duesberg, G.; Krishnamurthy, S.; Goodhue, R.; Hutchison, J.; Scardaci, V.; Ferrari, A.; Coleman, J. High-yield production oh graphene by liquid-phase exfoliation of graphite. *Nature Nanotechnology*. 2008. 3(2008), 563-568
74. Sutter, P.; Flege, J.; Sutter, Y. Epitaxial graphene on ruthenium. *Nature Materials*. 2008 7(2008) 406-411
75. Wang, Y.; Xing Shi, Z.; Yin, J. Facile Synthesis of Soluble Graphene via a Green Reduction of Graphene Oxide in Tea Solution and Its Biocomposites. *Journal of American Chemical Society*. 2011. 3(2011), 1127-1133
76. M. Xu, J. Zhu, F. Wang, Y. Xiong, Y. Wu, Q. Wang, J. Weng, Z. Zhang, W. Chen and S. Liu, Plasmonic Polymer Tandem Solar Cell. *ACS Nano*, 2016, 10, 3267–3281.
77. D. Hernández, M. Scardamaglia, S. Saucedo-Anaya, C. Bittencourt, M. Quintana, Design and synthesis of novel dual-target agents for HDAC1 and CK2 inhibition. *RSC Adv.*, 2016, 6, 66634-66640.
78. J. Zhang and X. S. Zhao, J. Controllable Synthesis of Conducting Polypyrrole Nanostructures. *Phys. Chem. C*, 2012, 116, 54205426.
79. G. Zhao, J. Li, X. Ren, C. Chen, and X. Wang. Few-Layered Graphene Oxide Nanosheets As Superior Sorbents for Heavy Metal Ion Pollution Management. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 10454–10462.

80. Hernández, D.; Sánchez, E.; Villabona Leal, G.; Saucedo-Orozco, I.; Bracamonte, V.; Pérez, E.; Bittencourt C.; Quintana, M. Highly Stable Graphene Oxide-Gold Nanoparticle Platforms for Biosensing Applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017. Manuscrito aceptado.
81. A.F. Faria, D.S.T. Martinez, S.M.M. Meira, A.C.M. Moraes, A. Brandelli, A.G.S. Filho, O.L. Alves, Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. Manuscrito aceptado.
82. De Lima, R.; Seabra, A.; Durán, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2012. 3:11. 867-879.
83. Eustis, S., & el-Sayed, M. a. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and non-radiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews*. 2006. 35:3. 209–217.
84. Cañamares M V, Garcia-Ramos J V, Gómez-Vargas J D, Domingo C, Sanchez Cortés S. Comparative study of the morphology aggregation, adherence to glass, and surfaced-enhanced Raman Scattering Activity of Silver Nanoparticles prepared by chemical Reduction of Ag⁺ Using Citrate and Hydroxylamine. *Langmuir* 2005; 8546;21.
85. Sutherland W S, Winefordner J D. Colloid filtration: A novel substrate preparation method for surface-enhanced Raman Spectroscopy. *J Colloid Interface Sci* 1984; 270:99.
86. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar R S, Khan M I, Ramani R, Parischa R, Ajayakumar P V, Alam M, Sastry M, Kumar R. Bioreduction of AuCl₄ ions by the Fungus *Verticillium* sp. and surface Trapping of the Gold Nanoparticles Formed. *Angew Chem Int Ed* 2001; 3585:40.
87. Shankar S S, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Controlling the optical properties of Lemongrass Extract Synthesized Gold Nanotriangles and Potential Application in Infrared-Absorbing Optical Coating. *Chem Matter* 2005; 566:17.

88. Salim N, Abdelwaheb C, Rabah C, Ahcene B. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8:1623
89. Yeshchenko O., Dmitruk I. Alexeenko A., Losytskyy M., Kotko A., Pinchuk A. Sizedependent surface-plasmon-enhanced photoluminescence from silver nanoparticles embedded in silica. *Physical Review B*. 2009. 79.1-8
90. Gamez G, Dokken K, Herrera I, Parsons J G, Tiemann K J, Gardea-Torresdey J L. Chemical processes involved in Au(III) binding and bioreduction by alfalfa biomass. *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*
91. Fuchs R. Theory of the optical properties of ionic crystal cubes. *Phys. Rev. B*. 1975. 11. 1732
92. Quester, K.; Avalos-Borja, M.; Vilchis-Nestor, V. N.; Camacho-Lopez, M. A.; Castro-Longoria, E. SERS Properties of different sized and shaped gold nanoparticles biosynthesized under different environmental conditions by *Neurospora crassa* extract. *PLoS ONE* 2013 8(10), 1-8. e77486.do:10.1371/journal.pone.0077486.
93. Zhang JZ. Optical properties of metal nanomaterial. In: Zhang JZ. *Optical properties and spectroscopy of nanomaterials*. Word Scientific Publishing Company, Inc. 2009. 205-235
94. García-Vidal, F. J.; Pendry, J. B., Collective theory for surface enhanced Raman scattering. *Phys Rev Lett* 1996, 77, 1163-1166.
95. Kottmann, J.; Martin, O.; Smith, D.; Schultz, S., Spectral response of plasmon resonant nanoparticles with a non-regular shape. *Opt Express* 2000, 6, 213-219.
96. Kottmann, J. P.; Martin, O. J.; Smith, D. R.; Schultz, S., Dramatic localized electromagnetic enhancement in plasmon resonant nanowires. *Chem Phys Lett* 2001, 34, 1-6
97. Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jackel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J., Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. *Adv Mater* 2010, 22, 1805-1825
98. Pastoriza-Santos, I.; Sánchez-Iglesias, A.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M., Environmental optical sensitivity of gold nanodecahedra. *Adv Funct Mater* 2007, 17, 1443-1450.

99. Rodríguez-Fernández, J.; Novo, C.; Myroshnychenko, V.; Funston, A. M.; Sánchez-Iglesias, A.; Pastoriza-Santos, I.; Mulvaney, P., Spectroscopy, imaging, and modeling of individual gold decahedra. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2009, 113, 18623-18631.
100. Das, P.; Chini, T. K., Spectroscopy and imaging of plasmonic modes over a single decahedron gold nanoparticle: A combined experimental and numerical study. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2012, 116, 25969-25976
101. Lu, L.; Kobayashi, A.; Tawa, K.; Ozaki, Y., Silver nanoplates with special shapes: controlled synthesis and their surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering properties. *Chem mater* 2006, 18, 4894-490
102. Xie, J.; Zhang, Q.; Lee, J. Y.; Wang, D. I., The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications. *ACS Nano* 2008, 2, 2473-2480.
103. Skoog, Holler, Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5a ed., Ed. Mc Graw Hill, España, 2001
104. Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, F.J. *Fundamentos de Química Analítica*, 9a ed. Cengage Learning Editores. 2015
105. Zhong Zhang, J. *Optical Properties and Spectroscopy of Nanomaterials*. Ed. World Scientific, USA, 383 p.
106. Smart, L., Moore, E. *Solid state chemistry*. CRC Press Taylor & Francis Group. 2005.
107. Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews*. 2005. 10. 1025-1102.
108. Feliu, S. Técnicas de análisis de superficies por espectroscopia electrónica. Conceptos y aplicaciones generales. *Revista de Metalurgia de Madrid*. 1993. 29:5. 307-319
109. Seah, M.P.; Briggs, D. *Practical Surface Análisis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Ed. John Wiley and Sons Ltd. Chichester (R.U.). 1990: 1-16.
110. Griffiths, J. Raman spectroscopy for medical diagnosis. *Analytical chemistry*. 2007. 1. 3975-3978.

111. Montes, A.; Herrera, J.; Gómez, J.; Pacheco, P.; Sarmiento, R. Observación de dispersión Raman estimulada en tetracloruro de carbono, benceno y etanol. *Opt. Pura Apl.* 2012. 45:3. 299-302
112. Aragao, A.; Oliceira, T.; Quelemes, P.; Gomes-Perfeito, M.; Carvalho-Araujo, M.; Araujo-Sousa, J. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria bridiae* and their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016. Manuscrito aceptado
113. Zhao, J.; Pinchuk, A.O.; McMahon, J.M.; Li, S., Ausman, L.K.; Atkinson, A. L.; Schatz, G.C. Methods for Describing the Electromagnetic Properties of Silver and Gold Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2008. 41. 1710-1720
114. Joy Prabu, H.; Johnson, I. Plant-mediated biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Tragia involucrate*, *Cymbopogon citronella*, *Solanum verbascifolium* and *Tylophora ovata*. *Karbala International Journal of Modern Science*. 2015. 1 237-246
115. Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2007. 3. 301-316
116. Ibrahim, A.; Abdul-Aziza, A.; Abu-Noqta, O. Bio-synthesis of Triangular and Hexagonal Gold Nanoparticles using Palm Oil Fronds' Extracts at Room Temperatur. *Mater. Res. Express*. 2018. Manuscrito aceptado.
117. Miranda, A.; Malheiro, E.; Skiba, E.; Quaresma, P.; Carvalho, P.; Eaton, P.; de Catro, B.; Shelnutt, J.; Pereira, E. One-pot synthesis of triangular gold nanoplates allowing broad and fine tuning of edge length. *Nanoscale*. 2010. 2. 2209-2216
118. Joshi, G.; White, S.; Johnson, M.; Sardar, R.; Jain, P. Ultrashort, Angstrom-Scale Decay of Surface-Enhanced Raman Scattering at Hot Spots. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016. 120:43. 24973-24981.

119. Ruan C, Eres G, Wang W, Zhang Z, Gu B. Controlled fabrication of nanopillar arrays as active substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy. *Langmuir*. 2007 23: 5757-5760
120. Xiao GN, Man SQ. Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles. *Chem Phys Lett*. 2007 447: 305-309
121. Zhong L. Hu Y, Xing D. Adsorption orientation of methylene blue (MB+) on the silver colloids: SERS and DFT studies. *CLEO/ Pacific Rim Conference*. 2009. 978
122. Virdee HR, Hester RE. Surface-enhanced Raman spectroscopy of thionine-modified gold electrodes. *Laser Chem*. 1988. 9: 401-4016
123. Xu W, Aydin M, Zakia S. Atkins DL. Aggregation of thionine within AIMCM-48. *J Phys Chem B*. 2004. 108: 5588-5593
124. Hernández-Sánchez, D.; Villabona-Leal, G.; Saucedo-Orozco, I.; Bracamonte, V.; Pérez, E.; Bittencourt, C.; Quintana, M. Highly Stable Graphene Oxide-Gold Nanoparticle Platforms for Biosensing Applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, Manuscrito aceptado
125. Tian, F.; Wang, X.; Chen, Z.; Guo, Y.; Liang, H.; Lu, Z.; Wang, D.; Lou, X.; Yang, L. A facile post-process method to enhance crystallinity and electrochemical properties of SnO₂/rGO composites with three-dimensional hierarchically porous structure. *RSC Adv*. 2016. 6. 106275
126. Reinholdt, M.; Ilie, A.; Roualdès, S.; Frugier, J.; Schieda, M.; Coutanceau, C.; Martemianov, S.; Flaud, V.; Beche, E.; Durand, J. Plasma Membranes Modified by Plasma Treatment or Deposition as Solid Electrolytes for Potential Application in Solid Alkaline Fuel Cells, *Membranes*. 2012, 2, 529-552
127. Faria, A.F.; Martinez, D.S.T.; Meira, S.M.M.; Moraes, A.C.M.; Brandelli, A.; Filho, A.G.S.; Alves, O.L. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013. Manuscrito aceptado