



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO UTILIZANDO DISPOSITIVOS DE
MICROFLUÍDICA**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Ing. LAN JADE BERNAL SÁNCHEZ

Dr. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS
FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad de México, septiembre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO UTILIZANDO
DISPOSITIVOS DE MICROFLUÍDICA**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Ing. LAN JADE BERNAL SÁNCHEZ



Ciudad de México, septiembre 2020.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 326 del Departamento de Biofísicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Resultados parciales de esta tesis fueron presentados en la Conferencia Internacional de Nanociencia y Nanotecnología Aplicada (ANNIC 2019), realizada en París, Francia del 18 al 20 de noviembre del 2019.

Esta tesis está dedica a mi amiga **Luz María** a quién admiro por su fortaleza

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento del proyecto 284240 para la reparación y mantenimiento del equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS Zetasizer Nano ZS) y por el otorgamiento de la beca con número de CVU 885692 durante mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, clave: IT203318) para la adquisición de equipos y materiales indispensables para la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Facultad de Química (PAIP 5000-9023) para la compra de materiales y reactivos.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir a la Conferencia Internacional de Nanociencia y Nanotecnología Aplicada (ANNIC 2019).

A la Dra. Josefa Bernad por permitirme el uso del equipo DLS Zetasizer Nano ZS.

A mi asesor, el Dr. Luis Fernando Olguín Contreras por la confianza y la paciencia, por ser una guía para desarrollar este proyecto.

A los miembros de mi jurado por aceptar revisar esta tesis, por sus valiosos comentarios y aportaciones.

A los profesores de las asignaturas que cursé durante mi primer año de maestría, especialmente a la Dra. América Vázquez Olmos, por sus consejos y apoyo.

A la M. en C. Alma Jessica Díaz Salazar, por la paciencia para explicarme el uso del espectrofotómetro UV-Vis y la manera correcta de desechar los residuos que generé tras realizar mis experimentos, por sus consejos, GRACIAS.

Al Dr. Rosendo Pérez Isidoro por todas las aportaciones para el desarrollo de este proyecto, por las preguntas planteadas durante los seminarios y por ayudarme con la construcción de los histogramas, por la paciencia. GRACIAS

A mis compañeros de laboratorio Abraham Ochoa, Erick Nieves, Sarah Fleming, Isaac Jurado, Miguel del Moral, Oscar de Jesús Rodríguez, Pamela Vázquez por convertirse en mis amigos, por estar conmigo en mis mejores y peores días, por la comida, chistes y pláticas compartidas después de varias horas en el laboratorio. Especialmente a la Dra. Iraís Solís, por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de este proyecto. GRACIAS

A mis padres Enrique y Georgina, a mis tías Esperanza y Gloria por nunca dejarme rendir y enseñarme a trabajar duro y alcanzar mis sueños.

A las chicas de la Asociación de Mujeres en Ciencia y Tecnología Alejandra Jáidar, por hacer crecer mi amor a la ciencia y darme la confianza para volver a creer en mí. Especialmente a Lizbeth Rodríguez Govea por invitarme a ser parte del taller y a todas mis alumnas, por contagiarme su alegría y sus motivaciones para nunca dejar de superarme.

A mis amigos Saúl García, Aldo Catalán, Pedro Herrera, Cecilia Ruiz Alemán, Alejandra del C. Pineda Amaya, Francisco Valencia López, Isaac Huidobro Meezs, Gabriela Fundora, Laura Castro González, José María Castillo especialmente a Arturo Sauza de la Vega, por la paciencia, las enseñanzas, los consejos, las risas y la química compartida.

A la familia Archundia Eufrazio por su apoyo y por darme siempre un espacio para que pudiera hacer mis tareas, por todas las risas y momentos compartidos. GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE	I
GLOSARIO	VI
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	1
OBJETIVO GENERAL:	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	2
I. GENERALIDADES	3
I.1. Nanociencia y Nanotecnología	3
I.2. Métodos de síntesis de nanomateriales	4
I.2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas en dispersión por el método coloidal	4
I.3. Nanopartículas de oro	6
I.3.1 Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich	6
I.4. Microfluídica	8
I.4.1. PDMS	10
I.4.2. Régimen hidrodinámico en dispositivos de microfluídica	12
I.4.3. Técnicas de enfoque hidrodinámico (HF) aplicadas a microfluídica	14
I.4.4 Flujo continuo en una sola fase con mezclado por cavitación	15
I.4.5. Flujo segmentado en dos fases: microgotas y nanoemulsiones	17
I.5. Síntesis de nanopartículas de oro en canales de microfluídica	19
II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	22
II.1. Fabricación de los microchips de microfluídica	22

II.1.1. Diseño de la fotomáscara	22
II.1.2. Fabricación del molde maestro por fotolitografía suave	23
II.1.3. Proceso de fabricación del molde maestro	24
II.1.4. Relleno del molde maestro con PDMS y agente curante	25
II.1.5. Pegado del microchip de PDMS a la superficie de vidrio.....	26
II.2. Síntesis de nanopartículas de Au por el método de Turkevich	28
II.2.1. Materiales y reactivos	28
II.2.2. Desarrollo experimental de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich	29
II.2.3. Desarrollo experimental de las AuNPs sintetizadas en miliescala	30
II.3. Método de flujo continuo en una sola fase en microfluídica	32
II.3.1. Materiales y reactivos	32
II.3.2. Dispositivo microfluídico A1	32
II.3.3. Desarrollo experimental con el Dispositivo A1	33
II.3.4. Dispositivo microfluídico B1	34
II.3.5. Desarrollo experimental con el Dispositivo B1	35
II.4. Método de flujo continuo en una sola fase con cavitación	38
II.4.1. Materiales y equipos	38
II.4.2. Dispositivo microfluídico C1	39
II.4.3. Desarrollo experimental con el Dispositivo C1 de PDMS con cavitación	39
II.5. Flujo segmentado en dos fases: nanoemulsiones	41
II.5.1. Materiales y equipos	41
II.5.2. Desarrollo experimental con el Dispositivo C1 de PDMS para flujo segmentado en dos fases	41
II.6. Caracterización de los microchips de microfluídica	43

II.7. Caracterización de las nanopartículas de oro.....	44
II.7.1. Preparación de muestras para analizar espectros electrónicos de absorción en el espectrofotómetro en la región UV-Vis	44
II.7.2. Preparación de muestras para caracterizar el tamaño y polidispersidad de las nanopartículas de oro en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS).....	45
II.7.3. Preparación de muestras para caracterizar el tamaño y la morfología de las nanopartículas de oro en un microscopio electrónico de transmisión (TEM)	45
II.7.4. Construcción de los histogramas a partir de las micrografías usando el software Image J	45
III. RESULTADOS.....	51
III.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro	51
III.1.1. Método en batch o método de Turkevich convencional sintetizadas en macroescala	51
III.1.2. Espectros de absorción electrónica en la región del visible de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich.....	52
III.1.3. Estimación de la concentración de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich a diferentes diluciones.....	53
III.1.4. Caracterización del tamaño, distribución del tamaño y polidispersidad de AuNPs	58
III.1.5. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich utilizando DLS.....	59
III.1.6. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich.....	59
III.1.7. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich	61
III.2. Síntesis de nanopartículas de oro en miliescala	62
III.2.1. Análisis cualitativo de las nanopartículas de oro sintetizadas en miliescala	62
III.2.2. Espectros de absorción electrónica en la región visible para pruebas en miliescala a diferentes temperaturas.....	63
III.2.3. Espectros de absorción electrónica en la región visible para pruebas en miliescala a diferentes tiempos de reacción	64

III.2.4. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en miliescala a diferentes temperaturas utilizando DLS	66
III.2.5. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en miliescala a diferentes tiempos de reacción utilizando DLS	67
III.2.6. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción.....	68
III.3. Método de flujo continuo en una sola fase.....	70
III.3.1. Análisis cualitativo de experimentos con el microchip de microfluídica (Dispositivo A1).....	70
III.3.2. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo en una sola fase (Dispositivo A1).....	71
III.3.3. Espectros de absorción electrónica en la región visible de las AuNPs obtenidas por el método de flujo continuo en una sola fase (Dispositivo A1)	74
III.3.4. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo A1 utilizando DLS	75
III.3.5. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo A1.....	76
III.3.6. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase (Dispositivo B1)	78
III.3.7. Espectros de absorción electrónica en la región visible de las AuNPs obtenidas por el método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase (Dispositivo B1)	79
III.3.8. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo B1 utilizando DLS	80
III.3.9. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo B1	81
III.3.10. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo B1 ...	82
III.4. Método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)	84
III.4.1. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)	84

III.4.2. Espectro de absorción electrónica en la región visible correspondiente a la dispersión coloidal obtenida por el método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)	85
III.4.3. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo C1 utilizando DLS	86
III.4.4. Micrografías obtenidas por microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo C1 con cavitación.....	87
III.4.5. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo C1 con cavitación	88
III.5. Método de flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones)	89
III.5.1. Análisis cualitativo de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones) utilizando el Dispositivo C1	89
III.5.2. Distribución de la intensidad del tamaño de gota de las nanoemulsiones para experimentos en Dispositivo C1, utilizando DLS	90
III.6. Resumen de resultados para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs).....	93
CONCLUSIONES.....	94
PERSPECTIVAS	97
ANEXOS.....	98
AI. Tablas correspondientes a la elaboración de los histogramas de los tamaños de las AuNPs.....	98
REFERENCIAS	101

GLOSARIO

Top-down: Método de síntesis de nanopartículas de arriba hacia abajo.

Bottom-up: Método de síntesis de nanopartículas de abajo hacia arriba.

Re: Número de Reynolds.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

DLS: Dispersión Dinámica de Luz.

(ϕ): Diámetros hidrodinámicos.

UV-Vis: Ultravioleta Visible.

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión.

PDMS: Polidimetilsiloxano.

SPR: Resonancia de Plasmón Superficial.

λ_{spr} (nm): Longitud de onda en el pico máximo referente al plasmón superficial.

A_{spr} : Absorbancia en el pico máximo referente al plasmón superficial.

HF: Enfoque hidrodinámico

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre micro, nano y macroemulsión ⁴⁵.

Tabla 2. Síntesis de nanopartículas de oro fabricadas en dispositivos de microfluídica, usando HAuCl₄ como precursor en todos los casos ⁴⁹⁻⁵⁷.

Tabla 3. Resumen de resultados correspondientes a los espectros de absorción obtenidos por el método de Turkevich en macroescala a diferentes diluciones.

Tabla 4. Relación de absorbancias A_{523}/A_{450} correspondientes a los de resultados obtenidos por el método de Turkevich en macroescala a diferentes diluciones.

Tabla 5. Relación de valores de absorbancias A_{523}/A_{450} en función de los diámetros de partícula calculados a partir de la ecuación 10, usando los parámetros de ajuste para los resultados experimentales reportados en el artículo de Haiss y colaboradores ⁶⁰.

Tabla 6. Coeficientes de extinción molar (ϵ) a $\lambda=450$ nm para nanopartículas de oro en dispersión coloidal para diámetros de partícula desde 2 hasta 64 nm ⁶¹.

Tabla 7. Resumen de resultados correspondientes a la concentración de las AuNPs en mol/L para valores de coeficiente de extinción molar (ϵ) a $\lambda=450$ nm y absorbancias medidas a 450 nm (A_{450}).

Tabla 8. Resumen de resultados correspondientes a dos pruebas experimentales realizadas dentro de un microchip de microfluídica usando colorantes (azul y amarillo) introducidos a dos diferentes flujos y tiempos de residencia aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 °C a 100 °C, usando el *método de flujo continuo en una sola fase*.

Tabla 9. Resultados cualitativos correspondientes a la síntesis de AuNPs fabricadas en el interior del **Dispositivo A1** usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos (344.82 $\mu\text{L/h}$ y 172.34 $\mu\text{L/h}$) y tiempos de residencia (5 y 10 min) aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 °C.

Tabla 10. Resumen de resultados de síntesis de nanopartículas de oro fabricadas en diferentes reactores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimación del mercado a nivel global en miles de millones de USD para nanomateriales. Modificado de ³.

Figura 2. Métodos de fabricación de nanomateriales “de arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba”. Modificado de ⁵.

Figura 3. Comportamiento de la luz exhibido en una dispersión coloidal de nanopartículas de oro, mostrando el “efecto Tyndall” comparada con una disolución acuosa con colorante rojo que no presenta dicho fenómeno.

Figura 4. Mecanismo de síntesis de AuNPs por el método de Turkevich. Modificado de ¹⁵.

Figura 5. Evolución del tamaño de las nanopartículas de oro en función de: **A)** la relación molar $X=[\text{Citrato}]/[\text{Au}^{3+}]$ y **B)** del pH inicial de la reacción. La línea continua roja corresponde al modelo teórico de Kumar. Modificado de ¹⁶.

Figura 6. Ejemplo de síntesis de nanopartículas de plata en una plataforma microfluídica detectadas por una técnica espectroscópica (Raman) ²¹.

Figura 7. Ventajas en el uso de dispositivos de microfluídica: **Reducción de costos:** al realizar un mayor número de ensayos usando un volumen mínimo requerido de reactivos a comparación de los experimentos efectuados en macroescala. **Química verde:** aplicada hacia la disminución de contaminantes: al utilizar pequeños volúmenes de reactivos, se minimiza el riesgo cuando se realizan reacciones exotérmicas y/o explosivas que liberen gases o productos nocivos para la salud. También es posible reutilizar los dispositivos de microfluídica si las condiciones experimentales así lo permiten. **Monitoreo de los ensayos en tiempo real:** utilizando microchips fabricados con un material ópticamente transparente, es posible dar seguimiento a la reacción usando cámaras o microscopios. **Análisis en paralelo:** es posible miniaturizar los ensayos de tal forma que la instrumentación necesaria para llevarlos a cabo de una forma tradicional pueda acoplarse al uso de microchips de microfluídica ²².

Figura 8. Microchip de microfluídica fabricado con polidimetilsiloxano (PDMS) monitoreado por una cámara digital Dino Lite y analizado con el software Dino Capture 2.0.

Figura 9. Polidimetilsiloxano. **A)** estructura molecular del polímero, donde n es el número de unidades repetidas del monómero $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$. **B)** el catalizador activo de Pt (II) se coordina al alqueno $\text{RO}(\text{CH}_3)_2\text{Si}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La adición oxidativa de $\text{HSiCH}_3(\text{OR})_2$ al Pt, la inserción del alqueno al enlace Pt-H producido, y la eliminación reductiva de $\text{RO}(\text{CH}_3)_2\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)(\text{OR})_2$ resulta en el entrecruzamiento (agente de curado). Modificado de ²⁶.

Figura 10. Representación esquemática del flujo laminar y flujo turbulento. El número de Reynolds (Re) describe las características físicas del fluido en los canales de microfluídica. En flujo laminar ($\text{Re} < 2300$) las dos corrientes (fluido 1 y 2) se mueven en una sola dirección y se mezclan por difusión. En flujo turbulento ($\text{Re} > 4000$), los fluidos se mueven de forma aleatoria sin correlacionarse con la dirección del flujo. La región de transición ($2300 < \text{Re} < 4000$) tiene características de ambos tipos de flujo. Modificado de ²⁹.

Figura 11. A) Propagación axial de un fluido transportado en régimen laminar en el tiempo cero y B) distribución parabólica de la velocidad del fluido en tiempos mayores a cero. Modificado de ³¹.

Figura 12. Representación esquemática de una reacción química llevada a cabo en canales de microfluídica, donde una disolución del reactivo A (color rojo), intersecta con una disolución del reactivo B (color morado). Modificado de ³².

Figura 13. Distribución de la velocidad de flujo dentro de los canales de microfluídica aplicando enfoque hidrodinámico con flujo concéntrico. Modificado de ²⁸.

Figura 14. Ondas acústicas de sonido en canales de microfluídica. A) transmisión acústica generada por una burbuja atrapada dentro de una estructura de herradura colocada dentro de la cámara microfluídica. B) vórtices de corrientes circulares y elípticas en el fluido generadas por burbujas de cavitación. Modificado de ³⁸.

Figura 15. Proceso para generar burbujas de cavitación en disolución. Modificado de ⁴⁰.

Figura 16. Representación esquemática de una reacción química llevada a cabo en canales de microfluídica. Diferentes fluidos (A, B y C) miscibles entre sí (fase acuosa) se mezclan junto con una fase oleosa para formar microgotas, exhibiendo un mezclado rápido y homogéneo, donde no hay dispersión de los componentes a lo largo del microcanal. Modificado de ³².

Figura 17. Plataforma de microfluídica para sintetizar nanopartículas de oro, se observan dos microchips (1 y 2) fabricados con PDMS unidos con una tubería para que después de pasar por un micromezclador y un microreactor integrados las partículas queden integradas en las paredes de PDMS. Modificado de ⁴⁹.

Figura 18. Representación esquemática de la reducción de iones de Au y síntesis de AuNPs usando una micro atmósfera de plasma con helio (lado izquierdo). Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas: (a) sin agente reductor (b) agregando citrato de sodio 2.5 mM. Modificado de ⁵³.

Figura 19. Síntesis de nanopartículas de oro en forma de estrella en dispositivos de microfluídica. **Método 1:** Síntesis libre de surfactante, el dispositivo de microfluídica diseñado con 5 entradas para inyectar: semillas de AuNPs preformadas de 15 nm, ácido clorhídrico (HCl), disolución precursora de oro (HAuCl₄), disolución de nitrato de plata (AgNO₃) y ácido ascórbico (AA). **Método 2:** Síntesis llevada a cabo en dos etapas. El precursor de oro (HAuCl₄) se mezcla en microgotas junto con una disolución de polivinilpirrolidina (PVP) disuelta en dimetilformamida (DMF). Tras la reducción parcial de las especies de Au³⁺ con PVP, se inyectan a las microgotas semillas preformadas de AuNPs de 15 nm aplicando un voltaje de 600 V al dispositivo de microfluídica. (a) representación esquemática del diseño del microchip (b) imágenes correspondientes a los diferentes puntos en el microchip donde los números corresponden a los puntos señalados en (a). Modificado de ⁵⁷.

Figura 20. Diseño de un microchip impreso sobre un acetato en negativo.

Figura 21 Fabricación de un microchip de microfluídica usando la técnica de fotolitografía suave: **1)** Se deposita resina fotosensible SU8-3035 (MicroChem ®) sobre una oblea de silicio y se hace girar para generar una capa 50 μm de espesor, programando un equipo spin coater de la siguiente forma; **1.1)** 10 s a una rotación de 500 RPM **1.2)** 30 s a una rotación de 2000 RPM. **2)** Se transfiere el patrón del microchip desde la fotomáscara hasta la superficie de la oblea de silicio con la resina exponiéndola a la luz UV durante 45 s. **3)** Calentamiento de la oblea a 95 °C por 15 min (Post-Bake). **4)** El molde maestro se revela con acetato de 1-metoxi-2-propilo, agitándose durante 15 min para después hacer enjuagues con alcohol isopropílico. **5)** Relleno del molde con PDMS: agente curante (10: 0.9). **6)** Polimerización del molde sometido a calentamiento en el horno a 60 °C, durante 1 noche. **7)** El molde de PDMS se corta con ayuda de un bisturí y se perforan entradas y salidas. **8)** Pegado del microchip de PDMS a un portaobjetos de vidrio haciendo uso de una pistola efecto corona Tesla (1 minuto máximo). **9)** El microchip se cubre con cinta adhesiva, se introduce dentro del horno a 60 °C durante 1 día, después de este tiempo el microchip estará listo para usarse.

Figura 22. Representación de un molde maestro relleno con PDMS y agente curante en una proporción 10:0.9.

Figura 23. Corte con bisturí (Hergom) del microchip de microfluídica fabricado de PDMS.

Figura 24. Pegado del microchip fabricado con PDMS usando una descarga de plasma de oxígeno sobre: **A)** portaobjetos de vidrio, durante 50 s, **B)** microchip de microfluídica, durante 35 s. y **C)** adhesión del microchip a la superficie de vidrio.

Figura 25. Preparación de disoluciones: precursora de oro (0.526 mM pH= 3) y citrato de sodio (34 mM pH= 9). Calentamiento de la disolución precursora de oro en un vaso de precipitado que contenía un agitador magnético utilizando una parrilla de calentamiento.

Figura 26. Representación esquemática de la prueba en miliescala (1.0 mL), mezclando 500 μL de una disolución precursora de oro 1.08 mM y 500 μL de una disolución reductora de citrato de sodio 3.4 mM ([citrato]/[Au]=3.15), dentro de tubos Eppendorf ® de 1.5 mL. Los tubos (a), (b), (c) y (d), se calentaron a 50, 60, 70 y 80 °C, respectivamente.

Figura 27. Representación esquemática de la prueba en miliescala (1.0 mL), mezclando 500 μL de una disolución precursora de oro 1.08 mM y 500 μL de una disolución reductora de citrato de sodio 3.4 mM ([citrato]/[Au]=3.15), dentro de tubos Eppendorf ® de 1.5 mL. Los tubos (e), (f), (g) y (h), se calentaron durante 5, 10, 15 y 20, respectivamente, a T= 60 °C.

Figura 28. Dispositivo de microfluídica **A1** diseñado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase*. Entradas del microchip señaladas como (i1, i2, i3 e i4) y salida indicada como (s). Volumen del serpentín igual a 28 μL .

Figura 29. Diseño experimental de la síntesis de AuNPs en canales de microfluídica (**Dispositivo A1**) por el método de *flujo continuo en una sola fase* usando disoluciones precursoras de oro (1.08 mM) y disoluciones de citrato (3.4 mM) trabajando a dos diferentes flujos totales: **1)** 172.34 $\mu\text{L}/\text{h}$ (43.09 $\mu\text{L}/\text{h}$ cada bomba) y **2)** 344.82 $\mu\text{L}/\text{h}$ (86.21 $\mu\text{L}/\text{h}$ cada bomba), aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 °C.

Figura 30. Dispositivo de microfluídica **B1** utilizado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase con enfoque hidrodinámico*. Entradas del microchip señaladas como (i1 e i2), punto de convergencia (m) y salida indicada como (s). Volumen del serpentín igual a 2.5 μ L.

Figura 31. Diseño experimental de las AuNPs en canales de microfluídica (**Dispositivo B1**) por el método de *flujo continuo en una sola fase con enfoque hidrodinámico* usando disoluciones precursoras de oro (1.08 mM) y disoluciones de citrato (3.4 mM) trabajando a dos diferentes flujos totales: **1)** 500 μ L/h (250 μ L/h cada bomba) y **2)** 1000 μ L/h (500 μ L/h cada bomba) aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 °C. Colocando un serpentín a la salida del microchip sumergido en un vaso de precipitados a una temperatura de 90° C.

Figura 32. Representación esquemática de la plataforma microfluídica diseñada para el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*. El microchip fabricado de PDMS y el transductor piezoeléctrico tipo Langevin se adhieren al mismo portaobjetos de vidrio. Figura hecha por Erick Nieves (2018).

Figura 33. Dispositivo de microfluídica **C1** utilizado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación y flujo segmentado en dos fases*. Entradas del microchip señaladas como (**i1, i2, i3 e i4**), punto de convergencia (m) y salida indicada como (s). Volumen del serpentín igual a 2.5 μ L.

Figura 34. Representación esquemática del diseño experimental de la síntesis de AuNPs oro en canales de microfluídica por el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación* usando disoluciones precursoras de oro 1.08 mM y disoluciones de citrato 3.4 mM mezcladas en una relación de flujo 1:1. Uso de piezoeléctrico tipo Langevin, el cual opera a una frecuencia de 61 KHz. La figura del piezoeléctrico pegada al chip fue elaborada por Erick Nieves (2018).

Figura 35. Representación esquemática del diseño experimental, caso **b)** de la síntesis de nanopartículas de oro en canales de microfluídica por el *método de flujo segmentado en dos fases* usando una disolución precursora de oro 0.5 mM y una disolución de citrato 1.7 mM para la fase acuosa, mientras que, para la fase oleosa, se utilizaron 1 mL de hexadecano puro y hexadecano mezclado con span 80 al 0.1 %. La relación aceite:agua fue de 9:1. La figura del piezoeléctrico pegada al chip fue elaborada por Erick Nieves (2018).

Figura 36. Diagrama del proceso de corte del microchip (**Dispositivo A1**) para su posterior caracterización. Se observan cortes transversales (primer y segundo corte) de los microcanales observados con la cámara Phantom®, usando el objetivo 20x.

Figura 37. Imagen tomada con la cámara Phantom® de la retícula microscópica (5 mm) empleada para la caracterización de los microchips (objetivo 20x).

Figura 38. Caracterización del microchip (**Dispositivo A1**), medidas representativas de: **A)** canal serpentín exhibiendo la anchura de los microcanales. **B)** corte transversal donde se muestran las alturas de los microcanales.

Figura 39. Cambios de coloración presentes en la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich en macroescala (100 mL) y dispersión coloidal color rojo borgoña que contiene AuNPs.

Figura 40. Espectros de absorción electrónica en la región del visible tomados de una muestra de AuNPs fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala (100 mL) a diferentes diluciones.

Figura 41. Correlación entre la absorbancia (523 nm) y la concentración relativa de muestras de AuNPs fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala a diferentes diluciones.

Figura 42. Posición de la señal del pico de resonancia de plasmón superficial (λ_{spr}) en función del ϕ de partícula de las AuNPs en dispersión coloidal: Calculadas (círculo); experimentalmente medidas (triángulo hacia abajo), AuNPs comerciales (triángulo hacia arriba). Se realizó un ajuste exponencial para los datos calculados (línea punteada) y experimentales (línea continua) para $d > 25$ nm⁶⁰.

Figura 43. (a) Relación de valores de absorbancia de AuNPs esféricas en dependencia con su diámetro (nm). (b) Cociente de la absorbancia de las AuNPs referente al plasmón superficial (A_{spr}) y el valor del pico máximo de absorbancia a 450 nm (A_{450}) en dependencia con el logaritmo natural del diámetro de partícula: Valores calculados (esferas) vs. valores experimentales (triángulos). Ajuste de los datos calculados (línea punteada) y de los datos experimentales (línea sólida)⁶⁰.

Figura 44. Correlación entre la absorbancia (450 nm) y la concentración relativa de muestras de nanopartículas de oro (AuNPs) fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala a diferentes diluciones.

Figura 45. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala, correspondiente a la *muestra 3* (dilución 0.1) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS). La gráfica representa el promedio de tres mediciones de la misma muestra.

Figura 46. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra 1*) de la dispersión coloidal de AuNPs, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala.

Figura 47. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra 3*) de la dispersión coloidal de nanopartículas de oro, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala.

Figura 48. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala tomando una muestra representativa de 60 AuNPs de la *muestra 3*, con un diámetro promedio igual a 15.6 ± 4.4 nm.

Figura 49. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas en miliescala a 4 diferentes temperaturas: a) 50 °C, b) 60 °C, c) 70 °C, d) 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min).

Figura 50. Dispersiones coloidales de nanopartículas de oro sintetizadas en miliescala a 4 diferentes tiempos: e) 5 min, f) 10 min, g) 15 min, h) 20 min. Sintetizadas a una misma temperatura de reacción (60 °C).

Figura 51. Espectros de absorción electrónica en la región visible de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes temperaturas: a) 50 °C, b) 60 °C, c) 70 °C, d) 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min), analizadas a diferentes diluciones.

Figura 52. Espectros de absorción electrónica en la región visible de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción: a) 5 min, b) 10 min, c) 15 min, d) 60 min para una misma temperatura (60 °C), analizadas a diferentes diluciones.

Figura 53. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes temperaturas: **a)** 50 °C **b)** 60 °C **c)** 70 °C **d)** 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS).

Figura 54. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción: **e)** 5 min **f)** 10 min **g)** 15 min **h)** 20 min a una misma temperatura (60 °C) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS).

Figura 55. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra d*) de una dispersión coloidal de AuNPs, sintetizadas en miliescala a 80 °C y 20 min de reacción.

Figura 56. Pruebas experimentales con el **Dispositivo A1**, introduciendo colorantes dentro de un microchip de microfluídica. En esta prueba se introdujo un flujo total de 172.34 $\mu\text{L/h}$ para un tiempo de 10 min de residencia dentro de los microcanales, sometiendo a calentamiento directo el dispositivo de microfluídica.

Figura 57. Síntesis de AuNPs por el *método de flujo continuo en una sola fase*, llevada a cabo dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) manejando un flujo total de 344.82 $\mu\text{L/h}$ para un tiempo de 5 min de residencia dentro de los microcanales. **A)** Cuando la temperatura se encuentra entre los 25 – 50 °C, los microcanales de PDMS, que son originalmente transparentes, comienzan a tomar una coloración oscura después del paso constante de los reactivos (20 min). **B)** A partir de los 60 °C, conforme transcurre el tiempo (20 min aproximadamente) en el cual los reactivos continúan difundiendo dentro del microchip, la coloración de los microcanales se hace más evidente, sobre todo del lado donde se introduce la disolución precursora de oro. **C)** A una temperatura de 70 °C, el fluido a la salida del microchip se colectó y se observó una dispersión morada pálida. **D)** y **E)** Cuando la temperatura es de 80 °C, después de estar funcionando el microchip 60 min se empezó a observar la presencia de grandes depósitos de Au⁰ en los microcanales de microfluídica. **F)** Al elevar la temperatura (80 °C) el disolvente comienza a evaporarse, apreciándose la formación de burbujas.

Figura 58. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **i)** 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min, **j)** 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

Figura 59. Espectros de absorción electrónica en la región visible correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**), usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **i)** 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min y **j)** 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

Figura 60. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase*. **i)** 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min **j)** 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

Figura 61. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra (*muestra i*) de una dispersión coloidal de AuNPs dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) para un flujo total igual a 344.82 $\mu\text{L/h}$ y un tiempo de residencia de 5 min.

Figura 62. Plataforma microfluídica utilizando **Dispositivo B1**, para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase*. Entradas del microchip señaladas como (i1 e i2) y salida indicada como (s). Serpentín fabricado de PTFE sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 63. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 64. Espectros de absorción electrónica en la región visible correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 65. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 66. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra k*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 67. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra l*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 68. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs (*muestra l*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, con un diámetro promedio igual a 16.6 ± 2.4 nm.

Figura 69. Plataforma microfluídica utilizando el **Dispositivo C1**, para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*. Entradas del microchip señaladas como (i1, i2, i3 e i4) y salida indicada como (O). Serpentín fabricado de PTFE sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 70. Dispersión coloidal de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 71. Espectro de absorción electrónica en la región visible correspondientes a la dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 72. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondiente a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 73. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Figura 74. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, con un diámetro promedio de 17.2 ± 3.4 nm.

Figura 75. Emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases* donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (25 °C). **o**) La emulsión generada en el microchip fue recolectada en un tubo Eppendorf® que fue sumergido simultáneamente en un vaso de precipitado donde se mantenía en calentamiento constante (90 °C).

Figura 76. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a las emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases*, donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (25 °C). **o**) La emulsión generada en el microchip fue recolectada en un tubo Eppendorf® que fue sumergido simultáneamente en un vaso de precipitado donde se mantenía en calentamiento constante (90 °C) durante 40 minutos. Ambas muestras diluidas con hexadecano 10 veces.

Figura 77. Distribución de la intensidad del tamaño de gota e índice de polidispersidad (PDI) correspondiente a una emulsión sintetizada dentro con un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases* donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (22 °C). La muestra fue diluida 100 veces con hexadecano.

Figura 78. Separación de fases de emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica, aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases*. En la fotografía se observa el cuarto y último lavado con hexadecano para cada una de las muestras **3A**, **4A**, **5A** y **6A**.

RESUMEN

La síntesis de Turkevich (1951) ha sido utilizada ampliamente como un método de referencia para sintetizar nanopartículas de oro (AuNPs) con tamaños que van de 10 a 100 nm. Estas nanoestructuras son reconocidas por sus propiedades optoelectrónicas únicas a esta escala, por lo que han sido utilizadas para construir celdas fotovoltaicas, sensores ópticos, como agentes terapéuticos y también en la liberación de fármacos, entre otros. Controlar el tamaño, la forma, así como evitar la aglomeración de las AuNPs, continúa siendo un reto en la actualidad. La microfluídica es una disciplina científica que estudia sistemas capaces de mover y controlar pequeños volúmenes de fluido, entre los 10^{-6} y 10^{-12} litros, dentro de redes de microcanales con diámetros entre 10 y 1000 μm . En este trabajo se planteó utilizar dispositivos de microfluídica para diseñar protocolos que permitan sintetizar AuNPs con una baja polidispersidad en cuanto a su tamaño. Para ello, se utilizaron 3 diferentes microchips de microfluídica fabricados a base de polidimetilsiloxano (PDMS), un polímero transparente e inerte.

En el interior de los dispositivos mencionados, se llevó a cabo la síntesis de las AuNPs aplicando cuatro diferentes técnicas de microfluídica: **a)** mezclado por difusión simple en una sola fase, **b)** mezclado por difusión con enfoque hidrodinámico para una sola fase, **c)** mezclado turbulento en una sola fase con cavitación y **d)** flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones). Las nanopartículas de oro que se obtuvieron fueron caracterizadas y comparadas con AuNPs sintetizadas en nuestro laboratorio por el método de Turkevich, usando las siguientes técnicas: espectroscopía de absorción electrónica en el intervalo del visible; dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Este estudio permitió encontrar condiciones experimentales para sintetizar AuNPs dentro de dispositivos de microfluídica 50% menos polidispersas en cuanto a su tamaño en comparación con aquellas fabricadas en nuestro laboratorio por el método tradicional de Turkevich, además de observar por medio de micrografías formas esféricas mejor definidas y menos aglomeradas entre sí.

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar y comparar metodologías novedosas para sintetizar nanopartículas de oro coloidal utilizando dispositivos de microfluídica que permitan obtener nanopartículas con una menor polidispersidad que las producidas por un método tradicional en macroescala (método de Turkevich).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sintetizar nanopartículas de oro coloidal:
 - 1) Utilizando el método de Turkevich tradicional en macroescala (100 mL).
 - 2) En canales de microfluídica con el propósito de comparar diferentes técnicas:
 - a) flujo continuo en una sola fase, aplicando el enfoque hidrodinámico
 - b) flujo continuo en una sola fase con cavitación
 - c) flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones)
- Caracterizar el tamaño y la polidispersidad las nanopartículas de oro obtenidas en cada método de síntesis por: espectroscopía de absorción electrónica en la región del visible; dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

I. GENERALIDADES

I.1. Nanociencia y Nanotecnología

La nanotecnología es un término que engloba el conjunto de ciencias y técnicas que se aplican a escala atómica, molecular y para materiales que presentan propiedades diferentes en esas escalas, comparados con los mismos materiales en escala macromolecular. El desarrollo de esta disciplina se produce a partir de las propuestas de Richard Feynman, galardonado con un premio Nobel de Física, quien es considerado el padre de la “nanociencia”. En 1959 este científico propuso fabricar productos con base en un reordenamiento de átomos y moléculas¹.

Un nanomaterial se define como un material, ya sea de origen natural, secundario o fabricado que contiene partículas donde al menos una de sus dimensiones se encuentra en el intervalo de tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm², y que además presente propiedades diferentes en esa escala comparados con el mismo material en escala macromolecular.

En los últimos años, los sectores públicos y privados en todo el mundo han invertido una gran cantidad de dinero para realizar investigación básica en nanotecnología. Cada día hay más empresas que incorporan el uso de nanomateriales en sus productos, como consecuencia, la inversión estimada a nivel global hasta el 2010 fue de 1,700 millones de USD, y se espera que la cifra llegue a 55,000 millones de USD en el 2022 (**Figura 1**)³.

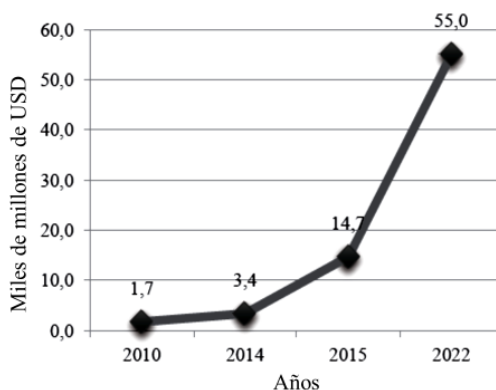


Figura 1. Estimación del mercado a nivel global en miles de millones de USD para nanomateriales. Modificado de³.

Muchos tipos de nanomateriales han sido estudiados y diseñados con diferentes propósitos, aprovechando las propiedades ya sean mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas, entre otras que estos materiales exhiben, las cuales difieren a las que presenta el mismo material en escala macroscópica. Debido a ello, han sido aplicados en muchas áreas, desde medicina, para aumentar la solubilidad de medicamentos o para obtener imágenes más precisas en zonas tumorales. En electrónica se utilizan para mejorar el almacenamiento de datos y, en el sector energético, se trabaja con ellos en baterías de litio para dispositivos portátiles. Así mismo, sirven para elaborar productos de consumo masivo como filtros UV en cremas solares, entre otros².

I.2. Métodos de síntesis de nanomateriales

En general, los métodos de síntesis para obtener nanopartículas se pueden clasificar en dos categorías “de arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba” (**Figura 2**). La primera técnica parte de un material en bulto el cual contiene el compuesto de interés. Al aplicar energía al sistema, ya sea en forma mecánica, química, térmica o incluso irradiación láser, los enlaces intermoleculares del material se rompen para formar pequeños fragmentos cuya distribución de tamaños resulta poco homogénea. Para optimizar este método, se requiere el uso de instrumentación compleja y procesos costosos, por lo tanto, en la mayoría de los casos se prefiere utilizar la segunda aproximación, la cual consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en fase gaseosa o en disolución. De acuerdo con Zanella ⁴, este último enfoque es el más eficaz para obtener nanopartículas uniformes y de menor tamaño.

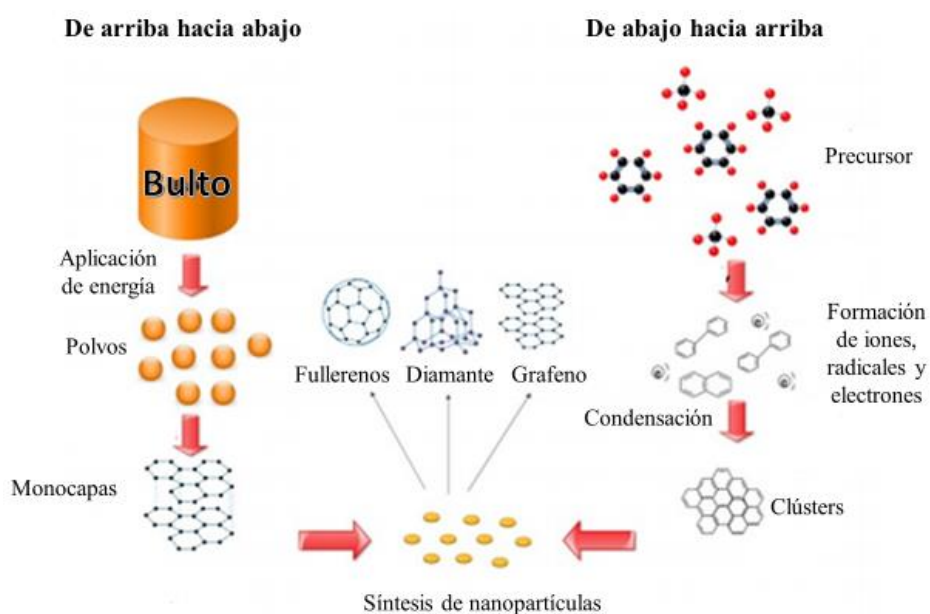


Figura 2. Métodos de fabricación de nanomateriales “de arriba hacia abajo” y “de abajo hacia arriba”. Modificado de ⁵.

I.2.1 Síntesis de nanopartículas metálicas en dispersión por el método coloidal

Una de las técnicas “de abajo hacia arriba” más reconocidas para la fabricación de nanopartículas metálicas en dispersión, consiste en el método coloidal. Un coloide es una mezcla compuesta por partículas microscópicas de una sustancia que se encuentran dispersas y suspendidas en una fase continua. Los tamaños de las partículas presentes en una dispersión coloidal son más grandes que las dimensiones atómicas (iones o pequeñas moléculas) pero lo suficientemente pequeñas para permanecer suspendidas en el líquido por tiempos indefinidos y presentar movimiento browniano. Típicamente los tamaños de las partículas coloidales suelen oscilar entre 1 y 100 nm ⁴.

Las nanopartículas metálicas en dispersión exhiben un fenómeno conocido como “efecto Tyndall”, el cual se puede apreciar como una dispersión de un haz de luz cuando este irradia la muestra. El comportamiento de la luz será diferente cuando se tiene una solución ⁶. Lo anterior se ejemplifica en la **Figura 3**, donde se muestra una láser que incide sobre una disolución acuosa con que contiene un colorante rojo y esta se compara con una dispersión coloidal de nanopartículas de oro.



Figura 3. Comportamiento de la luz exhibido en una dispersión coloidal de nanopartículas de oro, mostrando el “efecto Tyndall” comparada con una disolución acuosa con colorante rojo que no presenta dicho fenómeno.

Gracias a este fenómeno y al movimiento browniano que presentan las nanopartículas metálicas, es posible caracterizar los radios o diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas de oro en dispersión por medio de un equipo que determina la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), tal como se muestra más adelante en este trabajo de investigación.

El método coloidal utilizado para sintetizar nanopartículas, consiste en disolver una sal del precursor metálico que contiene el elemento a reducir junto con un agente reductor y un estabilizante en una fase continua. Al entrar en contacto, el agente reductor, reduce la sal metálica hasta el estado de oxidación cero del metal. De forma instantánea, comienza la nucleación, ya sea por colisión de los átomos (choques) o por autocatálisis donde un catión metálico se reduce hacia la superficie de un átomo aislado. Ambos procesos forman agrupaciones de átomos conocidos como “clústers”, los cuales tenderán a crecer hasta formar las nanopartículas. Dicho crecimiento solo puede ser detenido al agregar un agente estabilizante que rodea a las nanopartículas para evitar un crecimiento descontrolado. En algunas ocasiones, el agente reductor desempeña también el papel de agente estabilizante ⁴.

I.3. Nanopartículas de oro

Dentro de los nanomateriales manufacturados más comúnmente se encuentran las nanopartículas metálicas, como son las de oro o plata, así como la aleación de platino/paladio las de mayor producción ⁷. Especialmente, las nanopartículas de oro (*AuNPs*, por sus siglas en inglés), han sido usadas para desarrollar celdas solares cuando al ser recubiertas con materiales semiconductores, pueden producir hidrógeno a partir de la electrólisis del agua hasta cuatro veces más eficientemente que otros métodos ⁸. En medicina se utilizan para tratar con eficacia algunos tumores cancerígenos, como es el caso del cáncer de próstata cuyo tratamiento con AuNPs permite la liberación de grandes cantidades de calor producido por la absorción de luz, provocando la ruptura de las membranas celulares y la muerte de células cancerígenas ⁹. En el campo de la química y la biología, se usan como biosensores gracias a sus propiedades ópticas, así como en electrónica por ser buenos conductores ¹⁰⁻¹², por lo que su síntesis, estudio y aplicación es de gran interés.

I.3.1 Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich

En 1951 Turkevich y colaboradores reportaron el primer método estándar y reproducible para la preparación de coloides metálicos de oro (partículas de 20 nm de diámetro) al reducir $[\text{AuCl}_4^-]$ con citrato de sodio ¹³. Este procedimiento consiste en reducir una sal precursora que contiene oro en disolución. El caso más común es la reducción del ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) a 100 °C utilizando un agente reductor como el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) y que además actúa como un agente protector (*capping agent* en inglés) y estabilizador porque evita la coalescencia y el crecimiento descontrolado de las nanopartículas ¹⁴. Cuando se añade el citrato, los iones de oro Au^{3+} son parcialmente reducidos hasta átomos de oro neutro Au^0 , dando pie a la formación de clústers, los cuales a su vez producen “semillas” de Au cuyos tamaños son estables, con radios de aproximadamente 1.5 nm (~840 átomos). Los iones de oro restantes son atraídos y atrapados como co-iones en la doble capa electrónica (*EDL*, por sus siglas en inglés) correspondiente a las semillas. Posteriormente, la reducción del oro iónico ocurre, primero de forma lenta y luego rápida, cuando los monómeros de oro crecen exclusivamente en la parte superior de las superficies de las semillas ya existentes, hasta que el precursor (HAuCl_4) se consume por completo. Takiyama y colaboradores demostraron experimentalmente que el número de semillas de partículas formadas durante el inicio de la reacción permanece constante tras pasar esta fase inicial (**Figura 4**) ¹⁵.

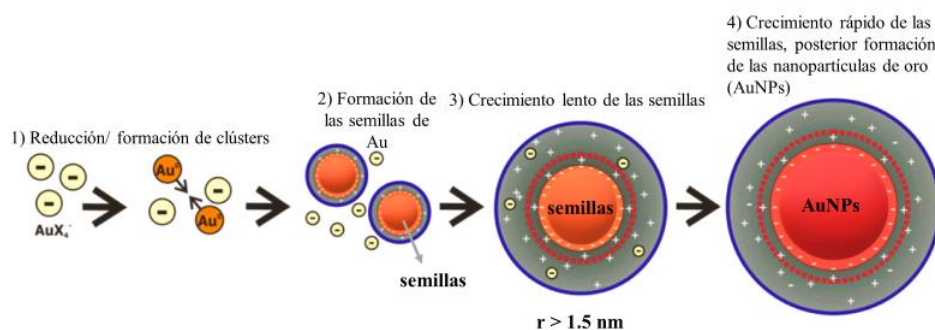


Figura 4. Mecanismo de síntesis de AuNPs por el método de Turkevich. Modificado de ¹⁵.

Diversos autores han tratado de determinar los parámetros que definen el tamaño final de las nanopartículas de oro ¹⁵, incluyendo un artículo publicado por Shi y colaboradores ¹⁶ quienes realizaron un estudio para conocer la correspondencia entre el tamaño de las AuNPs y su relación molar con el citrato de sodio ($X=[\text{Citrato}]/[\text{Au}^{3+}]$). Los autores sintetizaron nanopartículas de oro utilizando diferentes relaciones de X , sus resultados fueron comparados con publicaciones de diversos artículos experimentales, además de un modelo teórico (modelo de Kumar) (**Figura 5-A**) ¹⁶. Se demostró que el tamaño de las nanopartículas disminuye, así como su polidispersidad cuando la relación X se incrementa entre 1 y 20. Además, cualitativamente observaron que cuando el valor de X era menor a 3.5 ($X < 3.5$) obtenían nanopartículas grandes y polidispersas, mientras que a valores iguales o mayores a 3.5 ($X \geq 3.5$) eran más pequeñas y monodispersas. Esta observación está relacionada con los cambios de pH presentes en la reacción de reducción (**Figura 5-B**). Para $X \geq 3.5$ existe un desplazamiento rápido (30 s) de los iones oro $[\text{AuCl}_4]^-$ hacia las especies menos reactivas $[\text{AuCl}_{3-x}(\text{OH})_{1+x}]$, debido al aumento de pH cuando se agrega el citrato. Por el contrario, cuando $X < 3.5$, la reacción inicia a menores valores de pH y el número de mol de citrato no es suficiente para desplazar el equilibrio hacia las especies menos reactivas de oro, de ahí el mayor tamaño y polidispersidad de las nanopartículas.

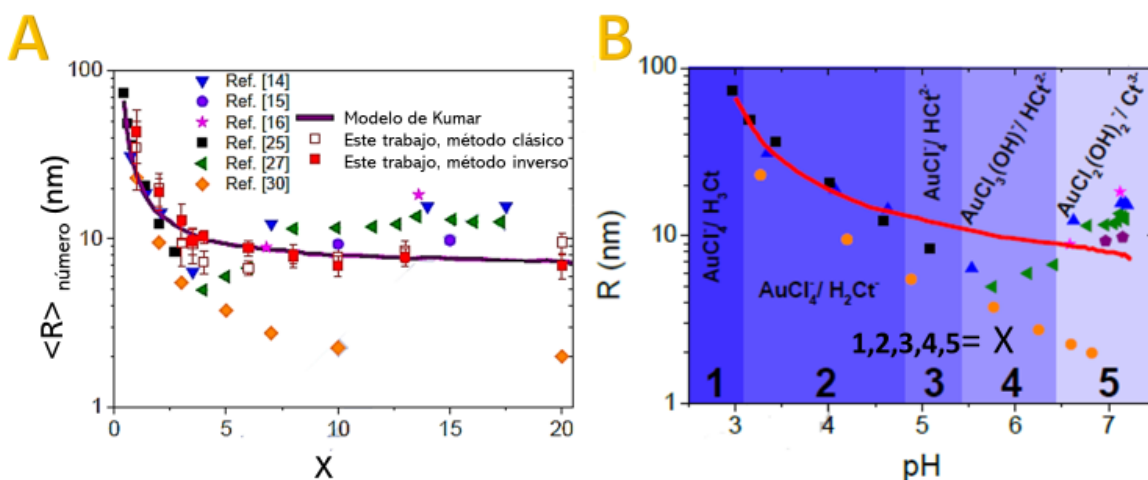


Figura 5. Evolución del tamaño de las nanopartículas de oro en función de: **A)** la relación molar $X=[\text{Citrato}]/[\text{Au}^{3+}]$ y **B)** del pH inicial de la reacción. La línea continua roja corresponde al modelo teórico de Kumar. Modificado de ¹⁶.

Existen otros agentes reductores como el borohidruro de sodio (NaBH_4) ¹⁷ o el ácido ascórbico (AA) ¹⁸, los cuales han demostrado alta efectividad además de velocidades rápidas de nucleación del oro. Sin embargo, el uso de citrato de sodio como reductor y estabilizante sigue vigente, gracias a su bajo costo, así como bajos niveles de toxicidad y a la facilidad que se tiene para funcionalizar las nanopartículas de oro una vez que se han sintetizado con este agente protector que a su vez actúa como mediador de pH ¹⁹, motivo por el cual en este trabajo se busca perfeccionar y comprender a profundidad este método.

I.4. Microfluídica

A pesar de que existen numerosos artículos que han reportado metodologías para la síntesis de nanopartículas de oro y otros metales en dispersión coloidal, continúa siendo un reto controlar el tamaño, la forma o morfología y la estabilidad a largo plazo de estas nanoestructuras. Una de las metodologías más recientes para superar estos retos es la síntesis controlada de nanopartículas utilizando microfluídica.

La microfluídica es una disciplina científica que trata con fluidos que pasan a través de canales que miden entre 10 y 1000 micras de diámetro²⁰. Se define como ciencia, ya que estudia el comportamiento y propiedades de pequeños volúmenes de fluido que están entre 10^{-6} y 10^{-12} L, mientras que el aspecto tecnológico se refiere a las múltiples aplicaciones que se han desarrollado a partir de este estudio.

Uno de los principales objetivos de la microfluídica consiste en la miniaturización y automatización de ensayos o procesos que regularmente se efectúan en macroescala, ya sea en un laboratorio o en el sector industrial. Un ejemplo de esto es la integración de varios canales fluídicos en un solo dispositivo para efectuar la síntesis química de algún compuesto, seguido de su separación, caracterización, o incluso su identificación por técnicas espectroscópicas (**Figura 6**)²¹.

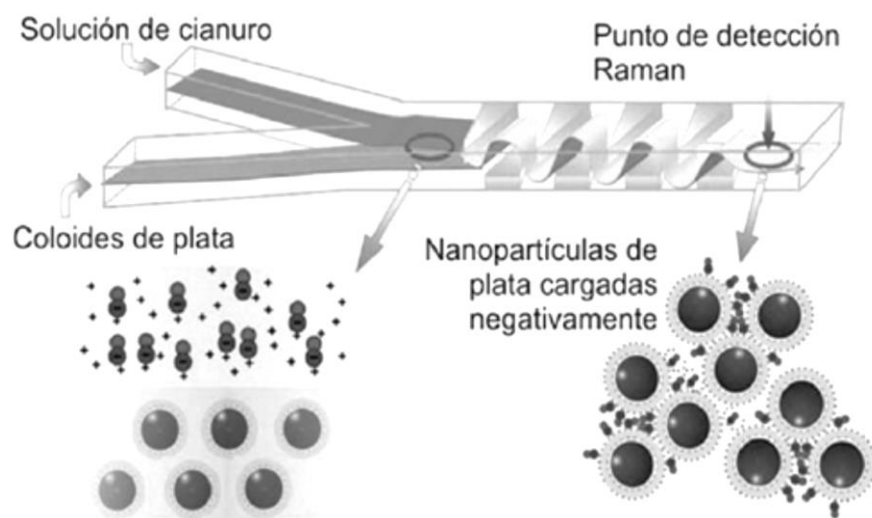


Figura 6. Ejemplo de síntesis de nanopartículas de plata en una plataforma microfluídica detectadas por una técnica espectroscópica (Raman)²¹.

En los años recientes la fabricación de dispositivos de microfluídica para aplicaciones médico-biológicas y/o químicas ha ido ganando cada vez mayor relevancia gracias a las diversas ventajas que se presentan al miniaturizar sistemas fluídicos (**Figura 7**).

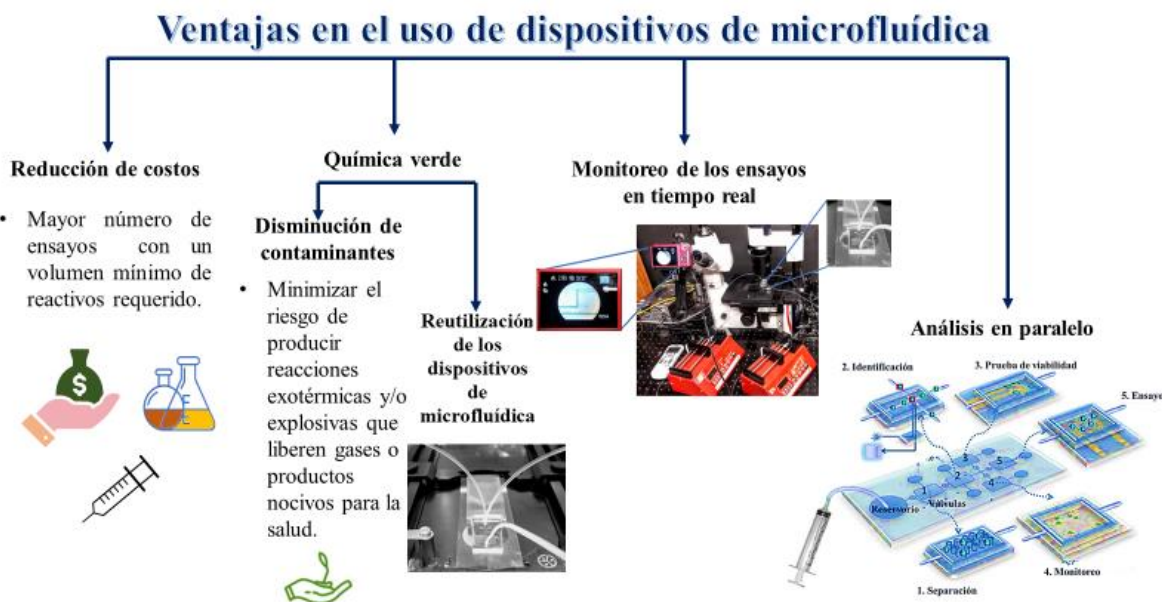


Figura 7. Ventajas en el uso de dispositivos de microfluídica: **Reducción de costos:** al realizar un mayor número de ensayos usando un volumen mínimo requerido de reactivos a comparación de los experimentos efectuados en macroescala. **Química verde:** aplicada hacia la disminución de contaminantes: al utilizar pequeños volúmenes de reactivos, se minimiza el riesgo cuando se realizan reacciones exotérmicas y/o explosivas que liberen gases o productos nocivos para la salud. También es posible reutilizar los dispositivos de microfluídica si las condiciones experimentales así lo permiten. **Monitoreo de los ensayos en tiempo real:** utilizando microchips fabricados con un material ópticamente transparente, es posible dar seguimiento a la reacción usando cámaras o microscopios. **Análisis en paralelo:** es posible miniaturizar los ensayos de tal forma que la instrumentación necesaria para llevarlos a cabo de una forma tradicional pueda acoplarse al uso de microchips de microfluídica ²².

I.4.1. PDMS

El polidimetilsiloxano (PDMS) es uno de los polímeros más utilizados en la fabricación de los microchips de microfluídica debido a: su bajo costo, sus propiedades elásticas, su nula o baja toxicidad, no ser inflamable y sus propiedades químicas que generalmente le confieren estabilidad ²³. Cabe resaltar que, al ser un material ópticamente transparente para longitudes de onda entre 235 y 1100 nm ²⁴, es compatible con técnicas de detección en la región del UV-Vis. Esto permite monitorear los ensayos en tiempo real y sin interferencias gracias al uso de cámaras y/o microscopios que se adaptan de tal forma que los experimentos puedan ser analizados en una computadora (**Figura 8**).



Figura 8. Microchip de microfluídica fabricado con polidimetilsiloxano (PDMS) monitoreado por una cámara digital Dino Lite y analizado con el software Dino Capture 2.0.

La fórmula química de este polímero es $(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, donde n es el número de unidades repetidas del monómero $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$ (**Figura 9-A**) ²³. Comercialmente el PDMS que se utiliza para fabricar dispositivos de microfluídica se conoce como Sylgard® 184 (Dow Corning) y se vende en dos componentes: una base de polímero que contiene PDMS con terminaciones de vinil-dimetil siloxano ($-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$) y un agente de curado que contiene PDMS con algunos grupos silanos o hidruros $\text{SiH}(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}[\text{SiR}(\text{CH}_3)\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ donde $\text{R} = \text{CH}_3$ ó H y un catalizador de platino. Al mezclarse los dos componentes, el compuesto de platino cataliza la reacción entre el grupo funcional vinilo de la base del monómero ($\text{SiCH}=\text{CH}_2$) y el grupo funcional hidruro (SiH) presente en el agente de curado, resultando en el entrecruzamiento de las cadenas de PDMS y la eventual solidificación de la mezcla, la cual generalmente se utiliza en un proporción de 10:1 (base:agente curante) (**Figura 9-B**) ²⁵.

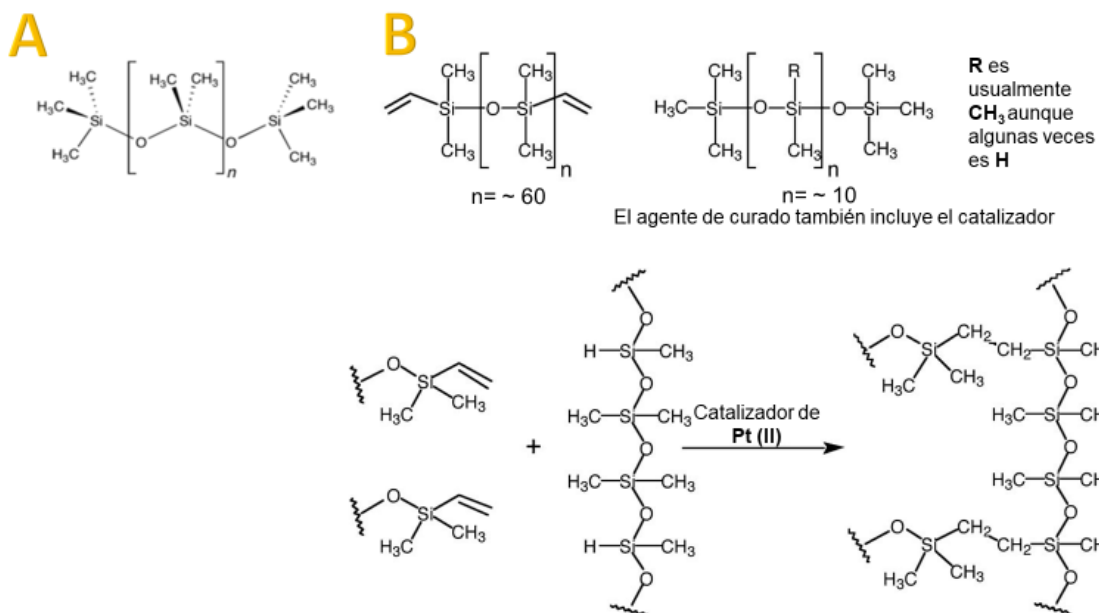


Figura 9. Polidimetilsiloxano. **A)** estructura molecular del polímero, donde n es el número de unidades repetidas del monómero $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]$. **B)** el catalizador activo de Pt (II) se coordina al alqueno $\text{RO}(\text{CH}_3)_2\text{Si}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La adición oxidativa de $\text{HSiCH}_3(\text{OR})_2$ al Pt, la inserción del alqueno al enlace Pt-H producido, y la eliminación reductiva de $\text{RO}(\text{CH}_3)_2\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)(\text{OR})_2$ resulta en el entrecruzamiento (agente de curado). Modificado de ²⁶.

I.4.2. Régimen hidrodinámico en dispositivos de microfluídica

El comportamiento de un fluido dentro de los canales de microfluídica puede presentar dos tipos de régimen hidrodinámico: laminar o turbulento. El tipo de régimen se puede predecir utilizando un número adimensional conocido como el número de Reynolds (Re), el cual representa la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas en un fluido ²⁷.

$$Re = \frac{\text{Fuerzas Inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho V_0 D_0}{\mu} \dots (1)$$

Donde:

ρ = Densidad del fluido

V_0 = Velocidad del fluido en el canal

D_0 = Diámetro del canal

μ = Viscosidad del fluido

Cuando el número de Reynolds (Re) es menor a 2300, el flujo es laminar y cuando el Re es mayor a 4000, el flujo es turbulento (**Figura 10**). Derivado de la ecuación (1), se observa que cuando el diámetro del canal disminuye, así como la velocidad del fluido, el número de Reynolds será menor. Este caso es común observarlo en los dispositivos de microfluídica, ya que, al trabajar en escala microscópica con velocidades bajas y diámetros característicos del orden de micrómetros, Re es generalmente menor a 100 garantizando un flujo totalmente laminar ²⁸.

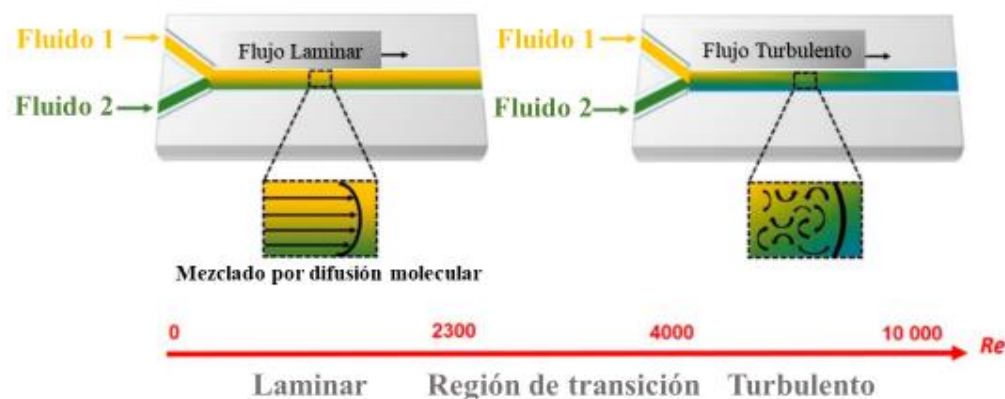


Figura 10. Representación esquemática del flujo laminar y flujo turbulento. El número de Reynolds (Re) describe las características físicas del fluido en los canales de microfluídica. En flujo laminar ($Re < 2300$) las dos corrientes (fluido 1 y 2) se mueven en una sola dirección y se mezclan por difusión. En flujo turbulento ($Re > 4000$), los fluidos se mueven de forma aleatoria sin correlacionarse con la dirección del flujo. La región de transición ($2300 < Re < 4000$) tiene características de ambos tipos de flujo. Modificado de ²⁹.

Cabe resaltar que, cuando un fluido se transporta en régimen laminar a través de un canal, su velocidad después del tiempo cero en las zonas cercanas a las paredes del canal es menor (v_{\min}) con respecto a la velocidad alcanzada en la parte central (v_{\max}), lo que resulta en una distribución parabólica de la velocidad del fluido impulsado por presión (flujo de Poiseuille) (Figura 11) ³⁰.

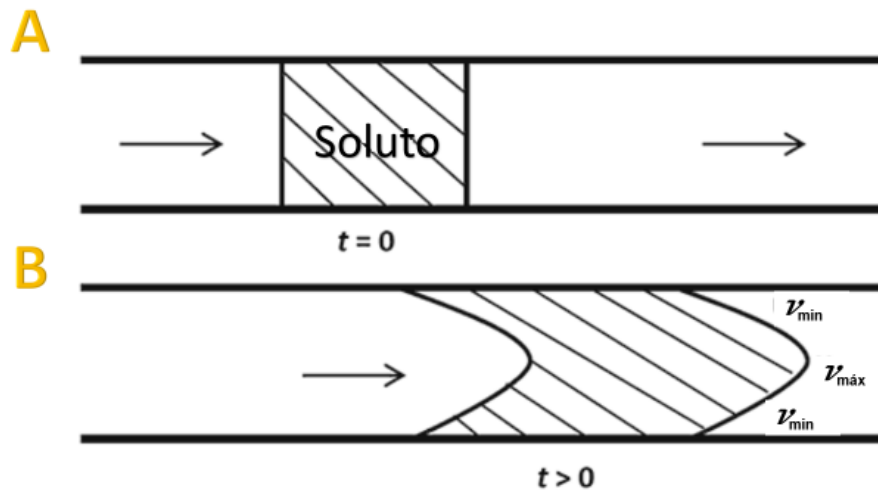


Figura 11. A) Propagación axial de un fluido transportado en régimen laminar en el tiempo cero y B) distribución parabólica de la velocidad del fluido en tiempos mayores a cero. Modificado de ³¹.

I.4.3. Técnicas de enfoque hidrodinámico (HF) aplicadas a microfluídica

El método más sencillo para llevar a cabo una reacción química en canales de microfluídica consiste en intersectar una disolución del reactivo A con una disolución del reactivo B en un solo canal (**Figura 12**). Sin embargo, una dificultad con este método es que, al ser un flujo laminar, el mezclado de los reactivos ocurre sólo por difusión haciéndolo un mezclado lento³². Además, los productos de la reacción se dispersan a lo largo del canal debido al perfil parabólico de las velocidades de flujo, como se muestra a continuación.

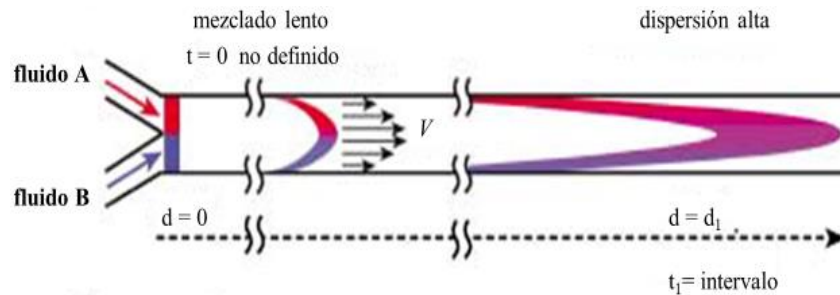


Figura 12. Representación esquemática de una reacción química llevada a cabo en canales de microfluídica, donde una disolución del reactivo A (color rojo), intersecta con una disolución del reactivo B (color morado). Modificado de³².

Una variante de este primer método y que ha sido utilizada para sintetizar nanomateriales en canales de microfluídica, es la técnica de **enfoque hidrodinámico** (HF, por sus siglas en inglés). Esta metodología consiste en intersectar tres disoluciones con los reactivos. En el canal central se inyecta uno de los reactivos usando un flujo menor en comparación con las dos corrientes laterales que contienen otras disoluciones de reactivos fluyendo a velocidades más altas (**Figura 13**). Dichas disoluciones se encuentran en una misma fase, ya sea orgánica o acuosa y son miscibles entre sí. El tamaño reducido de los canales del dispositivo provoca una compresión del flujo central, lo que resulta en un mezclado más rápido y homogéneo disminuyendo el tiempo en el que se efectúa la reacción y acortando la longitud requerida del canal para llevar a cabo la difusión de los reactivos^{33,34}. Esta reducción en los tiempos de residencia de los reactivos dentro de los microcanales puede mejorar la calidad de los productos sintetizados, lo cual aplica también para la síntesis de nanopartículas²⁸.

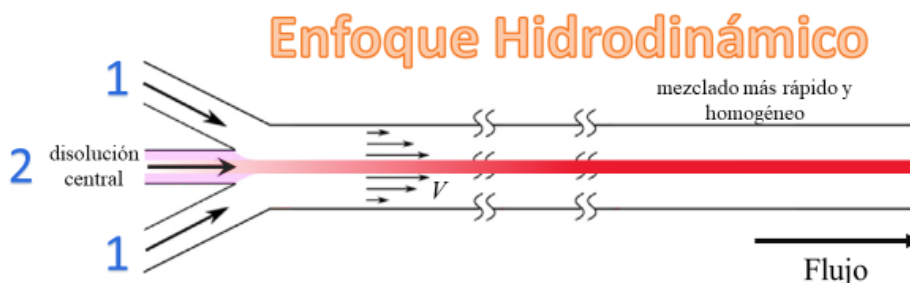


Figura 13. Distribución de la velocidad de flujo dentro de los canales de microfluídica aplicando enfoque hidrodinámico con flujo concéntrico. Modificado de²⁸.

I.4.4 Flujo continuo en una sola fase con mezclado por cavitación

Existen diferentes maneras de alterar el régimen laminar que opera en los dispositivos de microfluídica a uno turbulento y con ello generar un mezclado más rápido y con menos difusión de los productos a lo largo del microcanal. Muchos de estos métodos implican fabricar estructuras tridimensionales complejas dentro de los microcanales que promueven la advección caótica de los fluidos^{35,36}. Otra técnica de mezclado rápido requiere el uso de dos fluidos inmiscibles para formar microgotas en las que se producen flujos convectivos dentro de ellas (ver sección I.4.5 Flujo segmentado en dos fases: microgotas y nanoemulsiones). Por otro lado, diversos artículos han reportado el uso de ondas acústicas de ultrasonido en canales de microfluídica (**Figura 14-A**) para generar un buen mezclado como se describirá a continuación.

Se conoce como ultrasonido a las ondas de presión acústica con frecuencia mayor al límite superior audible del ser humano, que son 20 kHz de frecuencia³⁷. En general, al sonicar una disolución, las moléculas de agua forman pequeñas burbujas de cavitación de algunos micrómetros de radio, las cuales están formadas principalmente de vapor de agua y aire disuelto. En microcanales, estas burbujas de cavitación oscilan rápidamente generando vórtices de corrientes circulares y elípticas en el fluido lo que promueve un mezclado rápido y eficiente (**Figura 14-B**)³⁸.

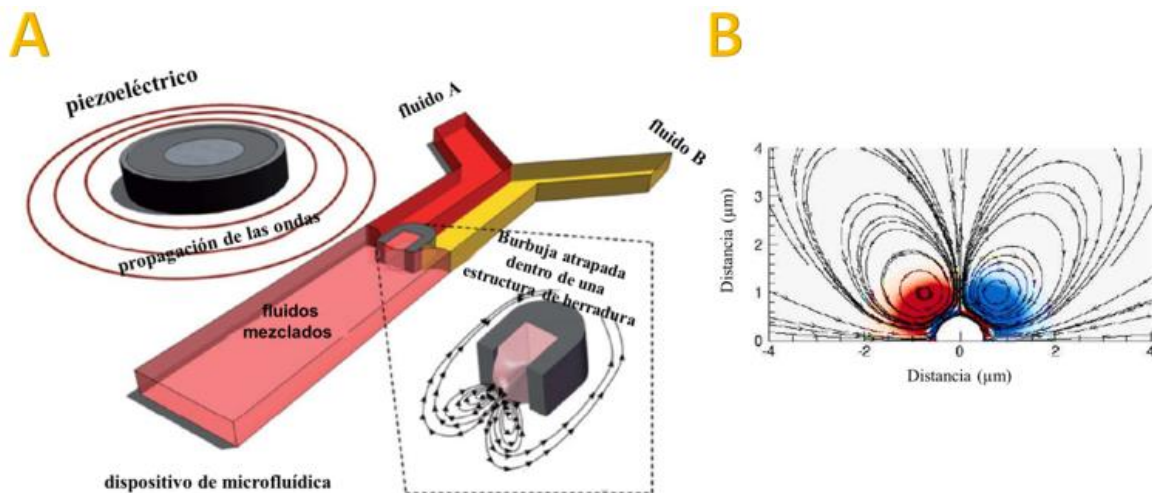


Figura 14. Ondas acústicas de sonido en canales de microfluídica. **A)** transmisión acústica generada por una burbuja atrapada dentro de una estructura de herradura colocada dentro de la cámara microfluídica. **B)** vórtices de corrientes circulares y elípticas en el fluido generadas por burbujas de cavitación. Modificado de³⁸.

Las burbujas de cavitación son compresibles y responden a las ondas de presión del ultrasonido, por lo que constantemente crecen y se encojen. Después de muchos ciclos, las cavidades formadas por las propias burbujas pueden crecer hasta tener el tamaño suficiente para colapsar y absorber eficientemente la energía proveniente de la irradiación acústica (implosión)³⁷. La rápida compresión de los gases y vapores dentro de la burbuja lleva al sistema a alcanzar una temperatura y presión altas, alrededor de 5000 K y 1000 bar,

respectivamente. En estas condiciones, el vapor de agua se separa en radicales aislados de hidrógeno ($\cdot\text{H}$) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Los radicales resultantes reproducen una secuencia de reacciones de abstracción y reducción. Dado que las burbujas son muy pequeñas en comparación con el volumen del líquido que hay alrededor, el calor producido se disipa rápidamente (10^{10} K/s)³⁹, gracias a esto las condiciones ambientales se mantienen esencialmente inalteradas. Cabe mencionar que dichas condiciones son difíciles de alcanzar utilizando otras técnicas. El proceso se esquematiza en la **Figura 15**.

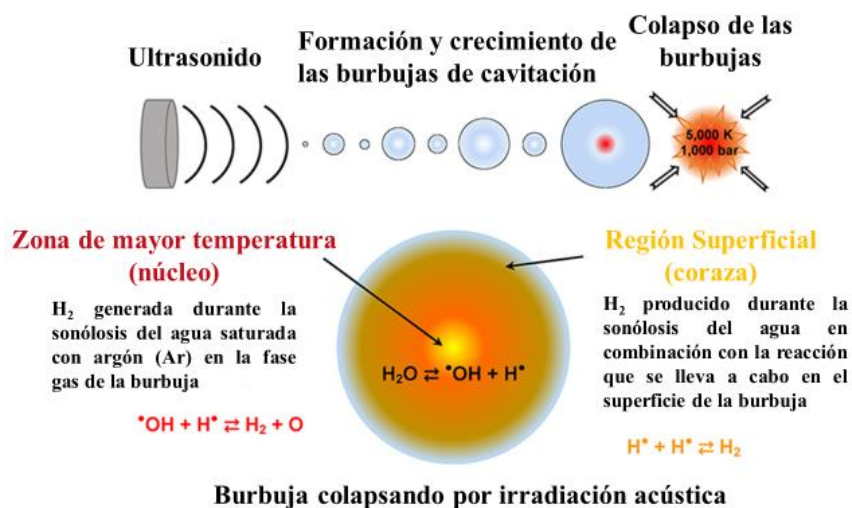


Figura 15. Proceso para generar burbujas de cavitación en disolución. Modificado de ⁴⁰.

La cavitación acústica y sonoquímica en macroescala se ha utilizado para mejorar el rendimiento y la de velocidad de las reacciones de síntesis de nanopartículas metálicas de diferentes materiales como oro (Au)⁴¹, plata (Ag)⁴² y aleaciones como el selenuro de cadmio (CdSe)⁴³.

La pieza clave para generar ultrasonido es un piezoeléctrico o transductor, este tipo de materiales (minerales, cerámicas y algunos polímeros) presentan el efecto piezoeléctrico, el cual es un proceso reversible y consiste en la generación de una fuerza mecánica resultado de aplicar un campo eléctrico alterno, lo que provoca que el piezoeléctrico oscile a una determinada frecuencia⁴⁴.

En este trabajo se colocó un piezoeléctrico tipo Langevine junto al dispositivo de microfluídica en el mismo soporte (portaobjetos de vidrio) para generar un rápido mezclado en la síntesis de nanopartículas de oro. Este transductor ha sido estudiado en un trabajo previo en nuestro laboratorio aún sin publicar [Erick Nieves et al., 2018], donde se observó que la señal sonora que emite el piezoeléctrico se transmite por medio del portaobjetos de forma radial interactuando con los fluidos que se encuentran en el interior de los microcanales. Tomando en cuenta lo anterior, se busca generar burbujas de cavitación para un rápido mezclado de los reactivos dentro del microcanal. Se investigará si existe algún otro efecto en el rendimiento y polidispersidad en las partículas debido a la posible formación de especies reductoras como consecuencia de la cavitación³⁹.

I.4.5. Flujo segmentado en dos fases: microgotas y nanoemulsiones

Todas las técnicas mencionadas hasta el momento se refieren a flujo continuo en una sola fase, sin embargo, existe otra técnica en microfluídica basado en la formación de **microgotas** donde uno de los fluidos es segmentado por otro que es inmisible (Figura 16)⁴⁵. La formación de microgotas dentro de estos dispositivos permite controlar y procesar a una velocidad muy alta una gran cantidad de ensayos en comparación con los métodos tradicionales, por lo que son comúnmente usados como microreactores, donde una de las ventajas es lograr un mezclado más homogéneo entre los reactivos, mejorando así la transferencia de masa y de calor cubriendo además grandes áreas superficiales en relación con el volumen necesario de reactivos^{28,46}.

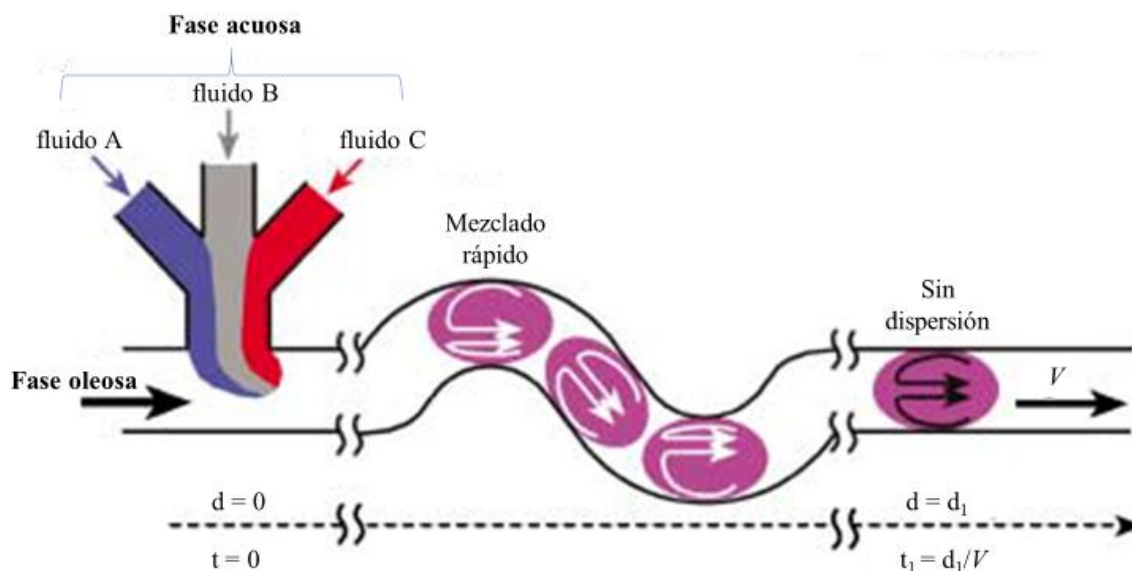


Figura 16. Representación esquemática de una reacción química llevada a cabo en canales de microfluídica. Diferentes fluidos (A, B y C) miscibles entre sí (fase acuosa) se mezclan junto con una fase oleosa para formar microgotas, exhibiendo un mezclado rápido y homogéneo, donde no hay dispersión de los componentes a lo largo del microcanal. Modificado de³².

Las microgotas de microfluídica antes mencionadas son macroemulsiones formadas por gotas de cientos de micras dispersas en una fase oleosa continua. Existen además otro tipo de emulsiones que no se han explorado para llevar a cabo reacciones en canales de microfluídica. Dichas emulsiones, dependiendo de su tamaño y características, se pueden clasificar en: microemulsiones y nanoemulsiones o miniemulsiones (como se refieren algunos autores)⁴⁷. Sus diferencias con respecto a las macroemulsiones se enlistan a continuación en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Diferencias entre micro, nano y macroemulsión ⁴⁵.

Microemulsiones	Miniemulsiones o nanoemulsiones	Macroemulsiones
<p>Son sistemas termodinámicamente estables y se forman espontáneamente.</p> <p>Tienen una apariencia física translúcida o incluso transparente a simple vista.</p> <p>Sus tamaños de gota oscilan por debajo de los 50 nm de diámetro.</p> <p>La mezcla de dos microemulsiones sin aplicar una fuerza externa da lugar al intercambio de sus componentes en la fase dispersa (aquella que se encuentra en menor proporción).</p> <p>Requieren por lo general grandes cantidades de tensoactivos o co-surfactantes.</p>	<p>Son sistemas termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables y requieren energía para formarse.</p> <p>Su estabilidad puede ser durante algunos días o hasta meses o años.</p> <p>Tienen tamaños de gota entre los 50 y 1000 nm de diámetro.</p> <p>La mezcla por si sola de dos nanoemulsiones no implica que las gotas que las conforman intercambien reactivos.</p>	<p>Son sistemas termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables y requieren energía para formarse.</p> <p>Su estabilidad es por un periodo corto de tiempo (minutos - días).</p> <p>Son emulsiones con un tamaño de gota grande (1-1000 μm de diámetro).</p>

En la actualidad, las nanoemulsiones se han empezado a utilizar en macroescala para realizar síntesis de nanomateriales ⁴⁷, debido a que se mejoran las propiedades físicas y químicas de las reacciones, aumentando la versatilidad de los materiales, por ello, son de gran relevancia en el campo de la química junto con su estudio y caracterización, que continúan siendo de mucho interés en el ámbito científico ⁴⁸.

En este proyecto, se exploró la síntesis de las AuNPs dentro de nanoemulsiones de agua en aceite formadas *in situ* en dispositivos de microfluídica.

I.5. Síntesis de nanopartículas de oro en canales de microfluídica

Debido a la importancia de las nanopartículas de oro y su relativa facilidad de síntesis, su fabricación ha sido tomada como un ejemplo recurrente en la literatura para probar y caracterizar diferentes sistemas microfluídicos.

En la **Tabla 2** se muestran artículos que aplican diferentes técnicas microfluídicas para sintetizar nanopartículas de oro mencionando: la morfología de las AuNPs (esféricas, nanocilindros (nanorods), nanohexágonos, nanocubos y nanoestrellas); la técnica empleada en el dispositivo microfluídico (flujo continuo en una sola fase (régimen laminar o turbulento) y flujo segmentado en dos fases); el agente reductor, estabilizador y/o catalizador; así como los diámetros promedios de las nanopartículas y el año en que fueron publicados los artículos. Cabe resaltar que, de entre todos los artículos mencionados, solo dos autores^{49,50} usaron citrato de sodio como reductor para llevar a cabo la síntesis. Este reductor se utilizó en el presente trabajo de investigación debido a las razones ya mencionadas (ver sección I.3.1).

Tabla 2. Síntesis de nanopartículas de oro fabricadas en dispositivos de microfluídica, usando HAuCl₄ como precursor en todos los casos⁴⁹⁻⁵⁷.

Nanomaterial	Morfología de las AuNPs	Técnicas usada en el dispositivo microfluídico	Agente estabilizante, reductor y/o catalizador	Diámetros de nanopartículas nm	Año de la publicación	Referencias
AuNPs	esféricas	flujo continuo en una sola fase (régimen laminar)	Ácido Ascórbico	5 - 50	2005	51
			NaBH ₄	4 - 7	2008	52
		flujo continuo en una sola fase (régimen turbulento)	Citrato de sodio	27 - 29	2015	49
		flujo segmentado en dos fases	Plasma de helio	< 50 nm	2018	53
	nanocilindros	flujo continuo en una sola fase (régimen laminar)	NaBH ₄	30 - 60	2006	54
			Ácido Ascórbico/NaBH ₄	40 - 50	2016	55
	nanohexágonos	flujo continuo en una sola fase (régimen turbulento)	Citrato de sodio	35	2008	50
	nanocubos	flujo continuo en una sola fase (régimen laminar)	NaBH ₄	53 - 75	2017	56
	nanoestrellas	flujo segmentado en dos fases (sin / con tensoactivo)	ácido ascórbico HCl AgNO ₃ polivinilpirrolidina (PVP)	50	2018	57

Algunos ejemplos sobresalientes para este trabajo de investigación se detallan a continuación.

El grupo de SabAbadi y colaboradores ⁴⁹ quienes diseñaron un micromezclador integrado a un dispositivo de microfluídica (**Figura 17**), con la finalidad de aumentar la eficiencia de mezclado de los reactivos para sintetizar nanopartículas de oro y después depositarlas intencionalmente en las paredes de PDMS para darle aplicaciones como biosensores.

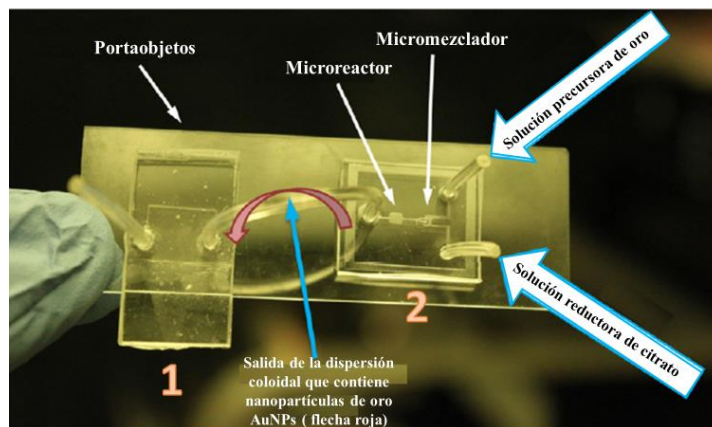


Figura 17. Plataforma de microfluídica para sintetizar nanopartículas de oro, se observan dos microchips (1 y 2) fabricados con PDMS unidos con una tubería para que después de pasar por un micromezclador y un microreactor integrados las partículas queden integradas en las paredes de PDMS. Modificado de ⁴⁹.

Posteriormente, Li y colaboradores ⁵³ publicaron un método poco convencional para sintetizar las AuNPs. Llevaron a cabo la reducción del precursor de oro usando una micro atmósfera de plasma de helio, evitando de esta manera otros productos en la reacción (**Figura 18**). Después las AuNPs eran funcionalizadas con ácido 3-mercaptopropiónico para detectar iones de mercurio (Hg^{2+}). Al caracterizar las AuNPs usando microscopía electrónica de transmisión (TEM), se observaron nanopartículas polidispersas en tamaños y formas. Para tratar de minimizar esto, los autores agregaron a la reacción un agente estabilizador como lo fue el citrato de sodio, sin embargo, la polidispersidad en el tamaño de las nanopartículas permaneció (**Figura 18-(a), (b)**).

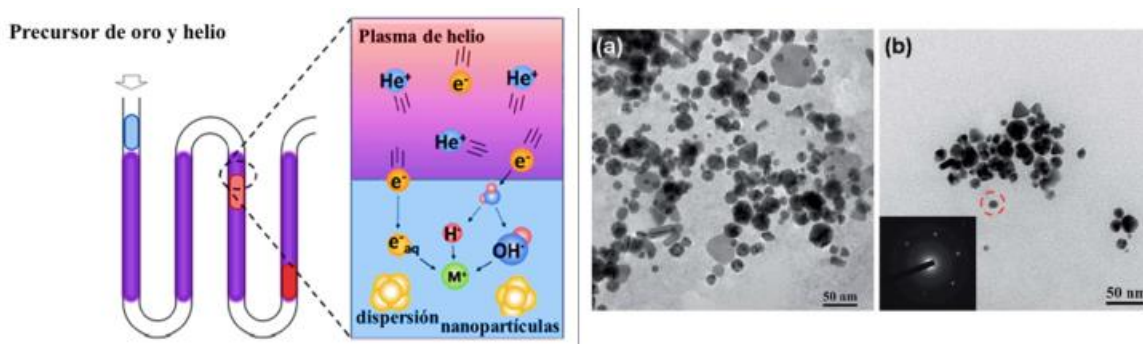


Figura 18. Representación esquemática de la reducción de iones de Au y síntesis de AuNPs usando una micro atmósfera de plasma con helio (lado izquierdo). Imágenes TEM de las AuNPs sintetizadas: (a) sin agente reductor (b) agregando citrato de sodio 2.5 mM. Modificado de ⁵³.

Además de proponer métodos alternativos para sintetizar estos materiales, en la literatura también se ha reportado el uso de dispositivos de microfluídica para fabricar nanopartículas de oro con formas distintas a la esférica. Fue así como Abalde-Cela y colaboradores⁵⁷ usaron la técnica basada en la formación de microgotas (**Figura 19**) para fabricar AuNPs con formas no esféricas (forma de estrella), las cuales son conocidas por sus propiedades ópticas. Utilizando un surfactante además de varios agentes reductores, lograron obtener nanopartículas de tamaños y formas muy diferentes en cada caso.

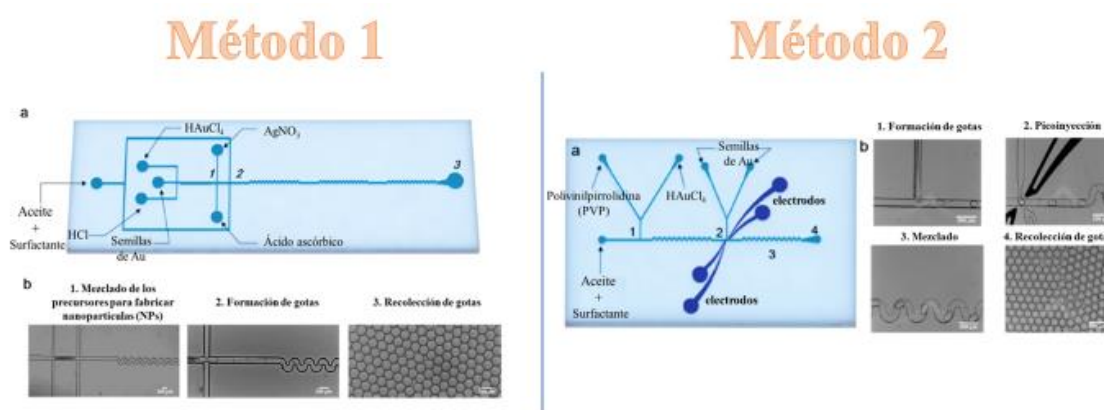


Figura 19. Síntesis de nanopartículas de oro en forma de estrella en dispositivos de microfluídica. **Método 1:** Síntesis libre de surfactante, el dispositivo de microfluídica diseñado con 5 entradas para inyectar: semillas de AuNPs preformadas de 15 nm, ácido clorhídrico (HCl), disolución precursora de oro (HAuCl₄), disolución de nitrato de plata (AgNO₃) y ácido ascórbico (AA). **Método 2:** Síntesis llevada a cabo en dos etapas. El precursor de oro (HAuCl₄) se mezcla en microgotas junto con una disolución de polivinilpirrolidina (PVP) disuelta en dimetilformamida (DMF). Tras la reducción parcial de las especies de Au³⁺ con PVP, se inyectan a las microgotas semillas preformadas de AuNPs de 15 nm aplicando un voltaje de 600 V al dispositivo de microfluídica. **(a)** representación esquemática del diseño del microchip **(b)** imágenes correspondientes a los diferentes puntos en el microchip donde los números corresponden a los puntos señalados en **(a)**. Modificado de⁵⁷.

En dichos artículos, así como en este trabajo de investigación, se busca aportar conocimiento al área de síntesis de AuNPs utilizando microfluídica para desarrollar u optimizar metodologías que permitan ampliar el campo de aplicación de estos nanomateriales.

II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

II.1. Fabricación de los microchips de microfluídica

II.1.1. Diseño de la fotomáscara

La construcción de un dispositivo de microfluídica inicia con el diseño del patrón de los microcanales. Para este propósito se utiliza un software de diseño por computadora, en este caso se utilizó Adobe Illustrator C56 por ser sencillo de utilizar y porque se contaba con el acceso en las computadoras del laboratorio. Cada uno de los diseños se imprimieron en negativo sobre un acetato (Gráficos Digitales Denver, CDMX). Dicha impresión se denomina fotomáscara (**Figura 20**).

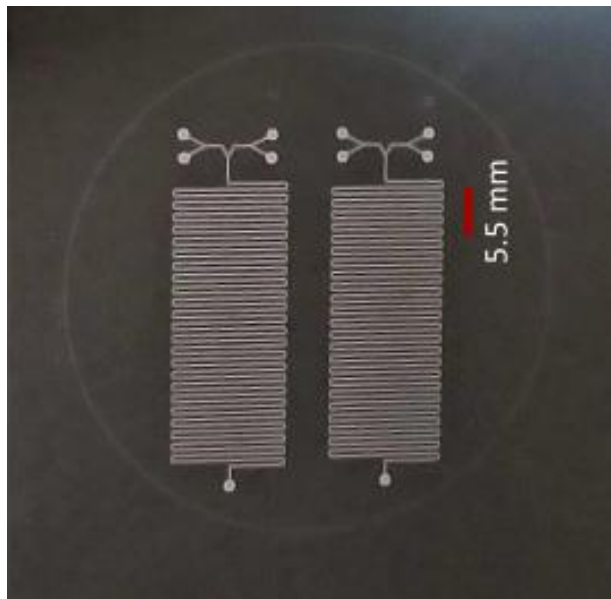


Figura 20. Diseño de un microchip impreso sobre un acetato en negativo.

II.1.2. Fabricación del molde maestro por fotolitografía suave

El proceso de fabricación de los microchips de microfluídica utilizados en esta tesis se resume en la **Figura 21**.

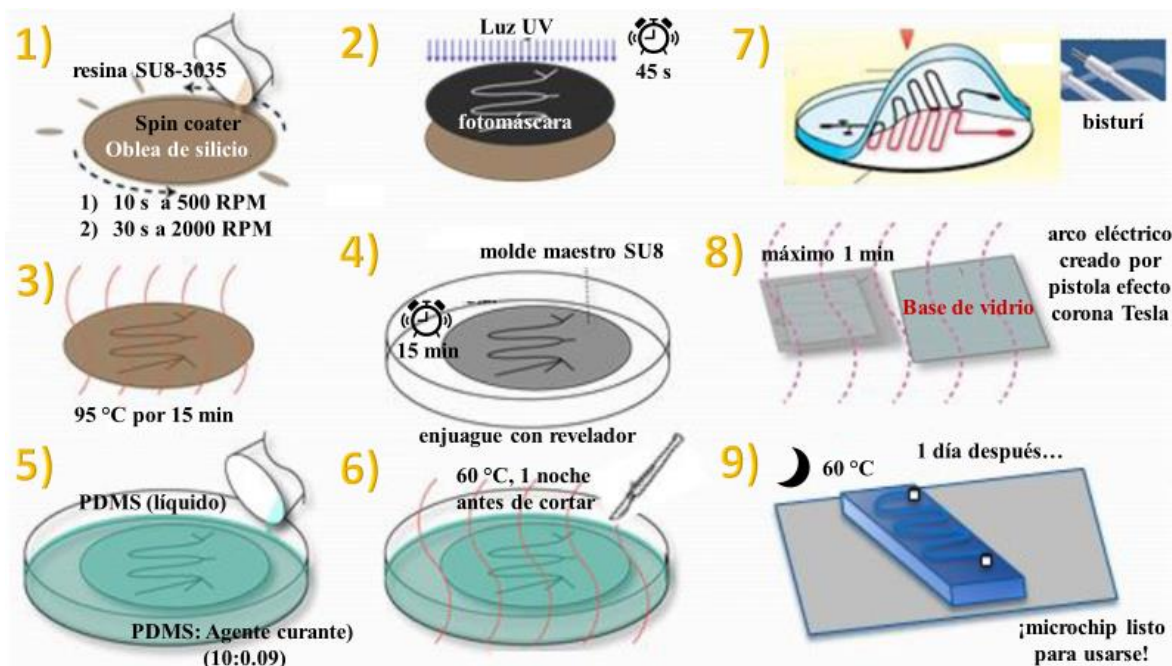


Figura 21 Fabricación de un microchip de microfluídica usando la técnica de fotolitografía suave: **1)** Se deposita resina fotosensible SU8-3035 (MicroChem ®) sobre una oblea de silicio y se hace girar para generar una capa 50 μm de espesor, programando un equipo spin coater de la siguiente forma; **1.1)** 10 s a una rotación de 500 RPM **1.2)** 30 s a una rotación de 2000 RPM. **2)** Se transfiere el patrón del microchip desde la fotomáscara hasta la superficie de la oblea de silicio con la resina exponiéndola a la luz UV durante 45 s. **3)** Calentamiento de la oblea a 95 °C por 15 min (Post-Bake). **4)** El molde maestro se revela con acetato de 1-metoxi-2-propilo, agitándose durante 15 min para después hacer enjuagues con alcohol isopropílico. **5)** Relleno del molde con PDMS: agente curante (10: 0.9). **6)** Polimerización del molde sometido a calentamiento en el horno a 60 °C, durante 1 noche. **7)** El molde de PDMS se corta con ayuda de un bisturí y se perforan entradas y salidas. **8)** Pegado del microchip de PDMS a un portaobjetos de vidrio haciendo uso de una pistola efecto corona Tesla (1 minuto máximo). **9)** El microchip se cubre con cinta adhesiva, se introduce dentro del horno a 60 °C durante 1 día, después de este tiempo el microchip estará listo para usarse.

Cada uno de los pasos se explican de manera detallada a continuación. En todos los casos se utilizó una oblea de silicio (Silicon Valley Microelectronics, E.U) de 75 mm de diámetro y 381 μm de espesor, además de la resina foto sensible SU8-3035 (MicroChem ®) ⁵⁸.

II.1.3. Proceso de fabricación del molde maestro

Primero, se centró la oblea de silicio en un equipo spin coater modelo modelo WS-650MZ-23NPPB WS-650MZ-23NPPB (Laurell Technologies Corporation ®) y se hizo girar mientras se agregaba isopropanol para limpiarla. Enseguida, se deshidrató la oblea colocándola sobre una parrilla de calentamiento a una temperatura de 210 °C por 15 min y luego a 95 °C por 10 min. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se colocó nuevamente en el spin coater.

Después, se agregaron 3 mL de la resina SU8-3035 y se hizo rotar con el siguiente programa para generar una capa de 50 µm de altura sobre la superficie de la oblea:

Paso 1: 10 s a una rotación de 500 RPM (revoluciones por minuto) y una aceleración de 100 RPM/s.

Paso 2: 30 s a una rotación de 2,000 RPM y una aceleración de 300 RPM/s.

Después del programa de rotación, la oblea se lleva a calentamiento a una temperatura de 105 °C durante 15 min (Pre-Bake). La oblea se vuelve a alinear en el spinner y se agrega otra capa de SU8 repitiendo el mismo programa para alcanzar los 100 µm de altura. Posterior a la segunda capa, se colocó nuevamente la oblea en la parrilla de calentamiento a una temperatura de 95 °C durante 45 min (Hard-Bake).

La siguiente etapa consistió en transferir el patrón del microchip desde la fotomáscara hasta la superficie de la oblea de silicio donde se encontraba depositada la resina. Para ello, se colocó la fotomáscara encima de la oblea y para asegurar un buen contacto, se colocó una placa de vidrio (6 mm) encima de ellas. Todo esto se puso debajo de una lámpara de mercurio de 100 W de alta intensidad, modelo B-100AP, marca UVP, durante 45 s. Tras pasar ese tiempo, se quita la iluminación y la fotomáscara se retira de la oblea para que esta última se someta a calentamiento, primero a 75 °C durante 1 minuto y para evitar choques térmicos, luego se eleva la temperatura a 105 °C durante 15 min (Post-Bake).

Posteriormente, la oblea se sumergió en una caja Petri la cual contenía el revelador (acetato de 1-metoxi-2-propilo), agitándose durante 15 min, para después enjuagarla con alcohol isopropílico, limpiando así los restos de la resina. Este procedimiento se repite las veces necesarias hasta que se deje de observar un líquido lechoso producto de la resina. Si el procedimiento se llevó a cabo de forma correcta, se podrá ver claramente el diseño del patrón de la fotomáscara grabado en la placa de silicio.

Finalmente, la placa se escurre y se seca con aire, para luego calentarla lentamente por 15 min en intervalos de 30 °C desde temperatura ambiente hasta 200 °C, dejándola enfriar y almacenándola en un horno de calentamiento (Heating Incubator ®, modelo DHP-9032) a una temperatura de 60 °C durante una noche para fijar de forma permanente la impresión de los canales.

II.1.4. Relleno del molde maestro con PDMS y agente curante

El procedimiento descrito a continuación aplica a cualquier diseño de microchip utilizado en este proyecto, por lo que una vez que se ha fabricado el molde, el siguiente paso fue rellenarlo, haciendo lo indicado a continuación:

Después de sacar el molde del horno de calentamiento, se aplicó aire a presión para remover la mayor cantidad de partículas posible. Enseguida, se tomó un vaso y una cuchara de plástico desechables, a los que igualmente se les aplicó aire a presión, para luego pesarlos y tararlos en una balanza analítica de la marca OHAUS. Después, se agregó una cantidad suficiente (30 g para un molde nuevo) de polidimetilsiloxano (PDMS) (kit Sylgard 184, Dow Corning®) y agente curante al 9% en masa (2.7 g), es decir, en una proporción de 10:0.9 (PDMS: agente curante)²³. Todo se mezcla de forma manual y continua durante aproximadamente 5 min, hasta obtener una mezcla homogénea observando una apariencia lechosa indicando una gran cantidad de burbujas.

A continuación, la mezcla se vacía en la caja Petri que contiene el molde, observando la formación de burbujas de aire. Para extraerlas, el molde se coloca dentro de un desecador con vacío durante aproximadamente 1 hora. Al sacarlo, se corrobora que no queden burbujas de aire antes de introducirlo en el horno de calentamiento (**Figura 22**). El molde ya relleno requiere introducirse al horno a 60 °C por al menos 4 horas para pasar a la siguiente etapa.

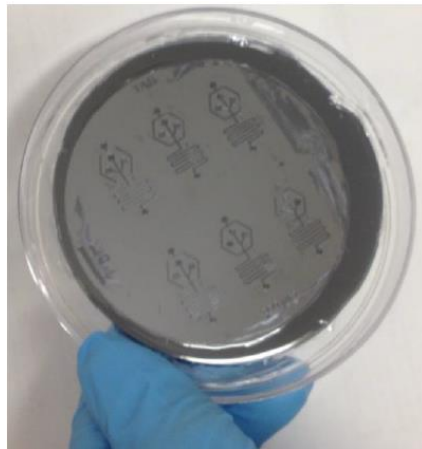


Figura 22. Representación de un molde maestro relleno con PDMS y agente curante en una proporción 10:0.9.

II.1.5. Pegado del microchip de PDMS a la superficie de vidrio

Una vez que ha polimerizado por completo la mezcla de PDMS y agente curante, se sacó la caja Petri del horno y se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente, y con ayuda de un bisturí (Hergom), se cortó cuidadosamente el trozo de PDMS con el diseño, poniendo atención en no rayar la placa de silicio que se tenía como base, para no afectar los diseños plasmados (**Figura 23**), de esta forma se puede volver a rellenar el molde siempre y cuando los microcanales sigan visualmente bien definidos, sin haberse borrado alguna pista que afecte el uso del microchip.

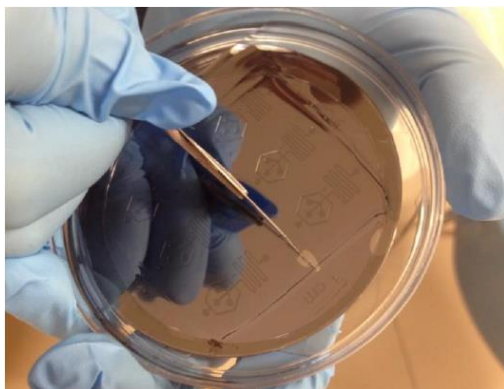


Figura 23. Corte con bisturí (Hergom) del microchip de microfluídica fabricado de PDMS.

Después, con ayuda de un orador de la marca WellTech Rapid-Core-0.75 mm, se perforaron las entradas y salidas del microchip. Los orificios se hicieron sobre la cara del microchip donde se aprecia el relieve del patrón grabado.

Los microchips se adhirieron a un portaobjetos de vidrio cuyas dimensiones dependían del diseño experimental y haciendo uso de una pistola de efecto corona Tesla, de la marca Electro-Technic Products, Inc. ® Modelo BD-20AC, se creó un arco eléctrico ionizando el aire circundante lo cual activa la superficie de vidrio, así como la superficie del PDMS. Cabe resaltar que se debe tener precaución en la superficie donde se maneja la pistola, ya que si esta se activa directamente sobre una superficie metálica, el arco eléctrico se puede reflejar, haciendo que el equipo se descomponga. Al encender el corona, se pasa a lo largo de la superficie de vidrio donde será pegado el microchip activándolo durante 50 s, para después pasarlo durante 35 s sobre la superficie del PDMS del lado del relieve. Tampoco es recomendable un tiempo de exposición prolongado, debido a que es posible dañar la superficie de PDMS, modificando de forma notable el pegado de los microcanales. Inmediatamente después de exponer las superficies, se colocó el microchip de PDMS sobre la superficie de vidrio, ejerciendo una ligera presión durante algunos segundos, adhiriendo el microchip al vidrio (**Figura 24**). A continuación, se cubrió el microchip con cinta adhesiva y este se introdujo dentro del horno a 60 °C durante 1 día, después de este tiempo el microchip estará listo para usarse.

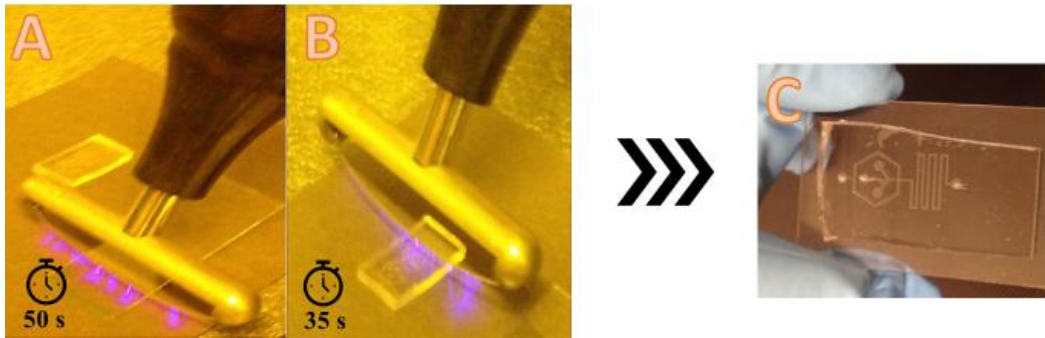


Figura 24. Pegado del microchip fabricado con PDMS usando una descarga de plasma de oxígeno sobre: **A)** portaobjetos de vidrio, durante 50 s, **B)** microchip de microfluídica, durante 35 s. y **C)** adhesión del microchip a la superficie de vidrio.

II.2. Síntesis de nanopartículas de Au por el método de Turkevich

II.2.1. Materiales y reactivos

Se requirió preparar dos disoluciones acuosas para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de oro. La primera fue la del precursor de oro: el ácido tetracloroaurico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, > 99.99 %) y la segunda fue la del reductor: citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ≥ 99 %). Ambos reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich ® y usados sin ningún proceso de purificación adicional. Ambos reactivos se disolvieron en agua desionizada ($R=18.2 \text{ M}\Omega$) proveniente de un equipo Millipore de la marca Merck ®.

Se prepararon 100 mL de una disolución madre de la sal de oro 0.526 mM (pH= 3) y 50 mL de una solución de citrato de sodio 34 mM (pH= 9), respectivamente. La disolución precursora de oro es fotosensible, por lo que se almacenó y refrigeró en frasco ámbar durante un periodo no mayor a tres meses para su uso. La disolución de citrato de sodio, fue almacenada en un recipiente de vidrio sellado con papel Parafilm ® y al igual que la disolución de oro, su uso debe hacerse en un periodo no mayor a 3 meses.

La síntesis se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 200 mL, dentro del que se colocó un agitador magnético de teflón, mientras que para el calentamiento de la disolución precursora de oro, se utilizó una parilla de calentamiento con agitación de la marca Cole Parmer ® (**Figura 25**).

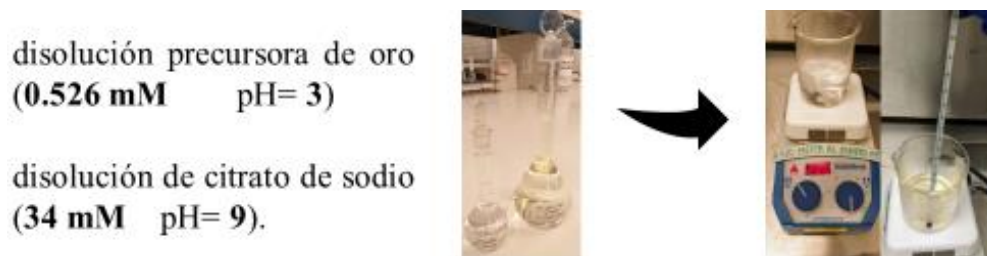


Figura 25. Preparación de disoluciones: precursora de oro (0.526 mM pH= 3) y citrato de sodio (34 mM pH= 9). Calentamiento de la disolución precursora de oro en un vaso de precipitado que contenía un agitador magnético utilizando una parilla de calentamiento.

II.2.2. Desarrollo experimental de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich

Para el método en bulto o macro escala, se utilizaron 99 mL de la disolución precursora de oro (0.526 mM). Se calentaron alrededor de 20 min hasta alcanzar la ebullición (90 °C). Posteriormente, se agregó 1 mL de la disolución de citrato de sodio (34 mM) por goteo y de forma simultánea inició la agitación. Después de aproximadamente 30 s, la dispersión presentó diversos cambios de coloración, hasta completar la reducción del H₂AuCl₄ (5 min) mostrando un tono rojo borgoña que indicaba la formación de nanopartículas. En este caso, se observó que prolongar el calentamiento o la adición extra de citrato no produce cambios significativos en la dispersión coloidal, después de ese periodo de tiempo. Finalmente, se detuvo el calentamiento y la dispersión se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente.

El volumen de la disolución resultante, tras mezclar la disolución de oro y de citrato, fue estimado en 100 mL. Con este dato fue posible calcular las concentraciones molares en la mezcla de reacción.

Para el caso del oro:

$$(C_{inicialAu^{3+}})(V_{inicialAu^{3+}}) = (C_{finalAu^0})(V_{finalAu^0}) \dots (2)$$

$$(0.526 \text{ mM})(99 \text{ mL}) = (C_{finalAu^0})(100 \text{ mL})$$

$$C_{finalAu^0} = \frac{(0.526 \text{ mM})(99 \text{ mL})}{(100 \text{ mL})} = 0.520 \text{ mM}$$

$$C_{finalAu^0} \approx 0.52 \text{ mM}$$

Para el caso del citrato de sodio:

$$(C_{inicial[citrato]})(V_{inicial[citrato]}) = (C_{final[citrato]})(V_{final[citrato]}) \dots (3)$$

$$(34 \text{ mM})(5 \text{ mL}) = (C_{final[citrato]})(100 \text{ mL})$$

$$C_{final[citrato]} = \frac{(34 \text{ mM})(5 \text{ mL})}{(100 \text{ mL})} = 1.70 \text{ mM}$$

Por lo tanto, la relación molar citrato/oro es igual a:

$$\frac{C_{final[citrato]}}{C_{finalAu^0}} = \frac{1.70 \text{ mM}}{0.52 \text{ mM}} = 3.27 \approx 3.3 \dots (4)$$

Una relación muy cercana a ésta se utilizó durante el resto de los experimentos realizados en esta tesis en macro y microescala. Este valor debería generar nanopartículas de oro pequeñas y monodispersas de entre 14 y 22 nm de diámetro ¹⁶.

II.2.3. Desarrollo experimental de las AuNPs sintetizadas en miliescala

Después de realizar los experimentos en macroescala (100 mL), el siguiente reto fue diseñar pruebas adaptando las condiciones que serían manejadas en los dispositivos de microfluídica, llevando a cabo pruebas en miliescala (1 mL).

En 4 tubos Eppendorf® (a), (b), (c) y (d) de 1.5 mL cada uno, se añadieron 500 μ L de la disolución precursora de oro 1.08 mM, seguido de 500 μ L de disolución de citrato de sodio 3.4 mM ([citrato]/[Au]=3.14). Al momento de agregar la disolución reductora, el tubo se cerraba y era sumergido simultáneamente en un baño de agua a temperatura controlada de: 50, 60, 70 y 80 °C, respectivamente. El tiempo durante el cual las muestras se mantuvieron en calentamiento fue de 20 min (**Figura 26**).



Figura 26. Representación esquemática de la prueba en miliescala (1.0 mL), mezclando 500 μ L de una disolución precursora de oro 1.08 mM y 500 μ L de una disolución reductora de citrato de sodio 3.4 mM ([citrato]/[Au]=3.15), dentro de tubos Eppendorf® de 1.5 mL. Los tubos (a), (b), (c) y (d), se calentaron a 50, 60, 70 y 80 °C, respectivamente.

Esta prueba sirvió para determinar si existía algún cambio drástico, de tipo cualitativo en la dispersión coloidal formada conforme el aumento de la temperatura a un tiempo constante, pudiendo delimitar el mínimo y máximo de temperatura en la que podía llevarse a cabo la reacción. El tiempo que se manejó (20 min) se consideró como un tiempo razonable para diseñar los experimentos dentro de los canales del microchip de microfluídica.

Posterior a esa prueba, se diseñó otra más con otros 4 tubos Eppendorf® (e), (f), (g), (h). Se volvió a colocar 500 μ L de la solución precursora de oro 1.08 mM y posteriormente 500 μ L de la solución de citrato de sodio 3.4 mM. Esta vez, los 4 tubos fueron sumergidos simultáneamente en un vaso de precipitados con agua a una temperatura de 60 °C (**Figura 27**). Al momento de agregar la solución reductora en cada uno de los tubos, con ayuda de un cronómetro se contaba el tiempo y al pasar 5, 10, 15 y 20 min, respectivamente, se sacaban uno a uno los tubos, monitoreando los cambios ocurridos.

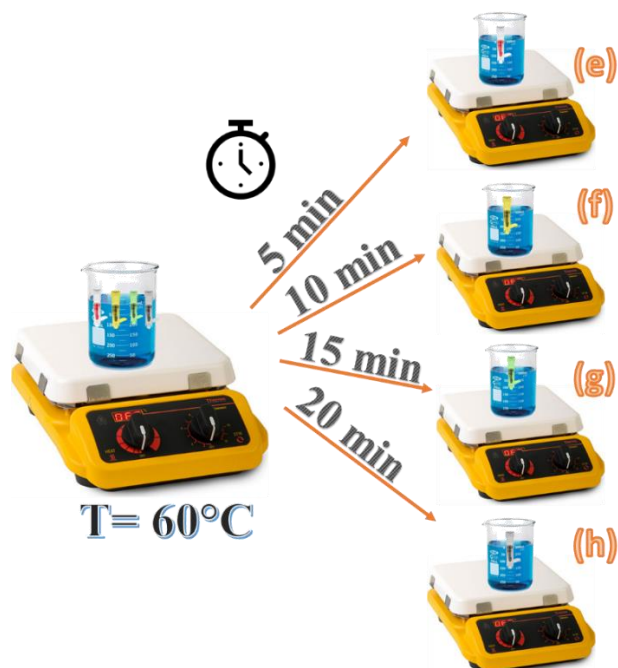


Figura 27. Representación esquemática de la prueba en miliescala (1.0 mL), mezclando 500 μL de una disolución precursora de oro 1.08 mM y 500 μL de una disolución reductora de citrato de sodio 3.4 mM ($[\text{citrato}]/[\text{Au}] = 3.15$), dentro de tubos Eppendorf® de 1.5 mL. Los tubos (e), (f), (g) y (h), se calentaron durante 5, 10, 15 y 20, respectivamente, a $T = 60^\circ\text{C}$.

Este experimento sirvió para definir el tiempo mínimo y máximo aproximado en que se presentaba algún cambio significativo en la reacción, de tal forma que se pudiera optimizar el proceso al llevarlo a cabo dentro de los microchips de microfluídica.

Una vez que se analizaron los resultados de estas pruebas, se diseñaron diferentes experimentos para sintetizar nanopartículas de oro en canales de microfluídica usando diferentes métodos; a) flujo continuo en una sola fase, b) flujo continuo en una sola fase con cavitación, c) flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones).

II.3. Método de flujo continuo en una sola fase en microfluídica

II.3.1. Materiales y reactivos

Para realizar los experimentos de *flujo continuo en una sola fase*, se prepararon 25 mL de una disolución precursora de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1.08 mM y 15 mL de una disolución madre de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.4 mM ($[\text{Citrato}]/[\text{Au}]=3.14$), utilizando agua desionizada como disolvente.

El tipo de jeringas utilizadas son estériles desechables de plástico de 1 mL de volumen y diámetro interno igual a 4.699 mm marca BD Plastipak[®], así como agujas hipodérmicas de un solo uso marca BD PrecisionGlide[®] para introducir los líquidos correspondientes. Se emplearon tuberías fabricadas de politetrafluoroetileno (PTFE) #24 de la marca Cole Parmer[®] para conectar entradas y salidas del microchip.

Estos materiales se manejaron junto con bombas programables para microfluídica modelo NE-1002X de la marca New Era Pump Systems, Inc.[®] para dispensar un flujo específico en $\mu\text{L}/\text{h}$, también se utilizó una parrilla de calentamiento sin agitación, de la marca Thermo Scientific[®] para mantener la temperatura constante del serpentín de salida del microchip.

II.3.2. Dispositivo microfluídico A1

Para aplicar el *método de flujo continuo en una sola fase* se utilizó el **Dispositivo A1** cuyo diseño (**Figura 28**) está constituido por canales rectangulares y codos en forma de semicírculos. Las cuatro entradas identificadas como **i1**, **i2**, **i3**, e **i4**, se separan de forma simétrica, con la finalidad de dividir los flujos que contienen la disolución precursora de oro y la disolución precursora de citrato, además de poder modificar fácilmente la relación de flujos entre ellos. Seguido del punto central de convergencia de los canales de entrada, se añadió un serpentín cuya longitud total (770 mm) permite que los fluidos se mantengan dentro de los microcanales durante un mayor tiempo de residencia, dando seguimiento a la reacción hasta llegar al punto de salida señalado como (s), donde se recolecta y posteriormente caracteriza la dispersión correspondiente. El ancho de los microcanales fue igual a 350 μm por 100 μm de altura. Con estas dimensiones, se calculó el volumen del serpentín, siendo equivalente a 28 μL .

Dispositivo A1

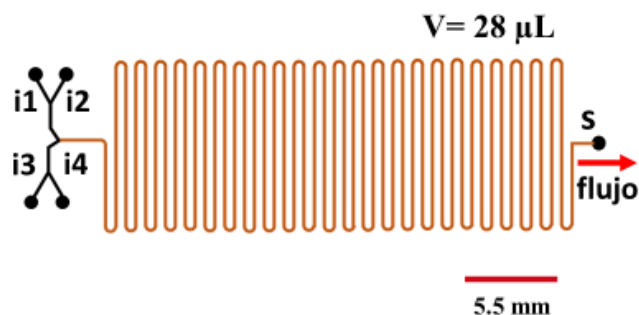


Figura 28. Dispositivo de microfluídica **A1** diseñado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el método de *flujo continuo en una sola fase*. Entradas del microchip señaladas como (i1, i2, i3 e i4) y salida indicada como (s). Volumen del serpentina igual a 28 µL.

II.3.3. Desarrollo experimental con el Dispositivo A1

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de oro en *flujo continuo en una sola fase* utilizando el **Dispositivo A1** se ejecutó el siguiente protocolo:

Las disoluciones de citrato y del precursor de oro se introdujeron de forma separada al microchip utilizando dos jeringas de 1 mL para cada reactivo (**Figura 29**). Se purgaron todas las burbujas sobresalientes de aire, para minimizar la fluctuación contundente del flujo a la entrada de los canales del microchip. Posteriormente, se programaron las bombas de las jeringas para que cada una dispensara el mismo flujo de las soluciones. Se diseñaron dos experimentos: en el primero cada bomba tenía un flujo de 43.09 µL/h, lo que corresponde a un flujo total de 172.34 µL/h y un tiempo de residencia de 10 min. En el segundo, el flujo de cada bomba fue de 86.21 µL/h, correspondiente a un flujo total de 344.82 µL/h para 5 min de tiempo de residencia. Una vez que se conectaron las entradas y salida del microchip, el dispositivo se colocó encima de una parrilla a temperatura constante. Se realizaron pruebas a temperaturas constantes entre los 25 y los 80 °C. El paso del líquido en los microcanales se monitoreó en tiempo real, haciendo uso de un microscopio y/o una cámara Canon ® que permite observar el comportamiento de los reactivos antes, durante y después de mezclarse, para tener evidencia del experimento.

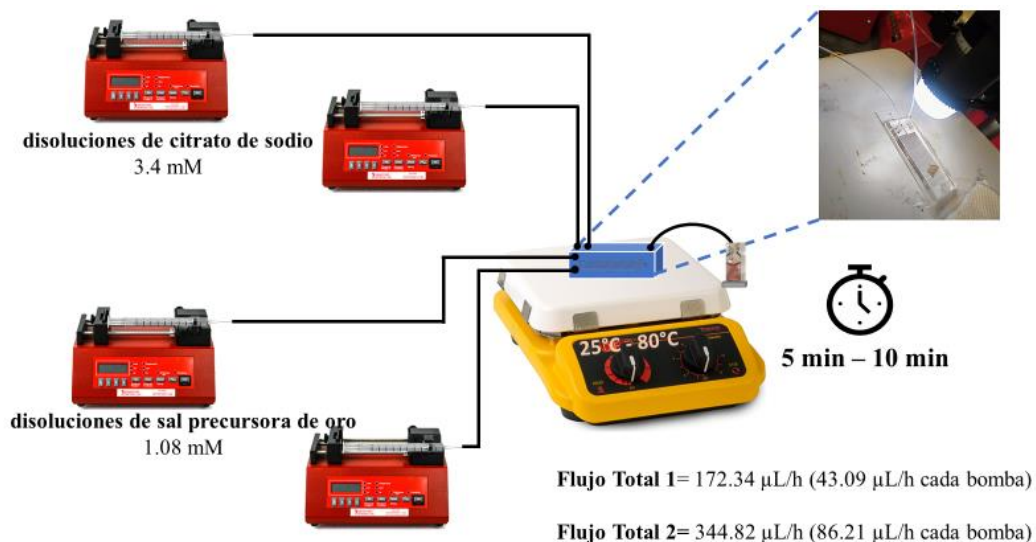


Figura 29. Diseño experimental de la síntesis de AuNPs en canales de microfluídica (**Dispositivo A1**) por el método de *flujo continuo en una sola fase* usando disoluciones precursoras de oro (1.08 mM) y disoluciones de citrato (3.4 mM) trabajando a dos diferentes flujos totales: **1**) 172.34 $\mu\text{L/h}$ (43.09 $\mu\text{L/h}$ cada bomba) y **2**) 344.82 $\mu\text{L/h}$ (86.21 $\mu\text{L/h}$ cada bomba), aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 °C.

II.3.4. Dispositivo microfluídico B1

Posteriormente, se trabajó con el **Dispositivo B1 (Figura 30)**. Este chip tiene dos entradas (**i1**; **i2**). El líquido que entra por **i1** (disolución de citrato de sodio) se divide en dos y se intersecta con el fluido que entre por **i2** (disolución de HAuCl_4) para hacer un enfoque hidrodinámico.

Dispositivo B1

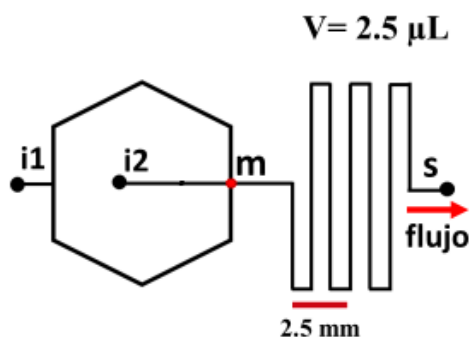


Figura 30. Dispositivo de microfluídica **B1** utilizado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el método de *flujo continuo en una sola fase con enfoque hidrodinámico*. Entradas del microchip señaladas como (**i1** e **i2**), punto de convergencia (**m**) y salida indicada como (**s**). Volumen del serpentin igual a 2.5 μL .

En este caso, la longitud del serpentín (5 mm) que se añadió posterior a la intersección de las dos corrientes (m), se diseñó con la intención de disminuir el tiempo de residencia de los fluidos dentro del microchip para evitar el depósito de AuNPs en las paredes de PDMS. En este caso, el ancho de los microcanales fue igual a 300 μm por 100 μm de altura, correspondiente a un volumen del serpentín igual a 2.5 μL .

II.3.5. Desarrollo experimental con el Dispositivo B1

En el caso del **Dispositivo B1**, las concentraciones iniciales en las jeringas tanto de la disolución precursora de oro, como de citrato se establecieron para un flujo idéntico de cada reactivo: 500 $\mu\text{L/h}$ en un primer caso o 250 $\mu\text{L/h}$ en un segundo caso (flujo total = 1000 $\mu\text{L/h}$ o 500 $\mu\text{L/h}$ respectivamente).

Para la disolución precursora de oro:

$$(C_{\text{inicialAu}^{3+}})(F_{\text{inicialAu}^{3+}}) = (C_{\text{finalAu}^0})(F_{\text{finalAu}^0}) \dots (5)$$

$$(1.08 \text{ mM}) (500 \mu\text{L/hr}) = (C_{\text{finalAu}^0}) (1000 \mu\text{L/hr})$$

$$C_{\text{finalAu}^0} = \frac{(1.08 \text{ mM}) (500 \mu\text{L/hr})}{(1000 \mu\text{L/hr})} = 1.08 \text{ mM}$$

$$C_{\text{finalAu}^0} = 0.54 \text{ mM}$$

Mientras que para la disolución de citrato de sodio:

$$(C_{\text{inicial[citrato]}})(F_{\text{inicial[citrato]}}) = (C_{\text{final[citrato]}})(F_{\text{final[citrato]}}) \dots (6)$$

$$(3.4 \text{ mM}) (500 \mu\text{L/hr}) = (C_{\text{final[citrato]}}) (1000 \mu\text{L/hr})$$

$$C_{\text{final[citrato]}} = \frac{(3.4 \text{ mM}) (500 \mu\text{L/hr})}{(1000 \mu\text{L/hr})} = 1.70 \text{ mM}$$

Por lo tanto, la relación molar citrato/oro, es igual a:

$$\frac{C_{\text{final[citrato]}}}{C_{\text{finalAu}^0}} = \frac{1.70 \text{ mM}}{0.54 \text{ mM}} \approx 3.15 \dots (7)$$

Esta relación ($[\text{citrato}]/[\text{Au}]=3.15$), se mantuvo en todos los experimentos con este chip.

Debido a que el tiempo de residencia de los reactivos a estos flujos (1,000 $\mu\text{L}/\text{h}$ y 500 $\mu\text{L}/\text{h}$) en el **Dispositivo B1** sería de solo de 29 segundos, se colocó un serpentín o tubo, fabricado de politetrafluoroetileno con una longitud de 100 cm, un diámetro interno igual 0.056 cm a manejando un volumen igual 245 μL . Éste se sumergió en un vaso de precipitados, el cual se mantuvo simultáneamente en la parrilla de calentamiento a una temperatura de 90° C. El líquido producido a la salida de este serpentín fue recolectado en un vial, para su posterior caracterización.

Cabe resaltar que el tiempo durante el cual la reacción se mantuvo en calentamiento dentro del serpentín, se calculó tomando en cuenta los siguientes datos:

- Longitud del tubo de salida (serpentín): 100 cm
- Diámetro interno del tubo: 0.056 cm
- Flujo total: 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$

$$V_{\text{interno}} = \frac{\pi * d^2 * L}{4} \dots (8)$$

Donde:

$$V_{\text{interno}} = \text{Volumen interno [cm}^3\text{]}$$

$$d = \text{Diámetro interno del tubo [cm]}$$

$$L = \text{Longitud del tubo [cm]}$$

Sustituyendo datos en la ecuación (8):

$$V_{\text{interno}} = \frac{\pi * (0.056 \text{ cm})^2 * (100 \text{ cm})}{4} = 0.245 \text{ cm}^3$$

Se realizaron las siguientes conversiones para facilitar los cálculos:

$$0.245 \text{ cm}^3 = 0.245 \text{ mL}$$

$$0.245 \text{ mL} \left| \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \right| = 245 \mu\text{L}$$

$$t = \frac{V}{F} \dots (9)$$

Donde:

$$t = \text{Tiempo de residencia (min)}$$

$v = \text{Volumen de reactivos dentro del microchip } (\mu\text{L})$

$F = \text{Flujo total } (\mu\text{L}/\text{h})$

Sustituyendo datos en la ecuación (9)

$$t = \frac{245\mu\text{L}}{1000\mu\text{L}/\text{h}} = 0.245\text{ h}$$

$$0.245\text{ h} \left| \frac{60\text{ min}}{1\text{ h}} \right| = 14.7\text{ min} \approx 15\text{ min}$$

Este tiempo corresponde al tiempo de residencia en la cual los reactivos permanecen dentro del tubo.

El montaje del experimento de *flujo continuo en una sola fase con enfoque hidrodinámico* usando el **Dispositivo B1** se muestra en la **Figura 31**.

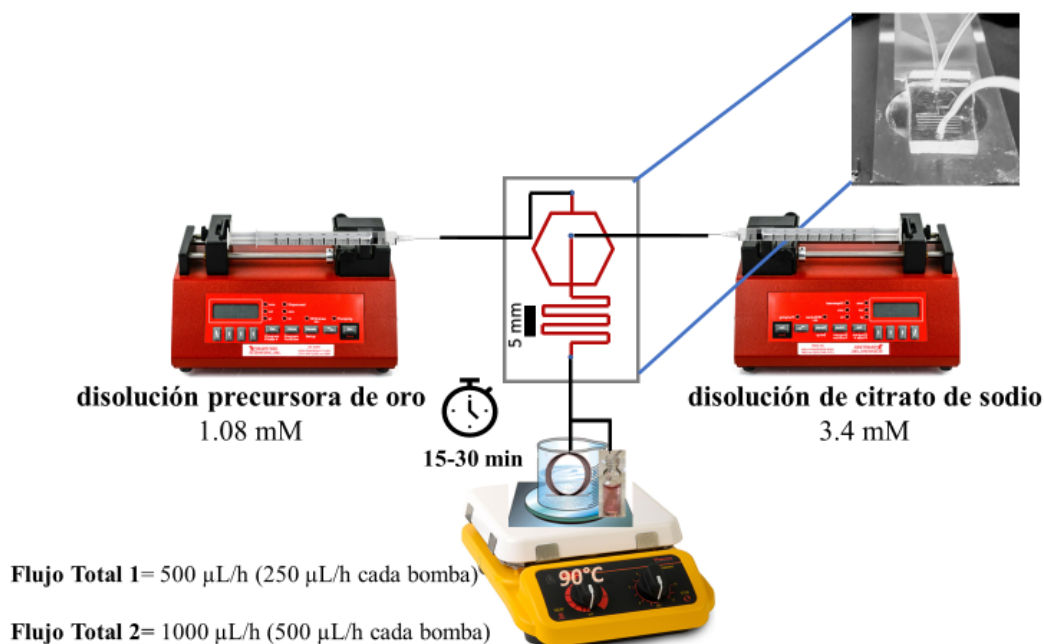


Figura 31. Diseño experimental de las AuNPs en canales de microfluídica (**Dispositivo B1**) por el método de *flujo continuo en una sola fase con enfoque hidrodinámico* usando disoluciones precursoras de oro (1.08 mM) y disoluciones de citrato (3.4 mM) trabajando a dos diferentes flujos totales: **1**) 500 $\mu\text{L}/\text{h}$ (250 $\mu\text{L}/\text{h}$ cada bomba) y **2**) 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$ (500 $\mu\text{L}/\text{h}$ cada bomba) aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 °C. Colocando un serpentina a la salida del microchip sumergido en un vaso de precipitados a una temperatura de 90° C.

II.4. Método de flujo continuo en una sola fase con cavitación

II.4.1. Materiales y equipos

Para este experimento se diseñó el **Dispositivo C1** de microfluídica en PDMS (**Figura 32**). A diferencia de los dispositivos anteriores, se pegó un piezoeléctrico tipo Langevine con frecuencia de resonancia a 61 kHz (modelo SMLTF60W25, Steminc) al mismo portaobjetos donde se adhirió el chip. El transductor piezoeléctrico se fijó al portaobjetos con ayuda de un adhesivo epóxico transparente, marca fusión EPOXY ®. La señal eléctrica sinusoidal que alimentó al piezoeléctrico fue producida en un generador de onda de la marca UNIT-T ® modelo UTG 9005C (± 0.95 V; 61 kHz), y fue amplificada (± 70 V) en un equipo PZD700A M/S de la marca TREK ® y monitoreada con un osciloscopio UTD 2062CE, de la marca UNIT-T ®. Cuando se energiza el elemento piezoeléctrico, la energía eléctrica se transforma en energía mecánica, generando vibraciones a través del vidrio donde se encuentra adherido. Al propagarse estas vibraciones, los fluidos que se encuentran dentro de los microcanales comienzan a presentar cavitación, dando lugar a un mezclado rápido y homogéneo de los reactivos y un aumento de la temperatura en el interior de los canales del microchip.

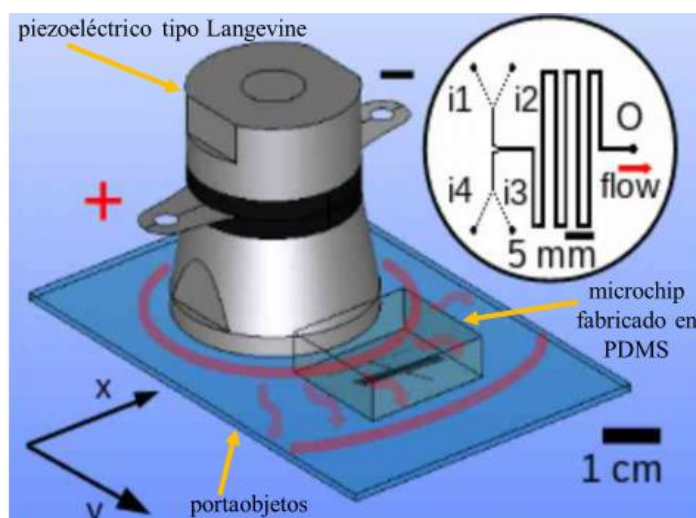


Figura 32. Representación esquemática de la plataforma microfluídica diseñada para el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*. El microchip fabricado de PDMS y el transductor piezoeléctrico tipo Langevin se adhieren al mismo portaobjetos de vidrio. Figura hecha por Erick Nieves (2018).

El piezoeléctrico tipo Langevin fue centrado a la mitad del eje “x” del portaobjetos y a 1.0 cm aproximadamente respecto del origen del eje “y”. Las entradas del microchip etiquetadas como **i1**, **i2**, **i3** e **i4** están orientadas hacia el piezoeléctrico, y la salida apunta en sentido opuesto al transductor (**Figura 32**).

II.4.2. Dispositivo microfluídico C1

Para desarrollar los experimentos de *flujo continuo en una sola fase con cavitación (caso 1)* y *flujo segmentado en dos fases (caso 2)*, el cual se detallará más adelante), se empleó el diseño **Dispositivo C1 (Figura 33)**. Las dimensiones del microchip (300 μm de ancho por 100 μm de altura) permitían además colocar en el mismo portaobjetos un piezoeléctrico tipo Langevine para generar cavitación con los fluidos dentro de los microcanales.

Dispositivo C1

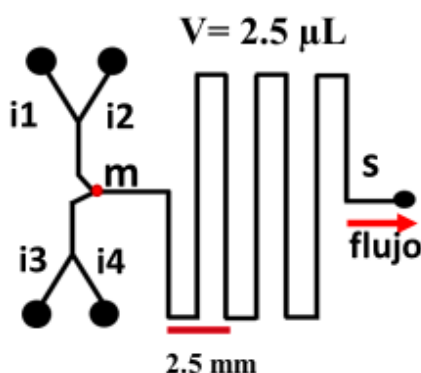


Figura 33. Dispositivo de microfluídica **C1** utilizado para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación* y *flujo segmentado en dos fases*. Entradas del microchip señaladas como (**i1**, **i2**, **i3** e **i4**), punto de convergencia (**m**) y salida indicada como (**s**). Volumen del serpentinado igual a 2.5 μL .

II.4.3. Desarrollo experimental con el Dispositivo C1 de PDMS con cavitación

Para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de oro por el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, se trabajó con la disolución precursora de oro ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1.08 mM y la disolución de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.4 mM. En dos entradas (**i1**, **i2**), se introdujo la disolución precursora de oro programando las bombas con un flujo de 250 $\mu\text{L/h}$ cada una, mientras que en las entradas **i3** e **i4** se inyectó disolución de citrato de sodio con un flujo de 250 $\mu\text{L/h}$ cada una, dando un flujo total de 1000 $\mu\text{L/h}$.

A la salida del microchip, se colocó un serpentinado de PTFE con una longitud de 100 cm manejando un volumen igual 245 μL . Éste se sumergió en un vaso de precipitados, el cual se mantuvo simultáneamente en la parrilla de calentamiento a una temperatura de 90° C. El líquido producido a la salida de este serpentinado fue recolectado en un vial, para su posterior caracterización.

Durante todo el experimento el piezoeléctrico fue accionado a una frecuencia de 61 KHz de frecuencia, observando cavitación en los microcanales.

El montaje del experimento de *flujo continuo en una sola fase con cavitación* se muestra en la **Figura 34**.

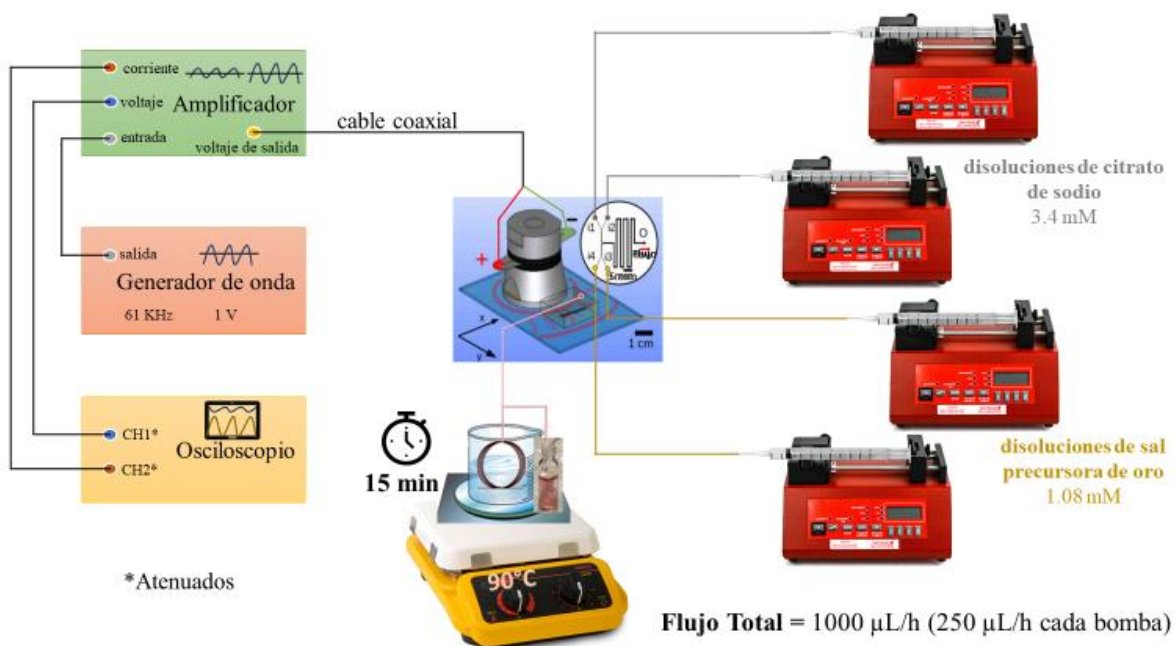


Figura 34. Representación esquemática del diseño experimental de la síntesis de AuNPs oro en canales de microfluídica por el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación* usando disoluciones precursoras de oro 1.08 mM y disoluciones de citrato 3.4 mM mezcladas en una relación de flujo 1:1. Uso de piezoeléctrico tipo Langevin, el cual opera a una frecuencia de 61 KHz. La figura del piezoeléctrico pegada al chip fue elaborada por Erick Nieves (2018).

II.5. Flujo segmentado en dos fases: nanoemulsiones

II.5.1. Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados para efectuar estos experimentos fueron los mismos que en el caso de *flujo continuo en una sola fase con cavitación*, pero además fueron necesarios hexadecano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$) y un tensoactivo no iónico, span 80 ($\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$), comprados en Sigma-Aldrich®. En este caso, también se empleó el **Dispositivo C1**, donde las 4 entradas identificadas como **i1**, **i2**, **i3** e **i4**, se diseñaron con el objetivo de introducir ambas fases de la emulsión constituida por la fase acuosa (disolución precursora de oro y disolución de citrato de sodio), y la fase oleosa (hexadecano puro y hexadecano con tensoactivo (span 80)).

II.5.2. Desarrollo experimental con el Dispositivo C1 de PDMS para flujo segmentado en dos fases

Para realizar la síntesis de las nanopartículas de oro en *flujo segmentado en dos fases*, se usó la disolución precursora de oro (0.5 mM) y la disolución de citrato (1.7 mM), mientras que, para la fase oleosa, se empleó hexadecano puro y hexadecano mezclado con un tensoactivo no iónico (span 80 al 0.1 % m/m.) Cada uno de los reactivos fue introducido de forma separada, a diferentes flujos ($\mu\text{L}/\text{h}$) y manteniendo una relación de 9 partes de aceite por cada parte de agua. En las entradas **i1** e **i2**, se introdujo la fase acuosa correspondiente a la disolución precursora de oro (40 $\mu\text{L}/\text{h}$) y la disolución de citrato de sodio (60 $\mu\text{L}/\text{h}$), respectivamente, mientras que las entradas **i3** e **i4** se asignaron para la fase oleosa, constituida por hexadecano (450 $\mu\text{L}/\text{h}$) y hexadecano mezclado con span 80 al 0.1% (450 $\mu\text{L}/\text{h}$), dando un flujo total de 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$. El piezoeléctrico fue accionado en las mismas condiciones mencionadas y en este caso la presencia del hexadecano y tensoactivo generó una emulsión que se recolectó directamente a la salida del microchip, sin el uso del serpentín de PTFE.

A la salida del microchip se diseñaron dos distintos tipos de experimentos:

- a) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf®.
- b) La emulsión generada en el microchip fue recolectada en un tubo Eppendorf® que fue sumergido simultáneamente en un vaso de precipitado donde se mantenía en calentamiento constante (90 °C).

El montaje del experimento del *método de flujo segmentado en dos fases* se muestra en la **Figura 35**.

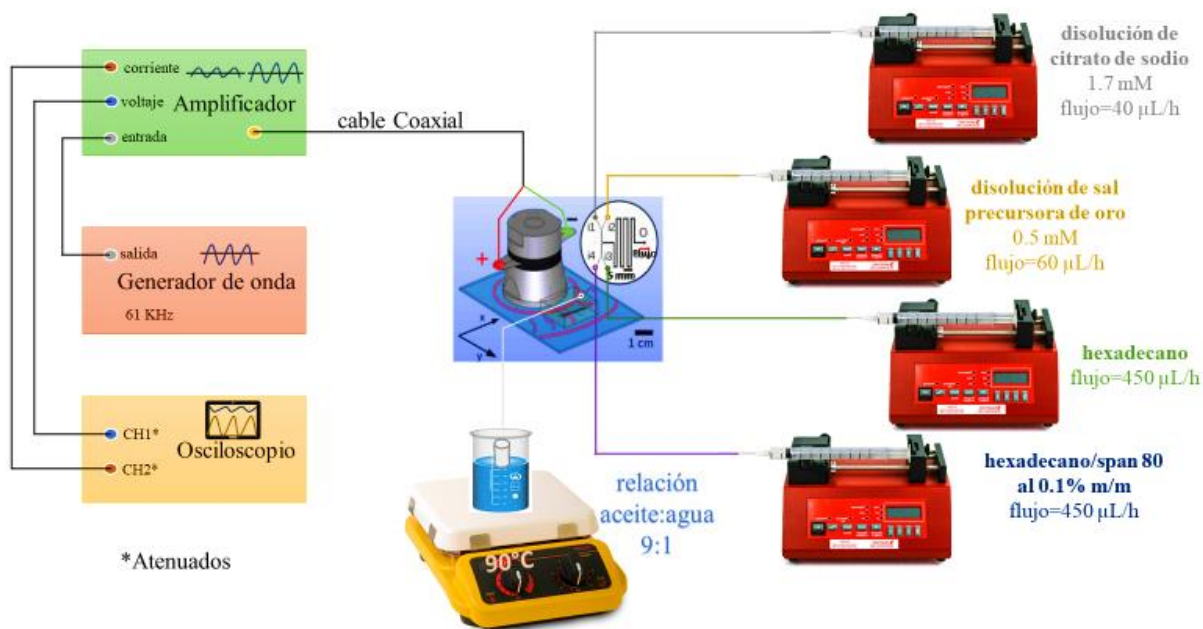


Figura 35. Representación esquemática del diseño experimental, caso **b)** de la síntesis de nanopartículas de oro en canales de microfluídica por el *método de flujo segmentado en dos fases* usando una disolución precursora de oro 0.5 mM y una disolución de citrato 1.7 mM para la fase acuosa, mientras que, para la fase oleosa, se utilizaron 1 mL de hexadecano puro y hexadecano mezclado con span 80 al 0.1 %. La relación aceite:agua fue de 9:1. La figura del piezoeléctrico pegada al chip fue elaborada por Erick Nieves (2018).

II.6. Caracterización de los microchips de microfluídica

El procedimiento que se explica a continuación es el mismo para todos los casos. Aquí se presenta la caracterización del **Dispositivo A1**. Para ello, se utilizó un microscopio digital (Dino Lite AM4515ZTL) que sirvió para inspeccionar el microchip antes de realizar los cortes transversales correspondientes a las réplicas de PDMS. Una vez realizado lo anterior, se utilizó una cámara de alta velocidad (Phantom Micro M-110, Ametek®, USA) acoplada a un microscopio óptico para tomar fotografías de los microcanales (**Figura 36**).

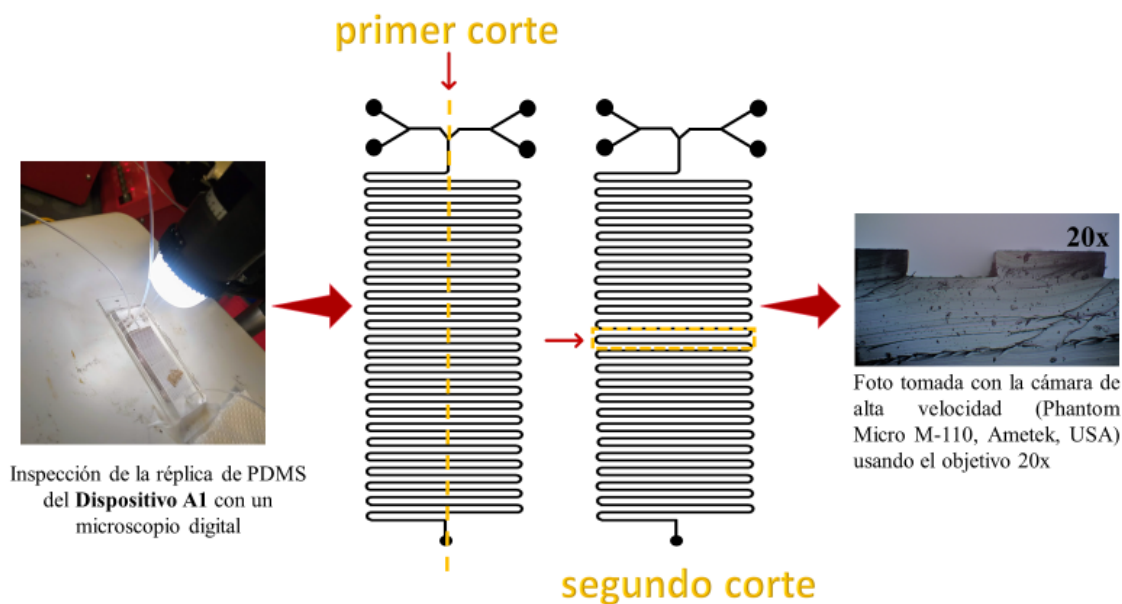


Figura 36. Diagrama del proceso de corte del microchip (**Dispositivo A1**) para su posterior caracterización. Se observan cortes transversales (primer y segundo corte) de los microcanales observados con la cámara Phantom®, usando el objetivo 20x.

A continuación, se tomó una fotografía de la retícula microscópica (PYSER-SGI®, Reino Unido) de 5 mm (**Figura 37**) correspondiente al objetivo 20x y se realizó una calibración con el programa Scope®.

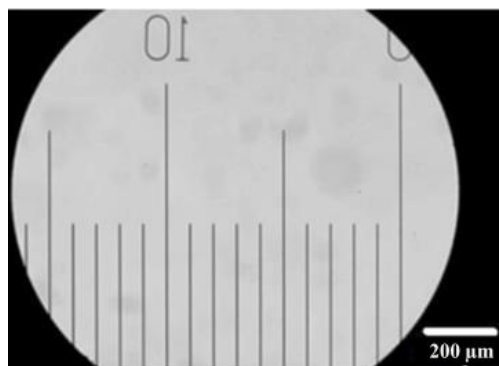


Figura 37. Imagen tomada con la cámara Phantom® de la retícula microscópica (5 mm) empleada para la caracterización de los microchips (objetivo 20x).

Posterior a la calibración, se pudo determinar la altura real de los microcanales, siendo igual a $105.69 \pm 3.18 \mu\text{m}$, así como la anchura real que correspondió a $351.28 \pm 2.37 \mu\text{m}$ (**Figura 38**), estos valores fueron muy similares a los que se establecieron de forma teórica ($350 \mu\text{m}$ de ancho y $100 \mu\text{m}$ de altura), lo cual indicó que el tiempo de exposición de la oblea de silicio a la luz UV (descrito en la sección II.1.2) fue el óptimo.

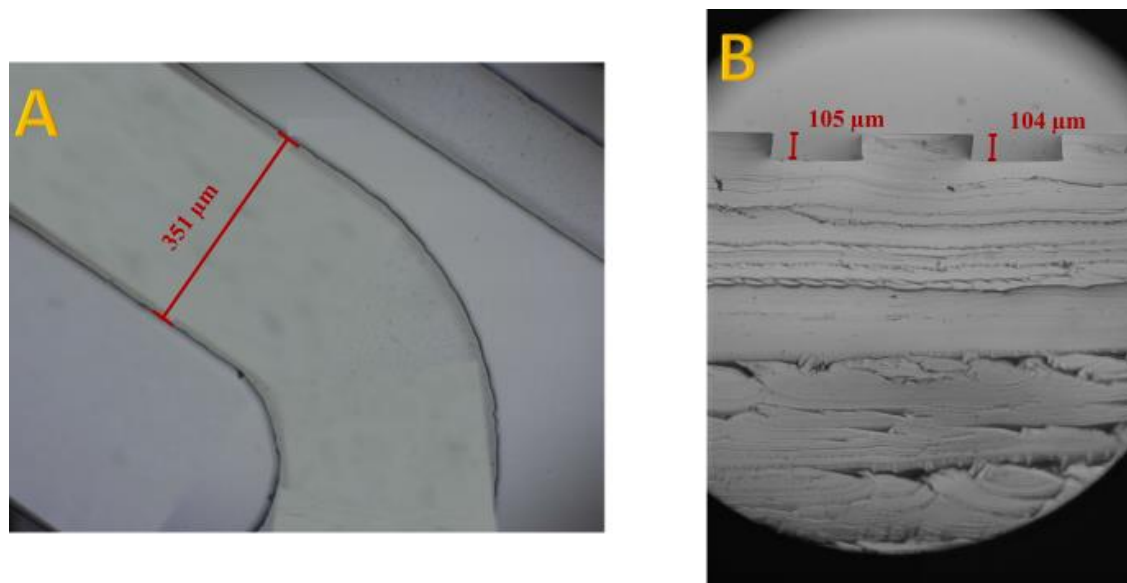


Figura 38. Caracterización del microchip (**Dispositivo A1**), medidas representativas de: **A)** canal serpentin exhibiendo la anchura de los microcanales. **B)** corte transversal donde se muestran las alturas de los microcanales.

Además, fue posible medir la longitud total del serpentin tomando en cuenta los codos como si tuvieran forma de semicírculos, dando como resultado una longitud total real igual a 773.67 mm, es decir 0.48% mayor de lo esperado, lo cual tampoco fue significativo al momento de realizar los experimentos.

II.7. Caracterización de las nanopartículas de oro

II.7.1. Preparación de muestras para analizar espectros electrónicos de absorción en el espectrofotómetro en la región UV-Vis

Los espectros electrónicos de absorción de las nanopartículas de oro fueron medidos en un espectrofotómetro en la región UV-Vis (Varian Cary 50 ®) por triplicado en un intervalo de 350-650 nm. Las dispersiones coloidales que contenían a las nanopartículas de oro fueron preparadas a diferentes diluciones usando agua desionizada como disolvente. Se utilizaron celdas de cuarzo (Innovative Lab Supply ®). En algunos casos, donde no se logró recolectar el suficiente volumen de líquido, se utilizaron celdas de plástico de volumen reducido usando solo 600 μL de líquido.

II.7.2. Preparación de muestras para caracterizar el tamaño y polidispersidad de las nanopartículas de oro en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS)

Para conocer la distribución de tamaños de los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas de oro, se realizaron mediciones en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) modelo Zetasizer Nano ZS de la marca Malvern Instruments®. Este equipo está equipado con un láser rojo (633 nm, 4 mW) y un ángulo de detección de 173 °.

Para realizar las mediciones, se tomaron como referencia el intervalo de concentraciones donde se encontró una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de las AuNPs (1.53×10^{-9} M – 1.68×10^{-10} M). Cada muestra se evaluó por triplicado, recolectando los datos en el software Zetasizer versión 7.11 el cual utiliza el método de cumulantes para el análisis.

En todos los casos, los resultados obtenidos se expresaron en función de la distribución de la intensidad de tamaños de partícula, de acuerdo con las sugerencias hechas por Zheng y colaboradores⁵⁹.

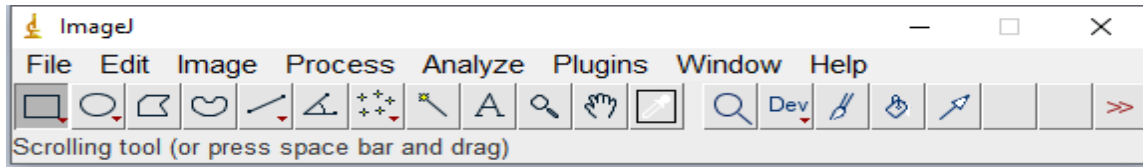
II.7.3. Preparación de muestras para caracterizar el tamaño y la morfología de las nanopartículas de oro en un microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Para conocer la morfología, así como el tamaño de las nanopartículas se llevaron a cabo análisis en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) 2010 JEOL ® operando a 200 kV (USAII, Facultad de Química, UNAM). Todas las muestras fueron preparadas usando el mismo protocolo, donde se colocó una sola gota de la dispersión acuosa a analizar sobre una malla de cobre Formvar (200 mesh) dejando evaporar el disolvente (agua desionizada) durante al menos 30 min. Para el análisis de las micrografías, se utilizó el software Gatan Microscopy Suite versión 3.31.2360.0.

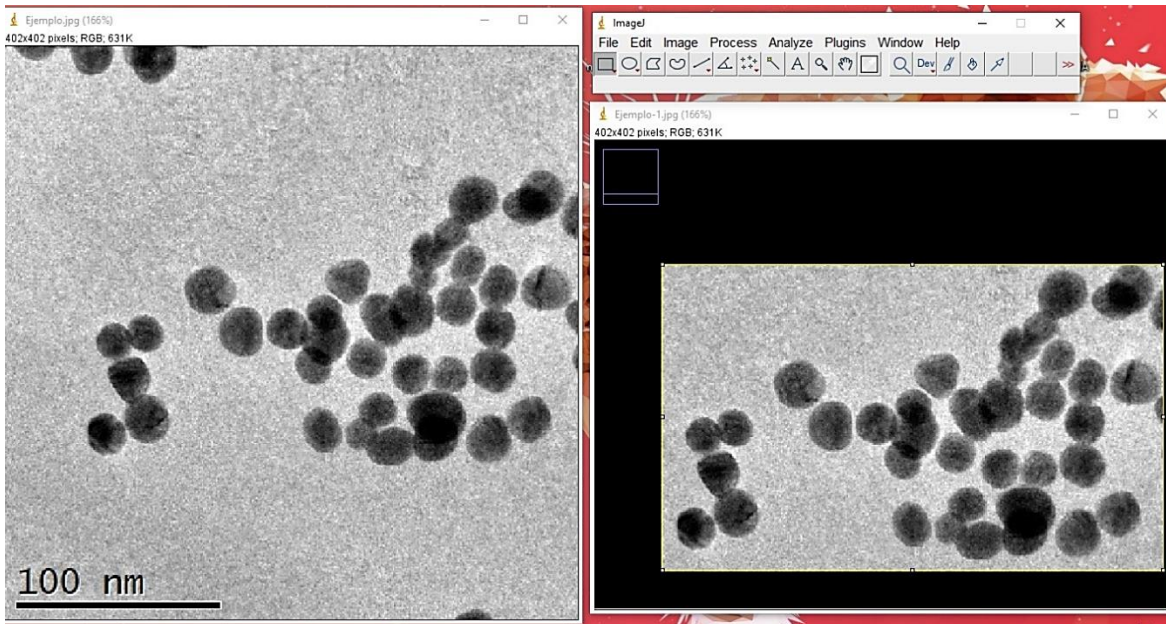
II.7.4. Construcción de los histogramas a partir de las micrografías usando el software Image J

Una vez que se obtuvieron las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) referentes a las nanopartículas de oro sintetizadas por diferentes métodos, se estableció en el laboratorio una metodología para analizar las imágenes utilizando el software Image J recolectando información de entre 60 y 100 nanopartículas por cada método para construir un histograma en cada caso haciendo lo siguiente:

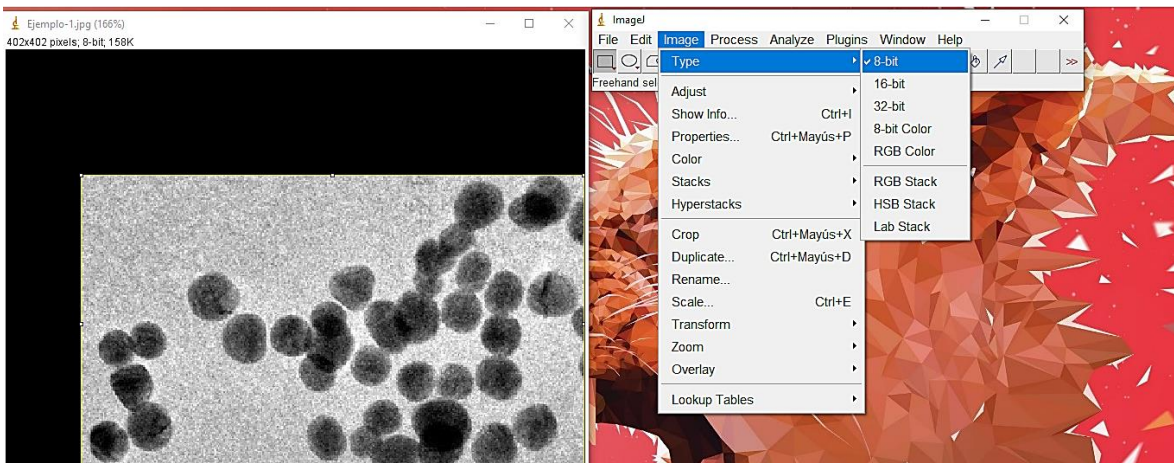
- 1) De todos los archivos de Gatan Microscopy Suite se seleccionan las micrografías a analizar guardando los archivos en formato .jpg.
- 2) Se abre el programa ImageJ. Exe y se llama al archivo previamente guardado.




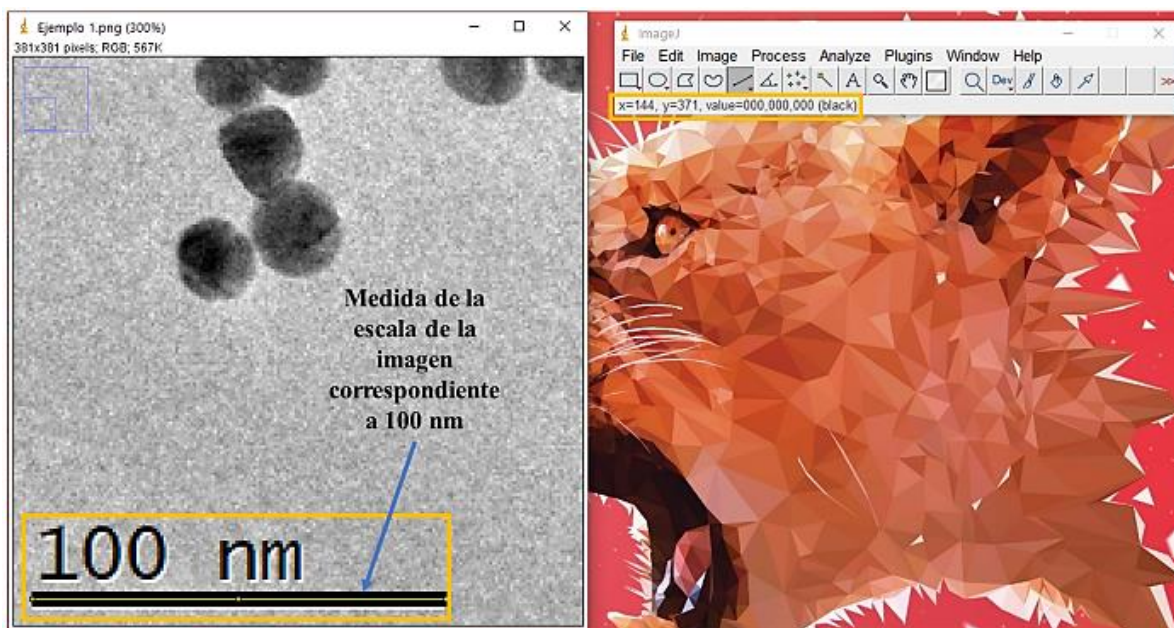
3) Se duplica la imagen para poder compararla con la micrografía original y se selecciona el área a analizar. Image >> Duplicate.// Edit >> Clear Outside.



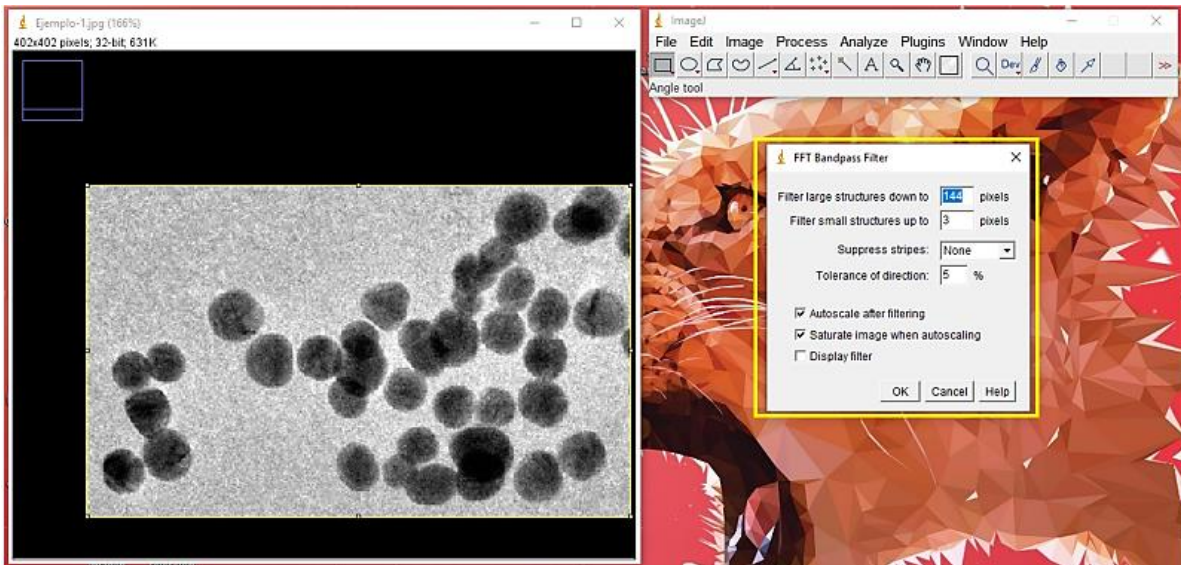
4) Se convierte la imagen duplicada a 8 Bits convirtiéndola a formato binario. Image >> Type >> 8 bits.



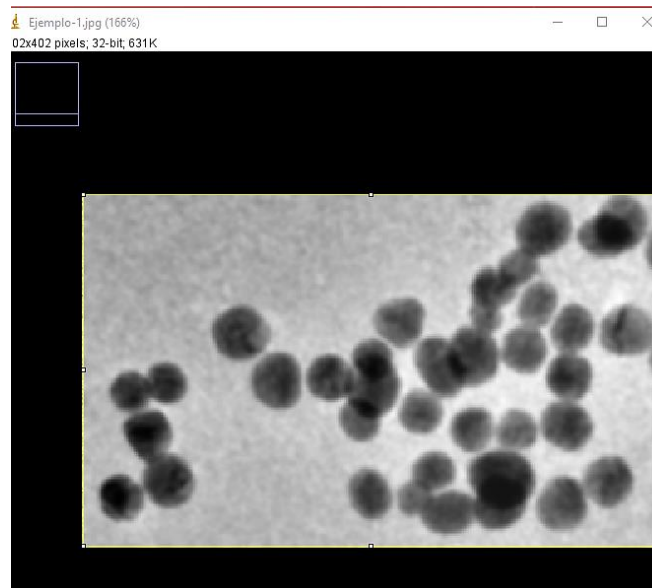
5) Para procesar la imagen se va a Process >> FFT >> Bandpassfilter y ahí se seleccionan los intervalos de tamaño de partículas en pixeles que serán detectados por el programa, sobre todo cuando en la imagen existen estructuras cuyos tamaños o formas sean anómalos o salgan de los límites estipulados. Para establecer los límites, se requirió primero medir la escala a la que fueron tomadas cada una de las imágenes que se analizaron y así conocer la equivalencia entre un pixel y el tamaño correspondiente a esa escala en nanómetros. Lo anterior se realiza seleccionando la herramienta  la cual permite dibujar líneas o medir segmentos.



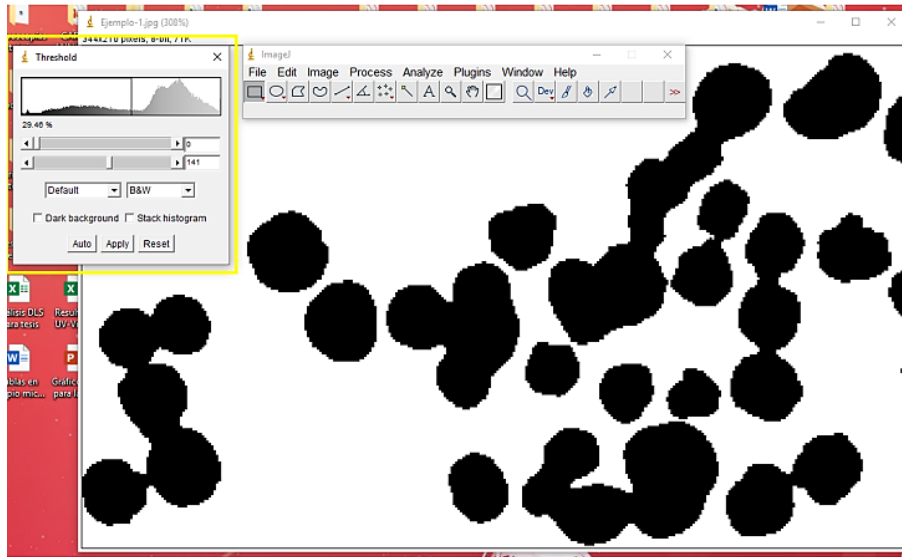
Como se muestra en la imagen anterior, cuando se coloca la línea sobre el segmento correspondiente a la escala de 100 nm, las medidas “x” (largo) y “y” (alto) se relacionan con los pixeles equivalentes a la medición, de ahí que en el ejemplo señalado 100 nm sean equivalentes a 144 pixeles. Gracias a lo anterior, se pudo delimitar la selección entre estructuras menores a 144 pixeles (100 nm) y mayores a 3 pixeles (2.08 nm), ya que teóricamente, las nanopartículas sintetizadas en todos los casos se esperaban tuvieran tamaños aproximados entre 14 y 22 nm de diámetro.



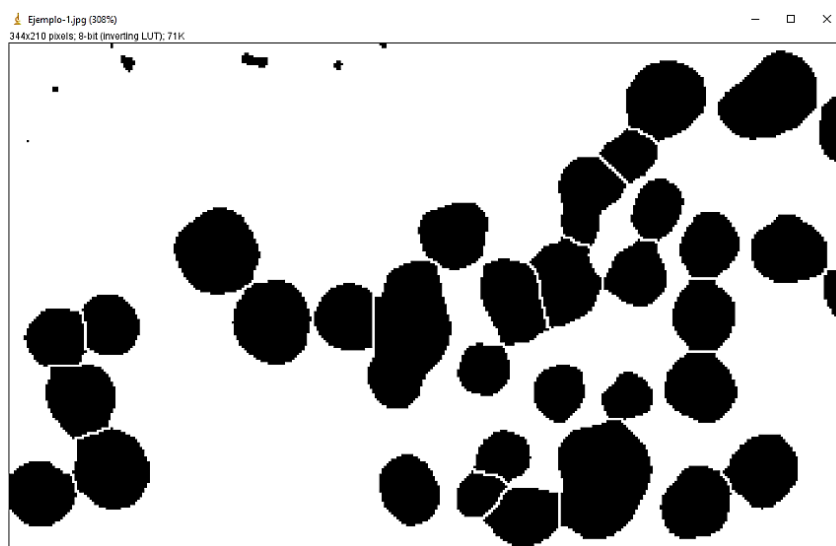
Tras aplicar el filtro, la imagen quedará borrosa con las figuras difuminadas, como se muestra a continuación.



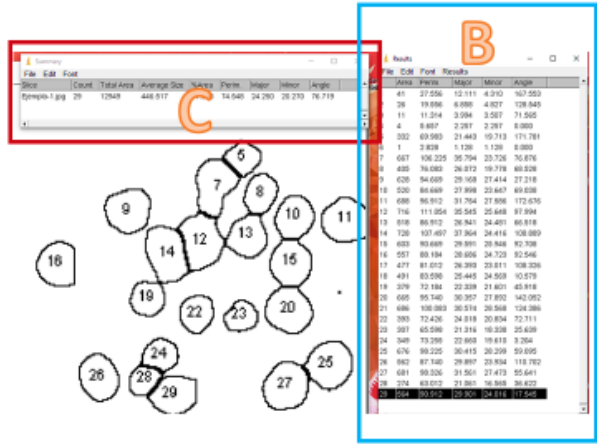
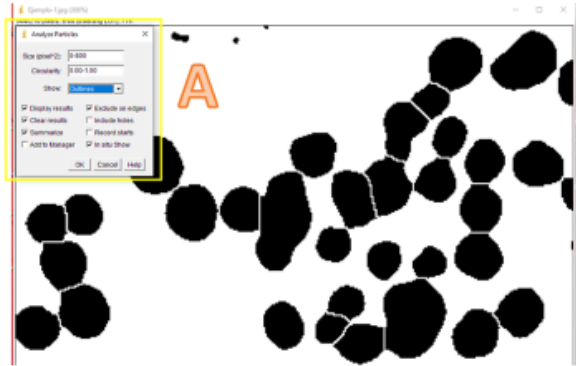
6) Nuevamente nos vamos a la parte de ajustes y aplicamos la herramienta “Threshold”. Al seguir correctamente los pasos, el área que pertenece a las nanopartículas de oro se vuelve negra, mientras que el exterior es blanco. Incluso se puede definir con mayor precisión las formas de interés al explorar los matices entre los tonos blanco y negro, expuestos en el área bajo la curva que se muestra en el recuadro de la izquierda.



En el caso en el que se observen muchos aglomerados o una distribución poco definida de nanopartículas, se puede aplicar la herramienta de “Watershed”. Adjust >> Process >> Binary >> MakeBinary >> Watershed.



7) Para conocer los tamaños correspondientes de las nanopartículas seleccionamos en el menú Analyze >> Analyze Particles. A continuación, aparecerá un recuadro donde se delimitan los tamaños de áreas (píxeles²) que serán medidas colocando un límite inferior y superior, señalado en la siguiente imagen en un cuadro amarillo con la letra **A**. Al darle clic en “ok”, aparecerá un archivo que enlista las estructuras que se tomaron en cuenta asignándoles un número el cual debe corresponder a su área, perímetro, así como diámetro mayor y menor, en caso de que las estructuras fueran elípticas. Lo anterior se observa en el cuadro azul con la letra **B** de la próxima figura. Por último, aparecerá un resumen de los datos obtenidos (cuadro rojo, letra **C**) contabilizando el número de datos obtenidos, el área total, así como los promedios de los datos registrados en la tabla de la imagen **B**. Todas las unidades se encuentran en píxeles.



8) Para transformar los datos de pixeles a nanómetros, estos se copian en una tabla en Excel para ser tratados. Se parte del supuesto de que las estructuras observadas son circulares en su mayoría, por lo que se despejan los diámetros de las estructuras partiendo ya sea del área o del perímetro de un círculo. Una vez que se conocen los diámetros en pixeles, el cambio de unidades es por medio de la conversión entre una referencia que es la escala (100 nm - 144 pixeles) a la cual se tomó la micrografía y su equivalencia en nanómetros.

Autoguardado Histogramas nanopartículas microscópicas - Excel Buscar ENRIQUE BERNAL FRANCO

Archivo Inicio Insertar Disposición de página Fórmulas Datos Revisar Vista Ayuda

Calibrí 11 A⁺ Ajustar texto General

Formato condicional Dar formato como tabla Estilos de celda Insertar Eliminar Formato

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		Área	Perímetro	Diámetro mayor	Diámetro menor	Diámetro en función del área	Diámetro en función del perímetro	Diámetro en función del área	Diámetro en función del perímetro
2		pixeles	pixeles	pixeles	pixeles	pixeles	pixeles	nanómetros	nanómetros
3	1	515	92.669	34.753	18.868	25.607	29.497	17.783	20.484
4	2	999	122.024	41.451	30.686	35.665	38.841	24.767	26.973
5	3	696	116.468	40.782	21.729	29.769	37.073	20.673	25.745
6	4	793	142.711	42.552	23.728	31.775	45.426	22.066	31.546
7	5	357	78.569	23.702	19.177	21.320	25.009	14.806	17.368
8	6	564	105.397	28.306	25.370	26.798	33.549	18.609	23.298
9	7	944	119.296	41.720	28.810	34.669	37.973	24.076	26.370
10	8	715	120.610	41.521	21.925	30.172	38.391	20.953	26.661
11	9	594	94.426	30.418	24.864	27.501	30.057	19.098	20.873
12	10	227	63.841	19.282	14.989	17.001	20.321	11.806	14.112
13	11	834	119.882	42.727	24.853	32.587	38.160	22.630	26.500
14	12	140	44.284	14.942	11.930	13.351	14.096	9.272	9.789
15	13	461	84.083	27.633	21.242	24.227	26.764	16.825	18.586
16	14	509	87.841	27.062	23.947	25.457	27.961	17.679	19.417

Los histogramas correspondientes se muestran la parte de Resultados de este trabajo de investigación, y las tablas para construir los histogramas, en la parte de los Anexos.

III. RESULTADOS

III.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro

III.1.1. Método en batch o método de Turkevich convencionales sintetizadas en macroescala

Al realizar la síntesis de las nanopartículas de oro por el método de Turkevich se pudieron visualizar la siguiente gama de colores a lo largo de la reacción (**Figura 39**):

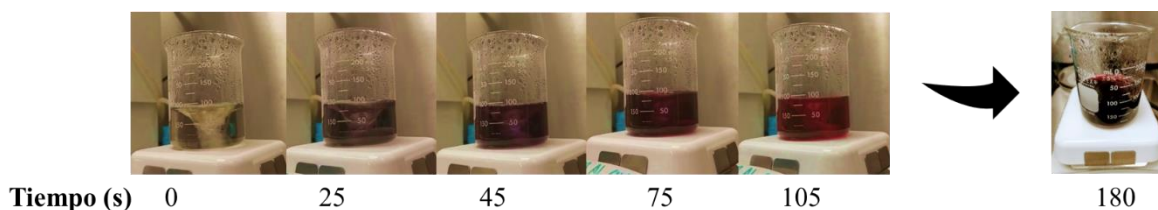


Figura 39. Cambios de coloración presentes en la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich en macroescala (100 mL) y dispersión coloidal color rojo borgoña que contiene AuNPs.

Tiempo (seg)	Cambios visibles
0-25	La disolución que originalmente era ligeramente amarilla transparente, se torna incolora.
25-45	Se aprecian tonalidades oscuras, desde negro hasta azuladas.
45-75	Se observan tonos entre morados y vino.
75-105	Se presentan tonos rojizos, parecidos a rojo cereza.
105-180	Los tonos rojizos se vuelven más oscuros.
180-300	La ahora dispersión coloidal presenta tonos color rojo borgoña.

Toda la gama de colores observados en la reacción dio como resultado una dispersión coloidal de nanopartículas de oro (AuNPs) color rojo borgoña. Lo anterior, puede ser explicado gracias al fenómeno de resonancia de plasmón superficial (*SPR*, por sus siglas en inglés), en cuyo caso, para nanopartículas de oro, esféricas y monodispersas de tamaños inferiores a 30 nm, la luz se absorbe en la región verde-azulada del visible (470-520 nm), mientras que la luz roja (620-680 nm) es reflejada.

Posteriormente, se tomó una muestra representativa de las nanopartículas de oro, para poder analizarla mediante diferentes técnicas que fueron:

- ❖ Espectroscopía de absorción electrónica en la región del UV-Visible.
- ❖ Dispersión dinámica de Luz (DLS) para determinar el diámetro hidrodinámico promedio (Z-average) e índice de polidispersidad (PDI).
- ❖ Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

III.1.2. Espectros de absorción electrónica en la región del visible de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich

La gráfica que se muestra en la **Figura 40**, representa el promedio de una muestra de la dispersión coloidal analizada por triplicado, así como de sus respectivas diluciones, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala, a un volumen de 100 mL.

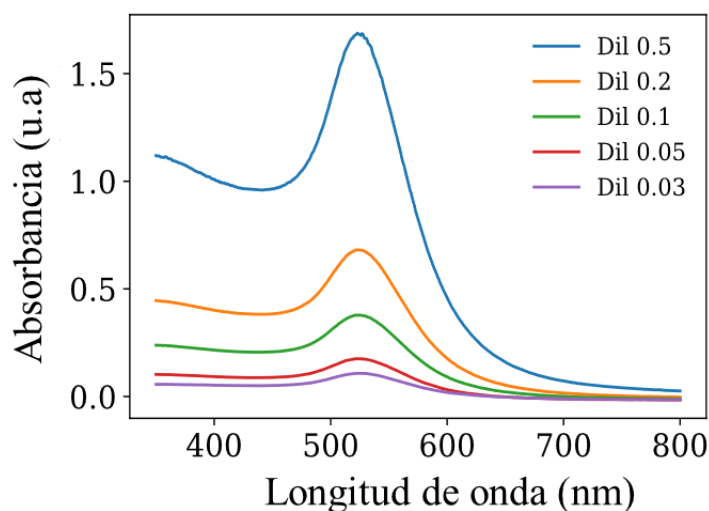


Figura 40. Espectros de absorción electrónica en la región del visible tomados de una muestra de AuNPs fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala (100 mL) a diferentes diluciones.

Se observa que para todas las diluciones la longitud de onda del máximo de absorción de la resonancia del plasmón superficial (SPR) muestra un valor de 523 nm y valores de absorbancia entre 1.713 y 0.132 u.a dependiendo de la dilución (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resumen de resultados correspondientes a los espectros de absorción obtenidos por el método de Turkevich en macroescala a diferentes diluciones.

Muestra	Dilución	λ_{spr} (nm)	Abs ₅₂₃ (u.a)
1	0.5	523	1.6886
2	0.2	523	0.6814
3	0.1	523	0.3785
4	0.05	523	0.1754
5	0.03	523	0.1078

Con estos datos, se correlacionó la absorbancia y la concentración relativa de las muestras sintetizadas por el método de Turkevich:

Método de Turkevich Absorbancia a 523 nm

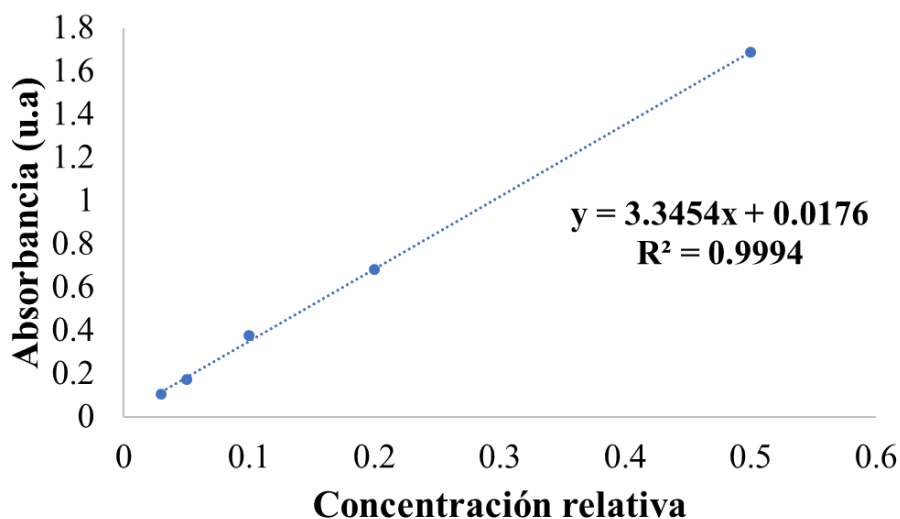


Figura 41. Correlación entre la absorbancia (523 nm) y la concentración relativa de muestras de AuNPs fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala a diferentes diluciones.

La absorbancia y la concentración relativa de las nanopartículas de oro se encuentra directamente relacionada para un intervalo de concentraciones relativas desde 0.5 hasta 0.03, lo que sugiere que los coloides de AuNPs son estables al ser diluidos en agua desionizada en las proporciones indicadas (**Figura 41**).

III.1.3. Estimación de la concentración de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich a diferentes diluciones

Una forma sencilla de estimar la concentración de nanopartículas en una suspensión es por medio de su absorbancia en espectroscopía de absorción electrónica en la región visible. Para ello se tomó como referencia el trabajo publicado por Haiss y colaboradores ⁶⁰. En dicho artículo, se hace patente que el coeficiente de absorción (ϵ) de las AuNPs depende de su tamaño, por lo que primero se debe estimar el diámetro de las nanopartículas. Dichos autores recabaron los espectros de absorción electrónica en la región visible de nanopartículas de oro sintetizadas por ellos mismos, así como de AuNPs comerciales y realizaron estimaciones para determinar la posición de la señal del pico de resonancia de plasmón superficial (λ_{SPR}) en función del diámetro de partícula (d/nm), presentando la siguiente información:

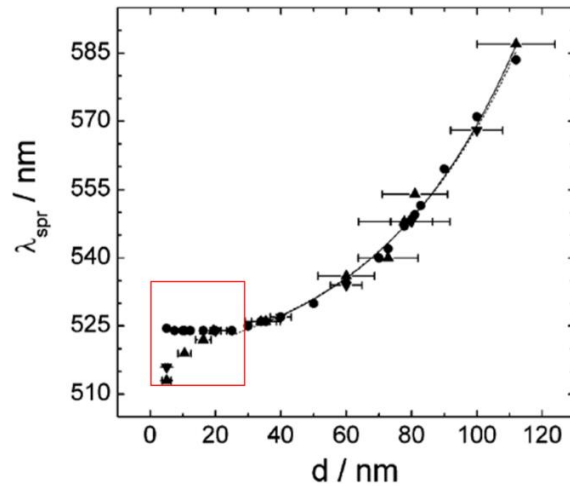


Figura 42. Posición de la señal del pico de resonancia de plasmón superficial (λ_{spr}) en función del ϕ de partícula de las AuNPs en dispersión coloidal: Calculadas (círculo); experimentalmente medidas (triángulo hacia abajo), AuNPs comerciales (triángulo hacia arriba). Se realizó un ajuste exponencial para los datos calculados (línea punteada) y experimentales (línea continua) para $d > 25$ nm ⁶⁰.

En la gráfica de la **Figura 42**, se pueden observar nanopartículas cuyos diámetros van desde los 5 hasta los 110 nm, así como sus respectivos valores de λ_{spr} . Se hace énfasis, señalando en un cuadro rojo aquellos datos que corresponden a nanopartículas con diámetros menores a 35 nm, ya que estos tamaños corresponden a las AuNPs sintetizadas en esta tesis. Para calcular los valores de coeficiente de absorptividad para AuNPs esféricas menores a 35 nm, el artículo propone un método que consiste en relacionar primeramente los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda para determinar el tamaño de partícula ⁶⁰.

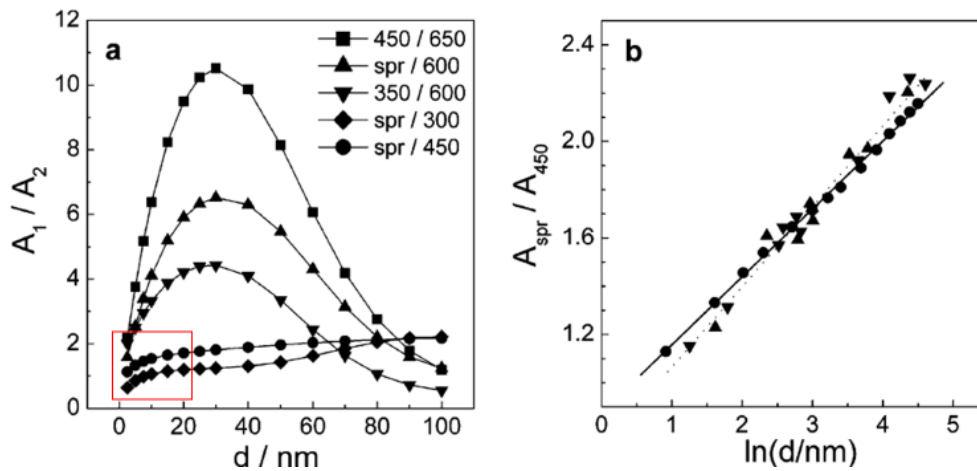


Figura 43. (a) Relación de valores de absorbancia de AuNPs esféricas en dependencia con su diámetro (nm). (b) Cociente de la absorbancia de las AuNPs referente al plasmón superficial (A_{spr}) y el valor del pico máximo de absorbancia a 450 nm (A_{450}) en dependencia con el logaritmo natural del diámetro de partícula: Valores calculados (esferas) vs. valores experimentales (triángulos). Ajuste de los datos calculados (línea punteada) y de los datos experimentales (línea sólida) ⁶⁰.

Las relaciones de absorbancia que se muestran en la gráfica (a) de la **Figura 43** son dependientes del diámetro de partícula, donde el cálculo del diámetro se determinó primeramente usando un modelo que ajusta mejor para partículas cuyos diámetros son mayores a 35 nm. Para $d < 35$ nm el valor de la absorbancia en la señal de resonancia de plasmón superficial (A_{spr}) disminuye significativamente en comparación a la absorbancia medida a otras longitudes de onda, por lo que el cociente de la absorbancia a diferentes longitudes de onda puede ser usado para determinar el diámetro de partícula sin conocer su concentración ⁶⁰. De entre todos los cocientes, se encontró que la mejor relación entre A_1/A_2 para nanopartículas menores a 20 nm, como es nuestro caso (ver sección II.2.2) fue igual a: $A_1=A_{spr}$ y $A_2=A_{450}$ (cuadro rojo **Figura 43**). Además, se muestra la relación lineal que existe entre el cociente de las absorbancias y el logaritmo natural de los diámetros (**Figura 43-b**).

Para las nanopartículas de oro sintetizadas en este trabajo por el método de Turkevich en macroescala, el cociente se calculó relacionando los valores de las absorbancias $A_1=A_{523}$ y $A_2=A_{450}$, encontrando los valores que se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Relación de absorbancias A_{523}/A_{450} correspondientes a los de resultados obtenidos por el método de Turkevich en macroescala a diferentes diluciones.

Muestra	Dilución	λ_{spr}	Abs523	λ_{450}	Abs450	A_{523}/A_{450}
1	0.5	523	1.6886	450	0.9658	1.75
2	0.2	523	0.6814	450	0.3842	1.77
3	0.1	523	0.3785	450	0.2077	1.82
4	0.05	523	0.1754	450	0.0513	3.42
5	0.03	523	0.1078	450	0.0510	2.11

Una vez determinados los valores del cociente A_{523}/A_{450} , se substituyó este valor en la siguiente ecuación:

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right) \dots (10)$$

Donde:

d: Diámetro de partícula (nm)

A_{spr} = Absorbancia medida en la señal de resonancia de plasmón superficial

A_{450} = Absorbancia medida a 450 nm

B_1 = Inversa de la pendiente (m) del ajuste lineal realizado en la **Figura 43-(b)**

B_2 = B_0/m donde B_0 es correspondiente al punto de intercepción

Tabla 5. Relación de valores de absorbancias A_{523}/A_{450} en función de los diámetros de partícula calculados a partir de la ecuación 10, usando los parámetros de ajuste para los resultados experimentales reportados en el artículo de Haiss y colaboradores ⁶⁰.

Muestra	Dilución	A_{523}/A_{450}	d.nm
1	0.5	1.75	21
2	0.2	1.77	23
3	0.1	1.82	26
4	0.05	3.42	3157
5	0.03	2.11	63

En el caso de las *muestras 1, 2 y 3* los diámetros de partícula estimados son congruentes entre sí, considerando que este modelo presenta hasta un 11% de error ⁶⁰, y la ligera tendencia de crecimiento en el tamaño para cada dilución podría ser debido a la dilución del agente estabilizante. Sin embargo, en los casos de las *muestras 4 y 5* se presentan tamaños de partícula mucho mayores a lo esperado. Esto podría deberse a que las absorbancias de estas dos muestras a 450 nm son pequeñas (menores a 0.2) y el equipo de absorción electrónica en la región del UV-Vis ya no mide con la misma exactitud. Específicamente la gráfica de absorbancia a 450 nm vs. concentración relativa, indica que la absorbancia de la *muestra 4*, cuya dilución corresponde a 0.05 (**Figura 44**) está muy por debajo de la tendencia observada para las otras diluciones.

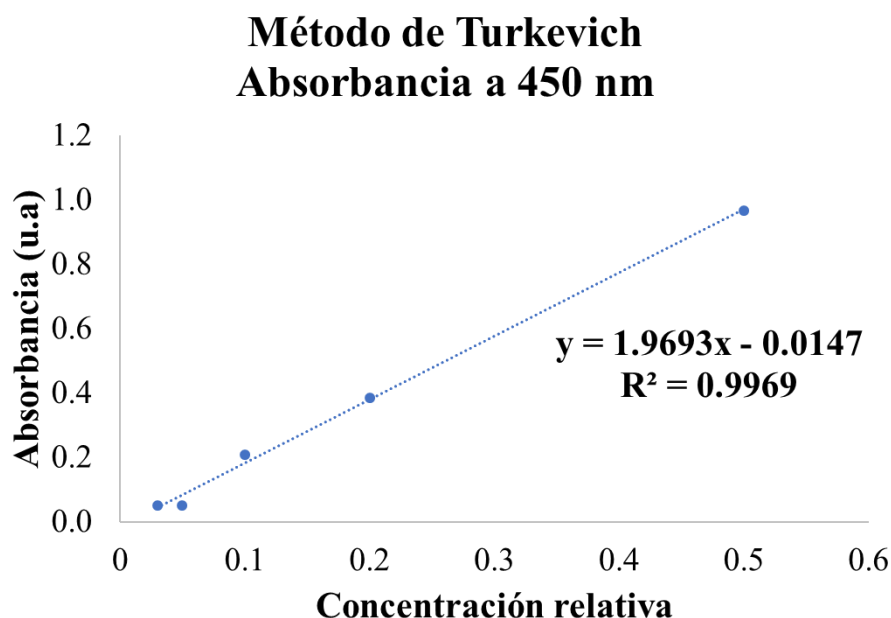


Figura 44. Correlación entre la absorbancia (450 nm) y la concentración relativa de muestras de nanopartículas de oro (AuNPs) fabricadas por el *método de Turkevich* en macroescala a diferentes diluciones.

Seguido de esto, se utilizó el coeficiente de extinción molar $M^{-1} cm^{-1}$ a una longitud de onda de 450 nm (ϵ_{450}) propuesto por Haiss y colaboradores (**Tabla 6**)⁶¹ para los tres datos de tamaños obtenidos.

Tabla 6. Coeficientes de extinción molar (ϵ) a $\lambda=450$ nm para nanopartículas de oro en dispersión coloidal para diámetros de partícula desde 2 hasta 64 nm⁶¹.

d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$
2	4.25E+05	11	8.27E+07	20	5.41E+08	29	1.76E+09	38	4.18E+09	47	8.18E+09	56	1.41E+10
3	1.49E+06	12	1.09E+08	21	6.31E+08	30	1.96E+09	39	4.54E+08	48	8.74E+09	57	1.48E+10
4	3.62E+06	13	1.39E+08	22	7.31E+08	31	2.18E+09	40	4.92E+09	49	9.32E+09	58	1.57E+10
5	7.20E+06	14	1.76E+08	23	8.42E+08	32	2.41E+09	41	5.32E+09	50	9.92E+09	59	1.65E+10
6	1.26E+07	15	2.18E+08	24	9.64E+08	33	2.66E+09	42	5.74E+09	51	1.06E+10	60	1.73E+10
7	2.03E+07	16	2.67E+08	25	1.10E+09	34	2.93E+09	43	6.18E+09	52	1.12E+10	61	1.82E+10
8	3.07E+07	17	3.24E+08	26	1.24E+09	35	3.21E+09	44	6.65E+09	53	1.19E+10	62	1.91E+09
9	4.43E+07	18	3.87E+08	27	1.40E+09	36	3.52E+09	45	7.13E+09	54	1.26E+10	63	2.00E+10
10	6.15E+07	19	4.60E+08	28	1.58E+09	37	3.84E+09	46	7.65E+09	55	1.33E+10	64	2.10E+10

De acuerdo con los datos, al aumentar el tamaño de las partículas su coeficiente de extinción molar aumenta. Los valores correspondientes de ϵ a $\lambda=450$ nm para las nanopartículas de oro correspondientes a las muestras **1** (color naranja), **2** (color verde) y **3** (color rosa) se encuentran respectivamente sombreados.

Con estos datos, fue posible calcular la concentración en mol/L tomando en cuenta los valores de absorbancia, medidos a 450 nm (A_{450}) para una celda estándar con una longitud de 1 cm.

$$C_{AuNPs} = \frac{A_{450}}{\epsilon_{450}} \dots (11)$$

Al sustituir los valores correspondientes en la ecuación 11, se determinaron las concentraciones correspondientes de las nanopartículas de oro sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala, a diferentes diluciones.

Tabla 7. Resumen de resultados correspondientes a la concentración de las AuNPs en mol/L para valores de coeficiente de extinción molar (ϵ) a $\lambda=450$ nm y absorbancias medidas a 450 nm (A_{450}).

Muestra	Dilución	A_{523}/A_{450}	A_{450}	d nm	ϵ_{450} $M^{-1} cm^{-1}$	C_{AuNPs} mol/L	C_{AuNPs} Sin diluir mol/L
1	0.5	1.75	0.97	21	6.31×10^8	1.53×10^{-9}	3.06×10^{-9}
2	0.2	1.77	0.38	23	8.42×10^8	4.56×10^{-10}	2.28×10^{-9}
3	0.1	1.82	0.21	26	1.24×10^9	1.68×10^{-10}	1.68×10^{-9}

El intervalo de concentraciones de las nanopartículas de oro sintetizadas por el *método de Turkevich* se estimó entre 1.7 y 3.1 nM, de acuerdo con los valores obtenidos en la **Tabla 7**.

III.1.4. Caracterización del tamaño, distribución del tamaño y polidispersidad de AuNPs

Cada una de las distintas técnicas de caracterización que se presentan a continuación, aporta información complementaria referente al tamaño y su distribución, así como de la polidispersidad y morfología de las nanopartículas de oro. Cabe aclarar, que las técnicas no son directamente comparables entre ellas, ya que estas miden diferentes propiedades de las muestras bajo distintas condiciones.

En el caso del DLS, el equipo detecta las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada causadas por el movimiento Browniano de partículas suspendidas en un líquido. Esta técnica es sensible a los cambios presentes en la dispersión con respecto al tiempo, como puede ser la aglomeración de las nanopartículas. Además de la determinación de los tamaños hidrodinámicos, un parámetro numérico que se obtiene por DLS es el índice de polidispersidad (PDI), el cual es un parámetro adimensional y se refiere a la medida de la amplitud de la dispersión de tamaños detectados. Si se tiene una muestra con un valor de $PDI < 0.1$, se dice que la muestra es monodispersa y su distribución de tamaños es estrecha. Por el contrario, cuando se tienen valores de $PDI > 0.7$, se consideran muestras muy polidispersas y poco aptas para ser analizadas por DLS. Además, otra de las limitaciones del equipo, son las posibles interferencias que pueden alterar la muestra, por ejemplo, la presencia de contaminantes ambientales, como el polvo. Debido a esto es de esperarse tamaños o distribuciones de tamaños mayores en comparación con las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) ⁶².

Por otro lado, la técnica de TEM requiere que la muestra esté seca para su análisis. Al evaporar el disolvente, la caracterización de la muestra puede verse afectada si ésta contiene altas cantidades de sal o moléculas de buffer, también por la formación de cristales que enmascaren las nanopartículas más pequeñas, sin embargo, para este trabajo de investigación, dicha técnica fue la más adecuada, no solo por la capacidad del equipo para recolectar un número representativo de imágenes de las nanopartículas en un corto periodo de tiempo (minutos), sino además gracias a la resolución y precisión de la técnica, pudiendo distinguir entre los tamaños pequeños de partícula obtenidos por los diferentes métodos de síntesis.

Los histogramas graficados donde se presentan los números de partículas vs. el diámetro indican las diferentes poblaciones de nanopartículas observadas en las micrografías electrónicas de transmisión (TEM).

III.1.5. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich utilizando DLS

Para conocer la distribución de tamaños de las nanopartículas de oro, se empleó un equipo dispersor dinámico de luz (DLS). La gráfica siguiente (**Figura 45**) representa la distribución de la intensidad del tamaño de partícula, así como el índice de polidispersidad (PDI) de una dispersión de nanopartículas de oro, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala, medida por esta técnica.

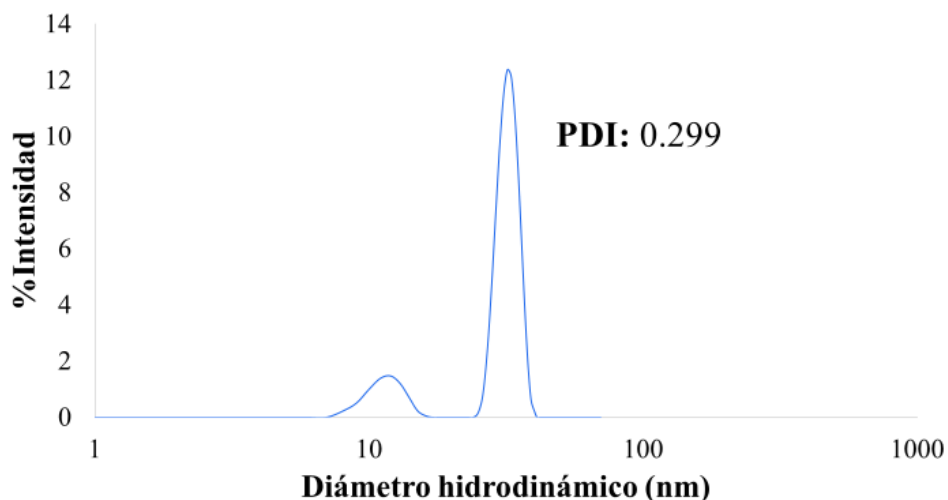


Figura 45. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala, correspondiente a la *muestra 3* (dilución 0.1) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS). La gráfica representa el promedio de tres mediciones de la misma muestra.

La **Figura 45** muestra la existencia de dos principales poblaciones de nanopartículas. La primera familia de izquierda a derecha con un diámetro hidrodinámico promedio de 12 ± 4 nm, mientras que la segunda familia presenta un tamaño promedio de 33 ± 9 nm. El índice de polidispersidad (PDI) es igual a 0.299. Este valor no es alto comparado con muestras muy polidispersas cuyo PDI= 0.7, la presencia de dos familias de nanopartículas confiere un área de oportunidad para optimizar propiedades como la monodispersidad, así como el control sobre los tamaños y estabilidad de las nanopartículas metálicas.

III.1.6. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich

Las micrografías que se muestran a continuación, corresponden a los resultados de dos muestras sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala (*muestra 1* y *muestra 3*). Todas las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), siguiendo los protocolos ya mencionados.

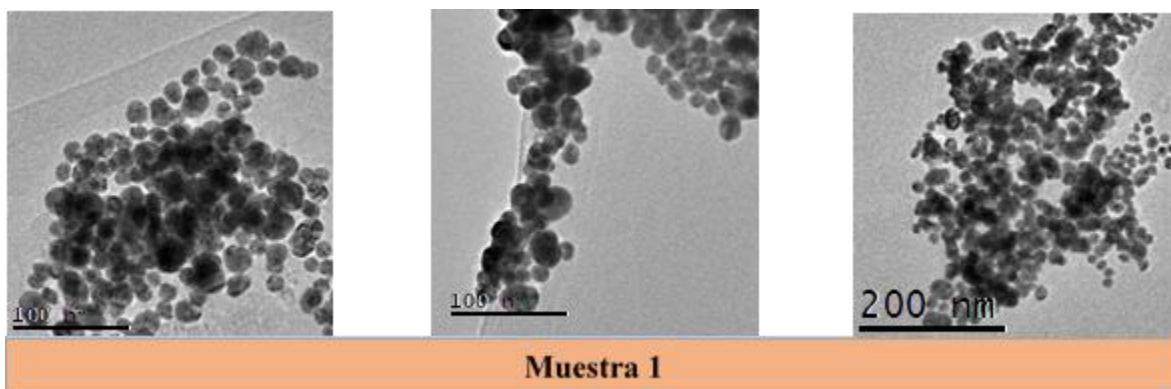


Figura 46. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra 1*) de la dispersión coloidal de AuNPs, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala.

Las tres micrografías obtenidas a partir de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 46**) corresponden a la *muestra 1*, la cual estaba diluida a la mitad respecto a la solución final de la reacción, presentando una absorbancia igual a 1.689 así como una señal de resonancia de plasmón superficial $\lambda_{spr}= 523$ nm. La concentración de las nanopartículas de oro es alta, apreciando gran aglomeración entre ellas, sobre todo en aquellas zonas donde se aprecian regiones cada vez más oscuras. Tanto en la escala de 100 nm, como en la de 200 nm, se visualiza la polidispersidad de tamaños y formas de las nanopartículas, siendo semiesféricas en su mayoría.

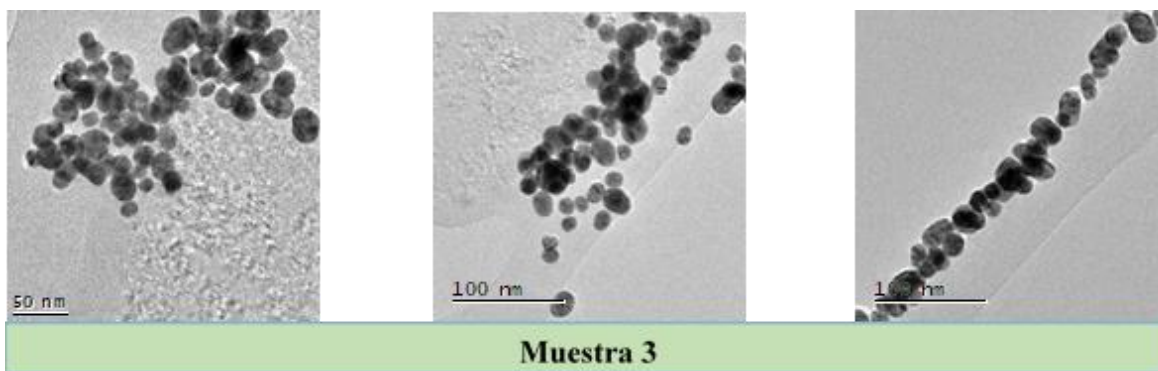


Figura 47. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra 3*) de la dispersión coloidal de nanopartículas de oro, sintetizada por el *método de Turkevich* en macroescala.

En la **Figura 47**, las micrografías corresponden a la *muestra 3*, cuya dilución es diez veces con respecto a la dispersión final obtenida, presentando una señal de resonancia de plasmón superficial también en $\lambda_{spr}= 523$ nm y una absorbancia igual a 0.403, es decir, esta muestra era menos concentrada en comparación con la anterior. Gracias a esto, se observa una menor aglomeración de las AuNPs, así como formas mejor definidas, sin embargo, la polidispersidad que hay en los tamaños de las nanopartículas de oro, fue uno de los retos a mejorar.

III.1.7. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas en macroescala por el método de Turkevich

Las imágenes adquiridas con el microscopio electrónico fueron analizadas usando el software Image J (sección II.7.4), tomando en cuenta un mínimo de 60 AuNPs para realizar un muestreo estadístico referente a la distribución de tamaños obteniendo la siguiente información:

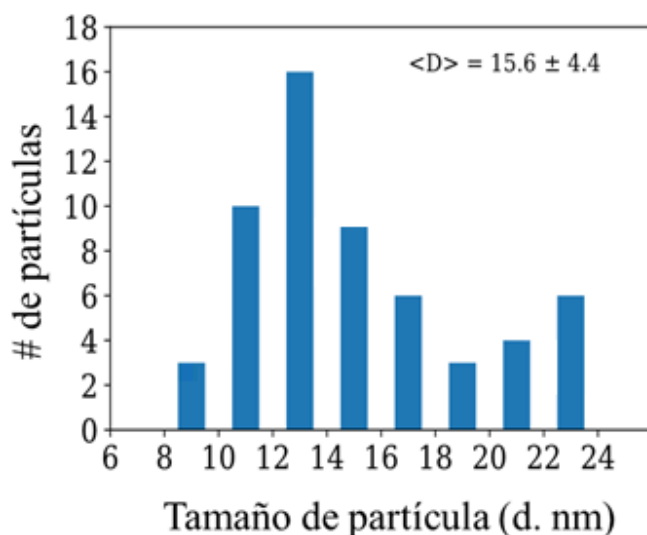


Figura 48. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs sintetizadas por el *método de Turkevich* en macroescala tomando una muestra representativa de 60 AuNPs de la *muestra 3*, con un diámetro promedio igual a 15.6 ± 4.4 nm.

El histograma de la **Figura 48** permitió visualizar con mayor claridad la dispersión de los tamaños de las nanopartículas de oro observando familias desde 9 nm hasta 23 nm. Las poblaciones de AuNPs con mayor frecuencia se encontraron entre 11 y 15 nm. Al calcular la media aritmética de todos los tamaños de partículas se obtuvo el diámetro promedio correspondiente a 15.6 ± 4.4 nm, obteniendo diámetros menores a los esperados (entre 21 y 23 nm), lo cual puede atribuirse al porcentaje de error presente en el modelo de estimación.

III.2. Síntesis de nanopartículas de oro en miliescala

III.2.1. Análisis cualitativo de las nanopartículas de oro sintetizadas en miliescala

Una vez que fueron determinadas las características de las nanopartículas, se realizó la síntesis de las AuNPs en miliescala a un volumen de 1 mL usando como referencia el método de Turkevich ya descrito, modificando tanto la **temperatura** como el **tiempo de reacción** (su evaluación fue relevante al momento de diseñar los experimentos dentro de los canales de microfluídica). En el primer caso, la síntesis, se llevó a cabo a diferentes temperaturas fijas entre 50 y 80 °C manejando un mismo tiempo de reacción (20 min) (**Figura 49**).



Figura 49. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas en miliescala a 4 diferentes temperaturas: a) 50 °C, b) 60 °C, c) 70 °C, d) 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min).

En los casos donde la reacción se mantuvo a 50 y 60 °C (**Figura 49-a y b**), las dispersiones coloidales presentaron tonos morados, mientras que la dispersión obtenida a 70 °C presenta un color púrpura oscuro, lo que podría indicar mayores tamaños de partícula. Al llevar la reacción a temperaturas mayores como lo fue 80 °C, las nanopartículas correspondientes a la dispersión color púrpura oscuro comienzan a precipitar, quedando el producto en las paredes del tubo Eppendorf ®. Las muestras fueron monitoreadas durante varios días, observando que la dispersión *b*, correspondiente a 60 °C fue más estable en comparación con las otras muestras, es decir, se visualizó menor cantidad de producto precipitado en el fondo del tubo.

Una vez obtenido el valor de temperatura óptimo (60 °C), se exploraron diferentes tiempos de reacción, entre 5 y 20 min, a esa temperatura. Cuando el tiempo de reacción fue menor (5 min), se observó un tono gris translúcido, lo que podría señalar que la reacción apenas comenzaba, indicando así que ese tiempo de reacción no da lugar a que se desarrolle de manera completa (**Figura 50**). Para los tiempos de 10, 15 y 20 min se observó el mismo color morado en el producto de la reacción.



Figura 50. Dispersiones coloidales de nanopartículas de oro sintetizadas en miliescala a 4 diferentes tiempos: e) 5 min, f) 10 min, g) 15 min, h) 20 min. Sintetizadas a una misma temperatura de reacción (60 °C).

Para corroborar lo visto de forma cualitativa, se realizaron análisis de las muestras tanto por espectroscopía de absorción electrónica en la región del UV-Vis como en el equipo dispersor dinámico de luz (DLS).

III.2.2. Espectros de absorción electrónica en la región visible para pruebas en miliescala a diferentes temperaturas

Para realizar el análisis de las muestras sintetizadas a diferentes temperaturas manejando un mismo tiempo de reacción, se hicieron diluciones a 0.1 y 0.01 respecto a su concentración relativa inicial en la mezcla de reacción. Cada medición fue hecha por triplicado, en un intervalo de longitud de onda desde 350 hasta 650 nm (**Figura 51**).

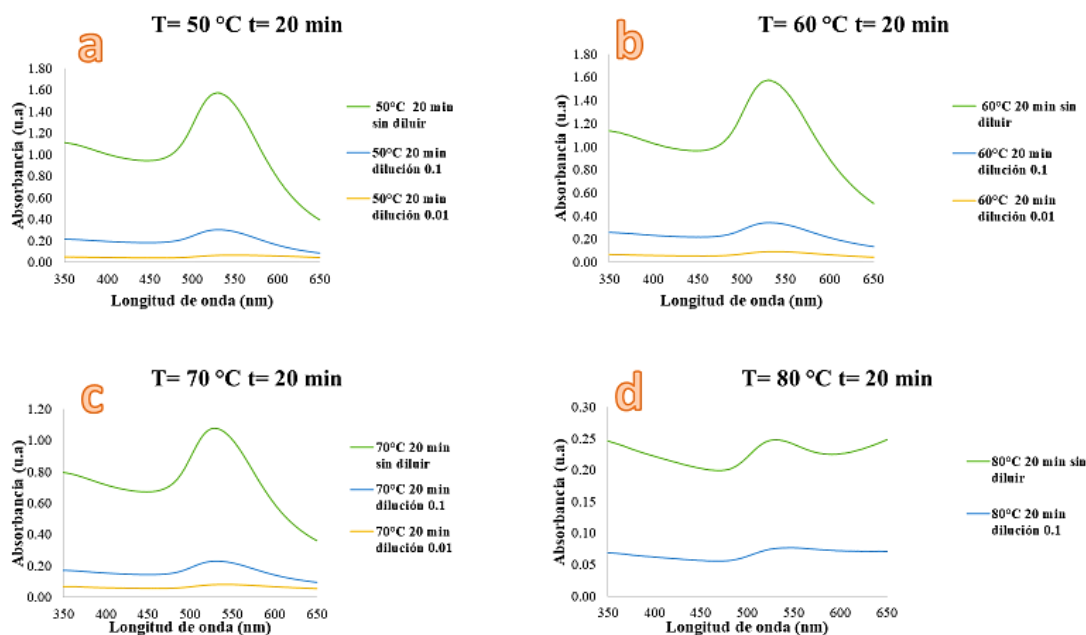


Figura 51. Espectros de absorción electrónica en la región visible de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes temperaturas: a) 50 °C, b) 60 °C, c) 70 °C, d) 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min), analizadas a diferentes diluciones.

Como se muestra en la **Figura 51**, no existe variación significativa en el desplazamiento de la longitud de onda máxima, entre cada una de las diferentes muestras sintetizadas a diferentes temperaturas. En el caso de las dispersiones coloidales *a* y *b*, se encontraron valores de longitud de onda máxima de entre 530 y 531 nm, respectivamente, mientras que, en *c* y *d*, la longitud de onda máxima se encuentra entre 528 y 527 nm. En todos los casos, la longitud de onda máxima de las muestras diluidas diez veces fue igual al de las muestras sin diluir. El espectro de absorción de la muestra *d*, sintetizada a 80 °C para un tiempo de reacción de 20 min presenta una señal en 527 nm, unas 6.5 veces menor en la intensidad de absorbancia que la reacción llevada a cabo a 60 °C, así como el aumento de absorbancias mayores a 540 nm que podrían indicar la presencia de AuNPs de mayor tamaño. Esto es consistente con la sedimentación de las nanopartículas en las paredes del tubo que las contenía casi de forma inmediata, conforme transcurría el tiempo de reacción. La magnitud de la absorbancia en la λ_{SPR} así como a 450 nm, indican que la muestra con mayor rendimiento (concentración de nanopartículas) corresponden a la reacción efectuada a 60 °C.

III.2.3. Espectros de absorción electrónica en la región visible para pruebas en miliescala a diferentes tiempos de reacción

Posteriormente, se determinaron los espectros de absorción para los experimentos realizados a una temperatura de 60 °C, variando el tiempo de reacción en un intervalo desde 5 hasta 20 min. Cada medición se hizo por triplicado, en un intervalo de longitud de onda desde 350 hasta 650 nm.

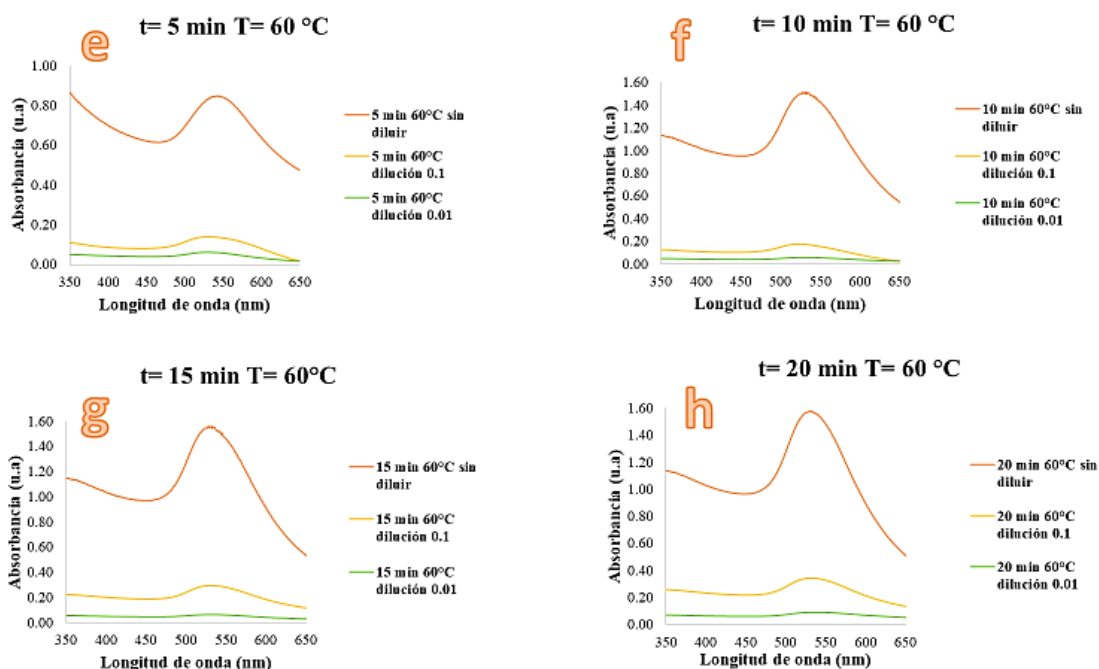


Figura 52. Espectros de absorción electrónica en la región visible de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción: a) 5 min, b) 10 min, c) 15 min, d) 60 min para una misma temperatura (60 °C), analizadas a diferentes diluciones.

Los espectros de absorción de las dispersiones coloidales sin diluir presentan el mismo valor de $\lambda_{\text{spr}}=531$ nm excepto en el caso de la *muestra e* (5 min), donde su desplazamiento fue de $\lambda_{\text{spr}}=542$ nm (**Figura 52-línea naranja**). Este último resultado y el color gris translúcido de la dispersión, podrían sugerir la presencia de nanopartículas de mayor tamaño, ya que conforme el tamaño de partícula es más grande, la longitud de onda del plasmón de resonancia superficial (λ_{spr}) se desplaza hacia la derecha del espectro electromagnético. La luz roja es absorbida y la luz azul reflejada, obteniendo dispersiones de diferentes tonalidades, desde azul pálido hasta moradas. Conforme el tamaño de partícula continúa creciendo hasta llegar casi al límite con el tamaño de una partícula de oro en bulto, la señal del SPR se desplaza hacia la porción del infrarrojo y longitudes de onda más visibles son reflejadas, dando nanopartículas incoloras o de color translúcidas¹¹. Sin embargo, esto no es consistente con un tiempo de reacción corto (5 min) como lo fue en la *muestra e*, donde de acuerdo con el grupo de investigación de Wuithschick y colaboradores¹⁵, se demostró que al inicio de la reacción de Turkevich algunas especies intermediarias de oro tienen esta tonalidad gris, y son partículas con diámetros muy pequeños de alrededor de 1.5 nm de diámetro, por lo que en nuestro caso podría ser debido a una reacción incompleta para ese tiempo de reacción.

Al llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas de oro a una temperatura de 60 °C, los valores de absorbancia de las *muestras g* y *h* (tiempos de reacción de 15 y 20 min) sin diluir fueron los mayores (1.55 y 1.57, respectivamente). Sin embargo, en todos los casos, al diluir en agua las dispersiones diez y cien veces se observó una disminución proporcionalmente mayor de la absorbancia, así como desplazamientos de hasta ± 3 nm en las *muestras f*, *g* y *h*. En el caso de la *muestra e*, su λ_{spr} se desplazó hacia la izquierda a 533 nm al diluir diez veces la muestra y 524 nm al diluirla cien veces. Esto sugiere que, en la síntesis de dispersiones coloidales de oro a esta escala (1.0 mL) pueden ocurrir fenómenos de agregación o separación, que no se observaron al menos en un lapso razonable (1 semana) en el método tradicional en macroescala (100 mL).

III.2.4. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en miliescala a diferentes temperaturas utilizando DLS

Al igual que las nanopartículas de oro sintetizadas por el *método de Turkevich en macroescala*, se caracterizaron las dispersiones coloidales *a, b, c, d, e, f, g* y *h*. Se utilizó un equipo dispersor dinámico de luz (DLS) para analizar por triplicado las muestras sintetizadas a diferentes temperaturas, tomando un mismo tiempo de reacción, como se muestra enseguida.

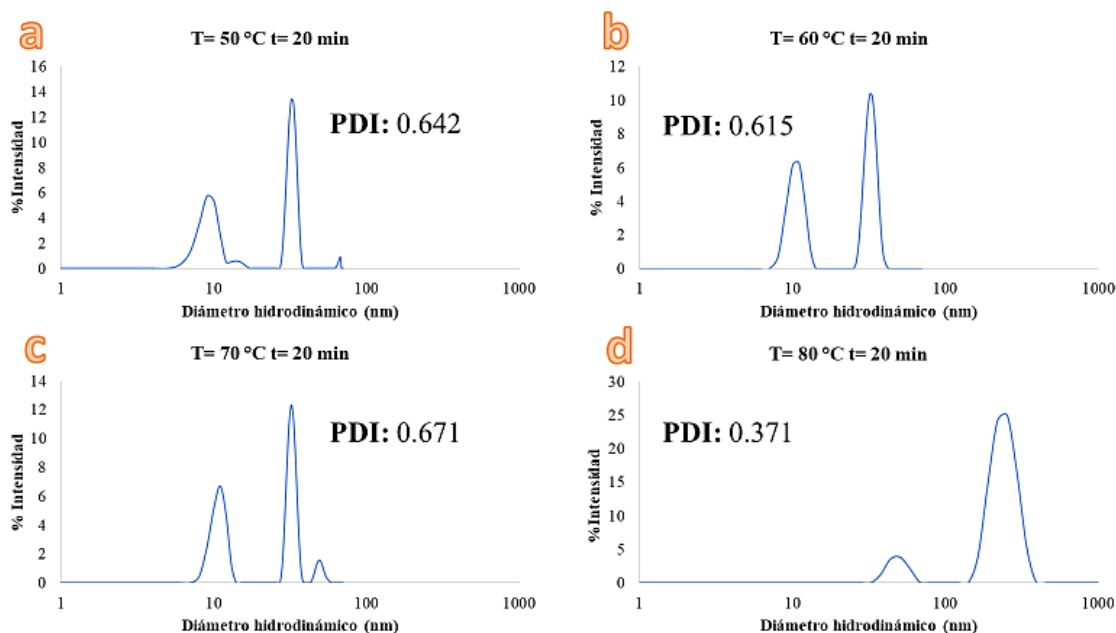


Figura 53. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes temperaturas: **a)** 50 °C **b)** 60 °C **c)** 70 °C **d)** 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS).

Las distribuciones de la intensidad del tamaño de partícula (**Figura 53**) indican la existencia de diferentes familias de nanopartículas de oro en todos los casos. Las muestras *b* y *d* indican dos familias de nanopartículas, para *b*, la primera familia de izquierda a derecha tiene un diámetro hidrodinámico promedio de 11 ± 4 nm y la segunda familia abarca diámetros desde 25 hasta 44 nm. Para *d*, la primera población presenta valores de diámetros hidrodinámicos (ϕ) desde 32 hasta 80 nm, en cuanto a la segunda población, esta abarca diámetros en un intervalo entre 142 y 396 nm. A pesar de que el valor de PDI fue menor para esta muestra, los tamaños de diámetro hidrodinámico son muy grandes. Esto concuerda con el resultado cualitativo correspondiente al experimento *d*, donde a pesar de manejar una temperatura más alta (80 °C), visualmente se observó precipitado en las paredes del tubo que contiene la dispersión. Lo anterior también es consistente con los datos de absorbancia, en donde se encontró un aumento de absorbancia a longitudes de onda mayores, correspondientes a tamaños más grandes de partículas.

En el caso de las muestras *a* y *c*, sintetizadas a dos diferentes temperaturas (50 °C y 70 °C, respectivamente), se observan más de dos poblaciones, todas menores a 100 nm. Sin embargo, sus índices de polidispersidad presentaron los valores más altos, lo que podría deberse a una de las limitaciones del DLS, donde se ha demostrado que la técnica no es la más recomendable para analizar muestras heterogéneas o muy polidispersas compuestas por nanopartículas de diferentes tamaños ⁶².

III.2.5. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en miliescala a diferentes tiempos de reacción utilizando DLS

De acuerdo con el análisis anterior, se estableció 60 °C como la temperatura de reacción a la que serían efectuadas las pruebas a diferentes tiempos, observando lo siguiente:

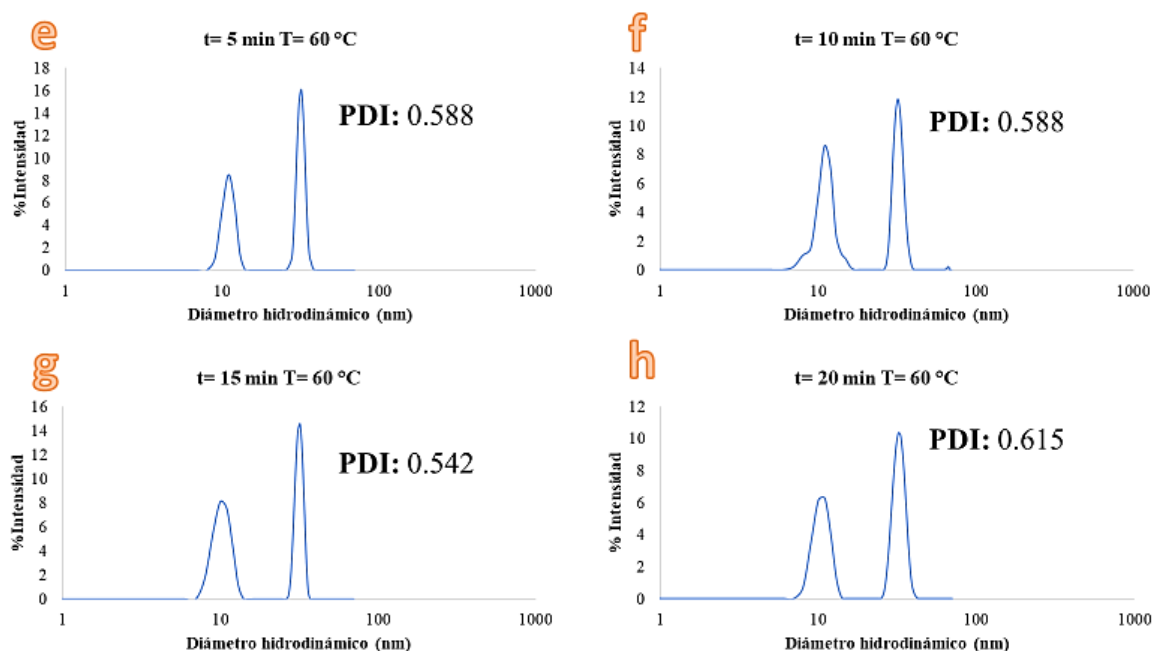


Figura 54. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) de AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción: **e)** 5 min **f)** 10 min **g)** 15 min **h)** 20 min a una misma temperatura (60 °C) analizadas en un equipo dispersor dinámico de luz (DLS).

Las distribuciones de la intensidad del tamaño de partícula (**Figura 54**) indican la existencia de dos principales poblaciones de AuNPs. Sin embargo, en este caso, se logró disminuir la polidispersidad de las dispersiones coloidales, en comparación con los experimentos anteriores. Al analizar las muestras *e*, *g* y *h*, con tiempos de reacción de 5, 15 y 20 min de reacción, respectivamente, se observa una gran similitud entre las familias de nanopartículas presentes. Por ejemplo, para la *muestra e*, la primera familia de izquierda a derecha, tiene un diámetro hidrodinámico promedio de 11 ± 4 nm, mientras que la segunda familia abarca diámetros desde 25 hasta 40 nm, mientras que para la *muestra h*, la primera familia también presenta un diámetro hidrodinámico promedio de 11 ± 4 nm pero la segunda familia es ligeramente más polidispersa y abarca diámetros desde 25 hasta 44 nm, por lo que su valor de PDI: 0.615 es mayor en comparación de la muestra *e*.

En cuanto a la *muestra g*, la primera población tiene un diámetro hidrodinámico promedio de 11 ± 4 nm y su segunda población con un tamaño promedio de 31 ± 7 nm. Cabe resaltar que el valor de PDI de la *muestra g*, fue el menor de las cuatro muestras sintetizadas a una temperatura de 60 °C. Al compararlo con los resultados cualitativos, las *muestras g* y *h* parecieran tener la misma tonalidad e incluso valores muy similares de absorbancia, no obstante, hubo una disminución de la polidispersidad al mantener el tiempo de reacción a 15 min en lugar de 20 min.

Por otra parte, la *muestra f*, donde el tiempo de reacción fue de 10 min, presentó más de dos señales, en diferentes grados de intensidad, con diámetros inferiores a 100 nm, y a pesar de que su índice de polidispersidad promedio fue el mismo que el de la *muestra e*, se observó que la distribución de tamaños fue menos homogénea.

Al comparar los resultados obtenidos para *e* y *f* con los análisis cualitativos previamente obtenidos, se tenía la hipótesis de que en la *muestra e*, los diámetros hidrodinámicos serían mayores debido a la coloración de la dispersión, y que la *muestra f*, sería muy similar a lo obtenido en tamaños para *g* y *h*, por lo que posteriormente para corroborar o descartar estas condiciones experimentales, se realizaron pruebas usando estos tiempos de reacción (5 y 10 min), sobre todo al momento de optimizar tiempos de reacción dentro del microchip de microfluídica.

Gracias a los resultados obtenidos se pudieron establecer las condiciones de trabajo adecuadas para los diseños experimentales en los microchips de microfluídica, no sin antes analizar una de las muestras usando microscopía electrónica de transmisión (TEM).

III.2.6. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas en miliescala a diferentes tiempos de reacción

Se analizó una de las dispersiones de AuNPs sintetizadas en miliescala a un volumen de 1 mL, tomando la *muestra d*, donde la síntesis se llevó a cabo a 80 °C para un mismo tiempo de reacción (20 min). La muestra se diluyó a la mitad de su concentración original, y se observó lo siguiente (**Figura 55**).

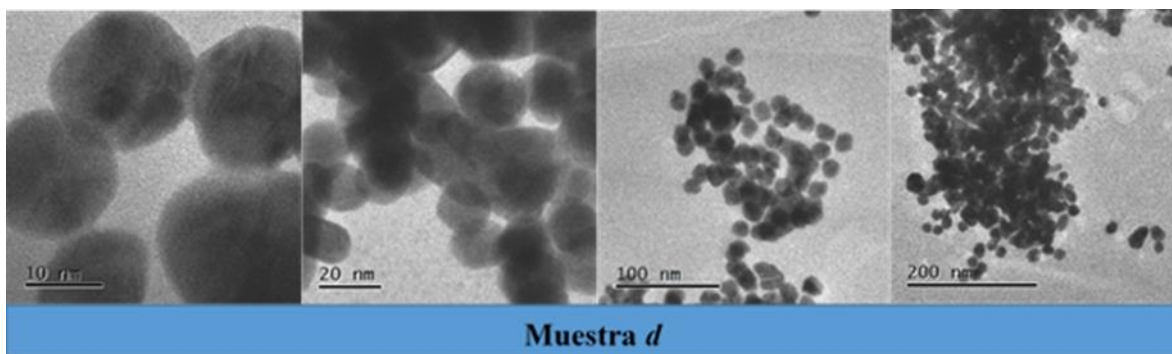


Figura 55. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra diluida (*muestra d*) de una dispersión coloidal de AuNPs, sintetizadas en miliescala a 80 °C y 20 min de reacción.

Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la muestra *d*, señalan la presencia de nanopartículas esféricas y homogéneas, algunas muy pequeñas incluso de 10 nm de diámetro y otras en su mayoría, alrededor de 20 nm. En la micrografía cuya escala corresponde a 200 nm, se observó aglomeración de las nanopartículas.

Los resultados aquí mostrados contrastan con las caracterizaciones hechas en DLS donde se encontró una segunda población de nanopartículas con diámetros mucho más grandes entre 142 y 396 nm, con un PDI relativamente bajo (PDI: 0.371). Lo anterior puede ser explicado considerando que la dispersión de la luz en realidad mide los tamaños hidrodinámicos de las partículas, lo que incluye no solo la partícula en sí, sino las capas iónicas y de disolvente asociadas a ella en dispersión. Además, la técnica DLS al ser una medida dinámica, es capaz de detectar los cambios referentes al comportamiento de las nanopartículas en dispersión asociados a su dispersión / agregación. En contraste con TEM, donde la señales que recibe el equipo proviene del núcleo metálico de las nanopartículas, ignorando cualquier capa de recubrimiento orgánico. Otra explicación consistente con las diversas observaciones, es que las nanopartículas de oro de mayor tamaño detectadas por DLS comenzaron a precipitar al paso de los días hasta quedar adheridas en las paredes del tubo Eppendorf® que las contenía. Además, cuando se efectuó el análisis con el microscopio electrónico de transmisión, solo lograron extraerse del líquido aquellas nanopartículas de menor tamaño.

III.3. Método de flujo continuo en una sola fase

Con los resultados obtenidos en los experimentos en macroescala (100 mL) y miliescala (1.0 mL), se diseñaron pruebas preliminares con colorantes para evaluar el funcionamiento de los microchips de microfluídica a distintas temperaturas y con distintos tiempos de residencia de los reactivos.

III.3.1. Análisis cualitativo de experimentos con el microchip de microfluídica (Dispositivo A1)

Se utilizaron las cuatro entradas del microchip, en dos de ellas se introdujo colorante azul, y en las dos restantes se inyectó colorante amarillo (**Figura 56**). Se programaron las bombas para trabajar a dos diferentes flujos, primero a un flujo total de total de 172.34 $\mu\text{L/h}$ y un tiempo de residencia de 10 min dentro de los microcanales de microfluídica. En segundo lugar, un flujo total de 344.82 $\mu\text{L/h}$ y un tiempo de residencia de 5 min. El calentamiento del dispositivo se hizo colocándolo directamente sobre una parrilla de calentamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resumen de resultados correspondientes a dos pruebas experimentales realizadas dentro de un microchip de microfluídica usando colorantes (azul y amarillo) introducidos a dos diferentes flujos y tiempos de residencia aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 °C a 100 °C, usando el *método de flujo continuo en una sola fase*.

Flujo Total 1	Tiempo de residencia	Temp.	Observaciones	Flujo Total 2	Tiempo de residencia	Temp.	Observaciones
($\mu\text{L/hr}$)	min.	°C		($\mu\text{L/hr}$)	min.	°C	
344.82	5	25	<input checked="" type="checkbox"/>	172.34	10	25	<input checked="" type="checkbox"/>
		45	<input checked="" type="checkbox"/>			45	<input checked="" type="checkbox"/>
		50	<input checked="" type="checkbox"/>			50	<input checked="" type="checkbox"/>
		60	<input checked="" type="checkbox"/>			60	<input checked="" type="checkbox"/>
		70	<input checked="" type="checkbox"/>			70	<input checked="" type="checkbox"/>
		80	<input checked="" type="checkbox"/>			80	<input checked="" type="checkbox"/>
		90	<input checked="" type="checkbox"/>			90	<input checked="" type="checkbox"/>
		100	<input checked="" type="checkbox"/>			100	<input checked="" type="checkbox"/>

Donde:

El microchip de microfluídica trabaja de forma adecuada, no se presentan fugas y se observa flujo continuo en una sola fase.

✓ Algunos problemas se presentan dentro de los microcanales. Comienzan a introducirse burbujas de aire o vapor de agua provocando fluctuaciones notables en el flujo.

El microchip ya no trabaja de forma adecuada, se presentan fugas dentro de los microcanales, comienza a evaporarse significativamente el disolvente.

Acorde con la información resumida en la **Tabla 8** no se observaron diferencias significativas al cambiar los flujos y, por ende, los tiempos de residencia dentro de los microcanales. Sin embargo, si se pudieron visualizar cambios importantes en función de la temperatura.

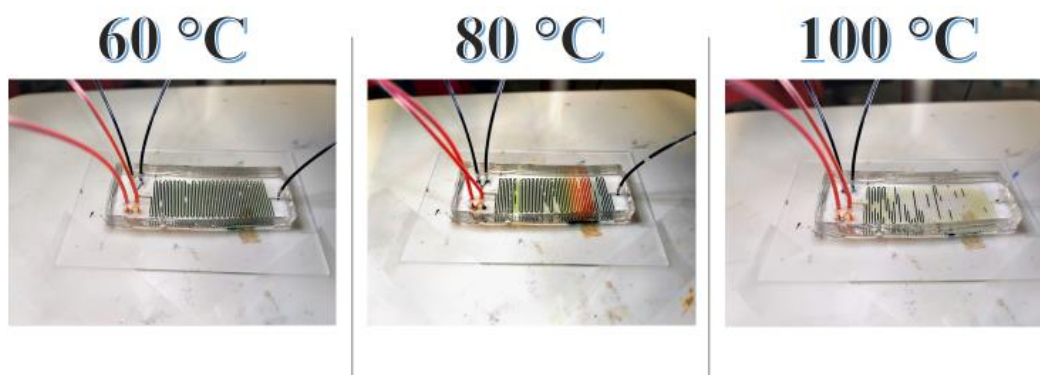


Figura 56. Pruebas experimentales con el **Dispositivo A1**, introduciendo colorantes dentro de un microchip de microfluídica. En esta prueba se introdujo un flujo total de $172.34 \mu\text{L/h}$ para un tiempo de 10 min de residencia dentro de los microcanales, sometiendo a calentamiento directo el dispositivo de microfluídica.

Como se puede ver en la **Figura 56**, se presentan cambios en los flujos al aplicar calor en los dispositivos de microfluídica. Al llegar a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ el chip continúa trabajando de forma adecuada. A partir de los $80 \text{ }^\circ\text{C}$ las fluctuaciones son significativas y esto puede ser debido al aumento de la temperatura y presión dentro de los microcanales. Cuando se llega a los $100 \text{ }^\circ\text{C}$ el disolvente se evapora rápidamente.

Estas pruebas permitieron delimitar con mayor certeza el intervalo de temperaturas adecuado para trabajar con los microchips de microfluídica, por lo que la siguiente etapa consistió en ejecutar los experimentos con los reactivos correspondientes para efectuar la síntesis de las nanopartículas de oro dentro de los microcanales.

III.3.2. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo en una sola fase (Dispositivo A1)

Para realizar estos experimentos, dos de las cuatro entradas del microchip contenían la disolución precursora de oro 1.08 mM , mientras las dos entradas restantes tenían la disolución reductora de citrato de sodio 3.4 mM , manteniendo una relación de flujo 1:1 a la entrada del microchip. Al igual que las pruebas con colorantes, se programaron las bombas para trabajar a dos diferentes flujos ($344.82 \mu\text{L/h}$ y $172.34 \mu\text{L/h}$) correspondientes a dos tiempos de residencia (5 y 10 min, respectivamente). El **Dispositivo A1** de microfluídica se sometió a calentamiento directo sobre una parrilla en un intervalo desde $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $80 \text{ }^\circ\text{C}$, lo que se observó se resume en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados cualitativos correspondientes a la síntesis de AuNPs fabricadas en el interior del **Dispositivo A1** usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos (344.82 $\mu\text{L/h}$ y 172.34 $\mu\text{L/h}$) y tiempos de residencia (5 y 10 min) aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo en un intervalo de 25 a 80 $^{\circ}\text{C}$.

Flujo Total 1	Tiempo de residencia	Temp.	Observaciones	Coloración del líquido a la salida del microchip	Flujo Total 2	Tiempo de residencia	Temp.	Observaciones	Coloración del líquido a la salida del microchip
($\mu\text{L/hr}$)	min.	$^{\circ}\text{C}$			($\mu\text{L/hr}$)	min.	$^{\circ}\text{C}$		
344.82	5	25	☑ Sin fugas, sin cambios de coloración, posible adsorción en los canales de PDMS	Incoloro	172.34	10	25	☑ Sin fugas, sin cambios de coloración, posible adsorción en los canales de PDMS	Incoloro
		45					45		
		50					50		
		60	◇ Cambios más rápidos, coloración más homogénea	Morado pálido			60	◇ Cambios más rápidos, coloración más homogénea	Rosa pálido
		70	✓ Sin fugas, ya hay coloración a la salida del microchip				70	✓ Sin fugas, ya hay coloración a la salida del microchip	
		80	☑ Fugas en el microchip, evaporación del disolvente, disolución incolora a la salida				80	☑ Fugas en el microchip, evaporación del disolvente, disolución incolora a la salida	

Donde:

☑ De forma cualitativa, al utilizar el dispositivo de microfluídica en un intervalo de temperaturas desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 50 $^{\circ}\text{C}$, éste trabajó de forma adecuada, los reactivos se difundieron a través de los microcanales hasta mezclarse, sin embargo, no se apreciaron cambios de coloración en el líquido a la salida del microchip. Por el contrario, después de 20 min de estar funcionando el dispositivo, se notó una coloración oscura dentro de los microcanales (**Figuras 57-A y B**) lo que sugiere que la reducción del oro se está efectuando dentro de los mismos pero los productos se adsorben en los canales de PDMS.

◇ A partir de 60 $^{\circ}\text{C}$, comenzaron a percibirse cambios más notorios y rápidos como una coloración más homogénea dentro de los microcanales, siendo más evidente del lado donde se introdujo la disolución precursora de oro (**Figura 57-C**). Sin embargo, el líquido a la salida del microchip aún permanecía incoloro.

✓ Al elevar la temperatura a 70 $^{\circ}\text{C}$, ya se observó color en el líquido que salía del microchip. Al colectarlo en un tubo Eppendorf®, se pudo visualizar una dispersión morada pálido para el caso donde el flujo fue igual a 344.82 $\mu\text{L/h}$ (**Figura 57-D**) y rosa pálido cuando se manejó un flujo de 172.34 $\mu\text{L/h}$.

☒ Al llegar a 80 °C y habiendo transcurrido 60 min de funcionamiento del microchip, se presentaron problemas como fugas, evaporación del disolvente, y de nueva cuenta comenzaba a verse una disolución incolora a la salida del microchip. Además, los microcanales comenzaron a cambiar a color dorado como se muestra en las **Figuras 57-E y 57-F**, lo que sugiere que grandes cantidades de nanopartículas se estaban depositando y aglomerando, sobrepasando las dimensiones características de un nanomaterial.

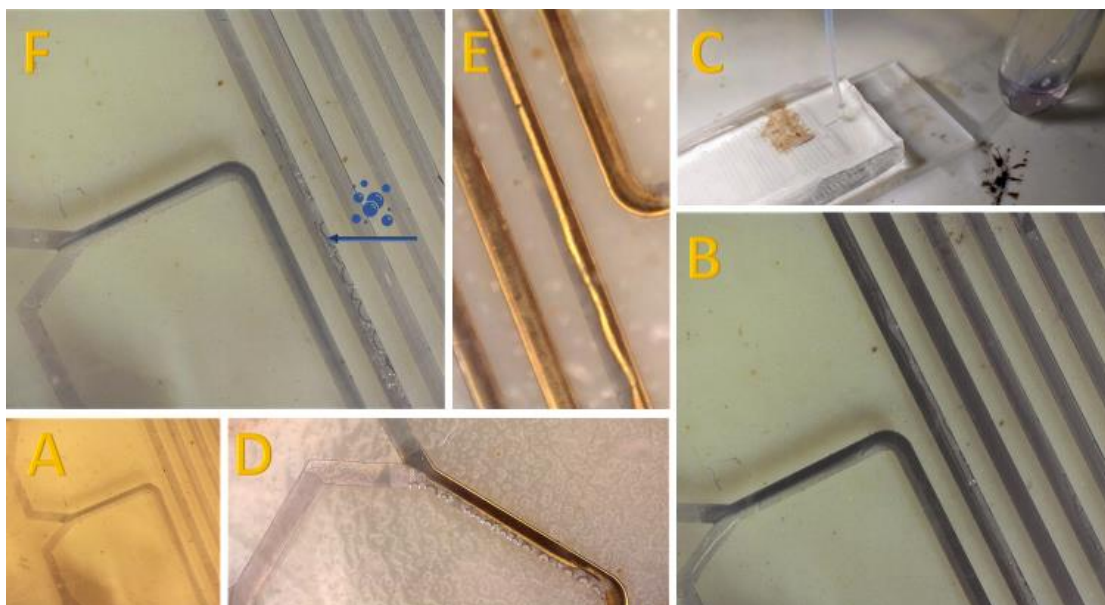


Figura 57. Síntesis de AuNPs por el *método de flujo continuo en una sola fase*, llevada a cabo dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) manejando un flujo total de 344.82 $\mu\text{L/h}$ para un tiempo de 5 min de residencia dentro de los microcanales. **A)** Cuando la temperatura se encuentra entre los 25 – 50 °C, los microcanales de PDMS, que son originalmente transparentes, comienzan a tomar una coloración oscura después del paso constante de los reactivos (20 min). **B)** A partir de los 60 °C, conforme transcurre el tiempo (20 min aproximadamente) en el cual los reactivos continúan difundiendo dentro del microchip, la coloración de los microcanales se hace más evidente, sobre todo del lado donde se introduce la disolución precursora de oro. **C)** A una temperatura de 70 °C, el fluido a la salida del microchip se colectó y se observó una dispersión morada pálida. **D)** y **E)** Cuando la temperatura es de 80 °C, después de estar funcionando el microchip 60 min se empezó a observar la presencia de grandes depósitos de Au^0 en los microcanales de microfluídica. **F)** Al elevar la temperatura (80 °C) el disolvente comienza a evaporarse, apreciándose la formación de burbujas.

Se ha reportado el depósito y agregación de las nanopartículas en las paredes de los microcanales, sobre todo cuando se sintetizan dispersiones coloidales usando el *método de flujo continuo en una sola fase* dentro de los microchips de PDMS, esto gracias a la activación de la superficie del polímero con plasma y su afinidad con las nanopartículas de oro ⁶³. Dependiendo de la aplicación que se esté buscando, esto puede o no ser una ventaja durante el proceso. Algunos autores, han aplicado la integración de nanopartículas de oro en los dispositivos de microfluídica para aplicaciones como biosensores ⁴⁹, mientras que, en otros casos, esto puede ser algo indeseado por lo que se ha propuesto la fabricación de los microchips con otros materiales diferentes al PDMS, así como el uso de aditivos poliméricos y la aplicación de otras técnicas ⁶⁴.

Las dispersiones recolectadas que se muestran en la **Figura 58** fueron analizadas en el espectrofotómetro de absorción electrónica en la región UV-Vis y caracterizadas por DLS para su comparación, como se explicará enseguida.

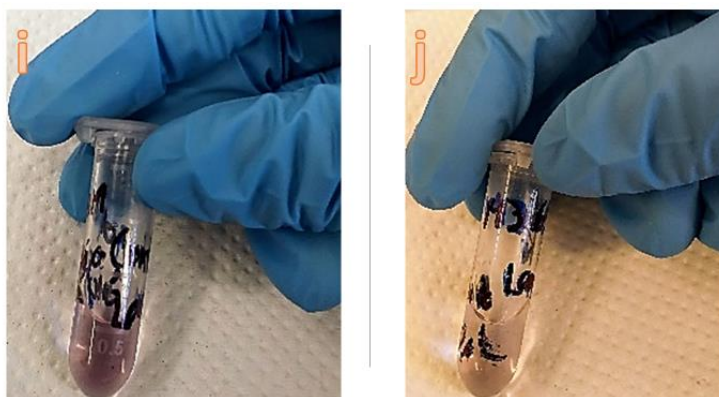


Figura 58. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **i)** 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min, **j)** 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

III.3.3. Espectros de absorción electrónica en la región visible de las AuNPs obtenidas por el método de flujo continuo en una sola fase (**Dispositivo A1**)

Las gráficas que se muestran a continuación (**Figura 59**), representan el promedio de las muestras *i* y *j* analizadas por triplicado, sintetizadas por el *método de flujo continuo en una sola fase* dentro del **Dispositivo A1**, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia.

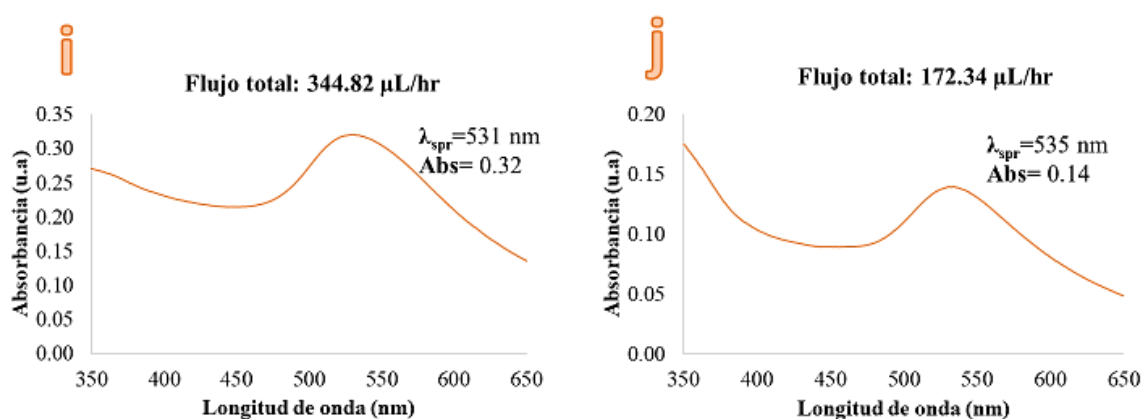


Figura 59. Espectros de absorción electrónica en la región visible correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**), usando el *método de flujo continuo en una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **i)** 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min y **j)** 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

Los espectros de absorción electrónica en la región visible de las dispersiones coloidales sin diluir (**Figura 59**) presentan diferentes valores de λ_{spr} , así como diferentes valores de absorbancia. En el caso de la *muestra i*, correspondiente a la dispersión morada, su valor de $\lambda_{spr}=531$ nm coincide con el valor de λ_{spr} encontrado en las pruebas realizadas en miliescala a 1 mL, usando una temperatura de 60 °C y diferentes tiempos de reacción (*f*, *g* y *h*), sin embargo, el valor de absorbancia disminuye cinco veces.

En cuanto a la *muestra j* (flujo total igual a 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min), su valor de $\lambda_{spr}=535$ nm, se observó ligeramente más desplazado hacia la derecha en la región visible del espectro, lo que sugiere que estas nanopartículas son de mayor tamaño que aquellas obtenidas a flujos más altos (ver **Figura 42**). La absorbancia en esta longitud de onda fue igual a 0.14, es decir 2.3 veces más baja en comparación con la *muestra i*.

La disminución en los valores de absorbancia, determinados en las muestras *i* y *j*, en comparación con los obtenidos a macro o miliescala, son un indicativo de una menor concentración de nanopartículas de oro contenidas en estas dispersiones, lo cual es muy probable que sea una consecuencia de la deposición de Au^0 en las paredes de PDMS del microchip.

III.3.4. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo A1 utilizando DLS

Para complementar lo observado de forma cualitativa, y en el espectro de absorción electrónica en la región visible, se realizó un análisis por triplicado de las muestras *i* y *j* en el equipo DLS, obteniendo la siguiente información.

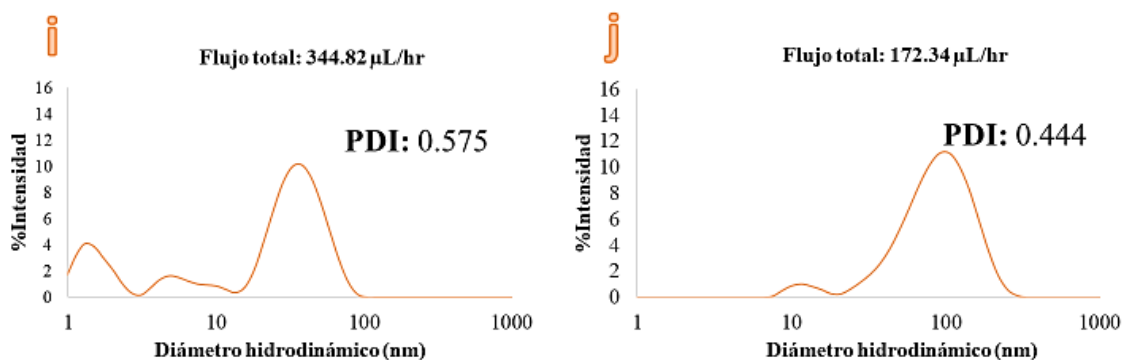


Figura 60. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase*. **i**) 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min **j**) 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min aplicando calentamiento directo sobre el dispositivo a 70 °C.

Las distribuciones de la intensidad en función del tamaño de partícula para las muestras *i* y *j* trabajando a dos diferentes flujos (**Figura 60**) indican, en ambos casos, la existencia de una familia principal de nanopartículas, además de la presencia de AuNPs de menores tamaños. Para el flujo total de 344.82 $\mu\text{L/h}$ y un tiempo de residencia de 5 min, la población principal abarcó diámetros desde 15 hasta 105 nm, con un ϕ promedio igual a 41.7 ± 15 nm junto con la presencia de dos pequeños hombros con diámetros menores a 15 nm, mientras que para el flujo de 172.34 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 10 min se observa una señal principal cuya distribución va desde 32 hasta 295 nm, con un diámetro hidrodinámico promedio igual a 105.8 ± 38 nm junto con un pequeño hombro con diámetros desde 9 hasta 31 nm.

Estos resultados son consistentes con los valores de λ_{spr} obtenidos para estas muestras, en los que se observó que a menor flujo (172.34 $\mu\text{L/h}$), la λ_{spr} de las AuNPs es mayor (535 nm) y por lo tanto las partículas son más grandes. En conjunto, los resultados de la síntesis con el **Dispositivo A1**, muestran que, a mayor tiempo de residencia en el microchip, es decir a menor flujo, las nanopartículas son de mayor tamaño, debido probablemente a que una mayor permanencia dentro del microchip aplicando calentamiento directo, favorece el crecimiento de las nanopartículas, tomando en cuenta que el área superficial donde se lleva a cabo la reacción es más extensa en el interior de los microcanales, además de que la transferencia de masa y de calor es mayor, en comparación con las síntesis efectuada en macro o miliescala.

III.3.5. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo A1

Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se refieren al análisis de la muestra *i*, sintetizada dentro del microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) utilizando un flujo total igual a 344.82 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 5 min, aplicando calentamiento directo en el dispositivo a 70 °C (**Figura 61**).

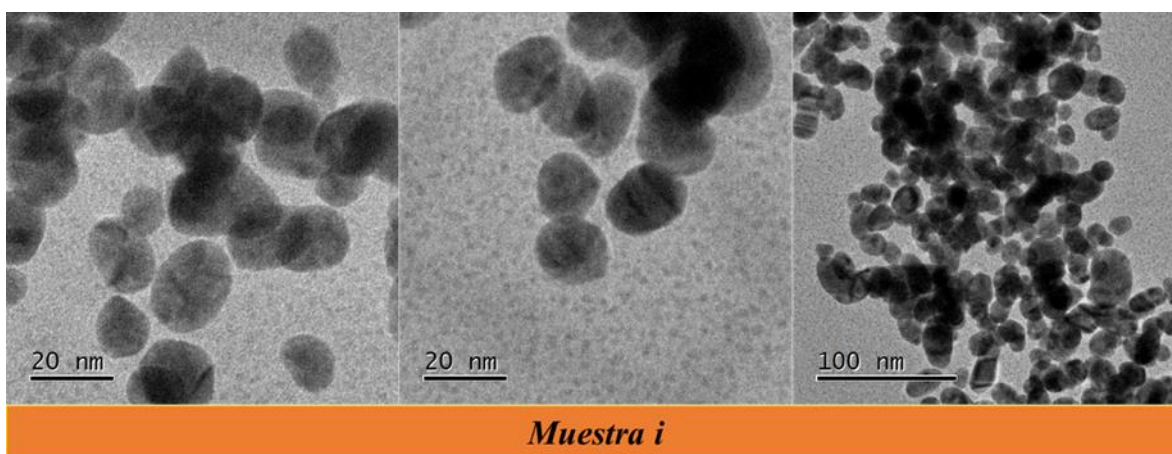


Figura 61. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una muestra (*muestra i*) de una dispersión coloidal de AuNPs dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo A1**) para un flujo total igual a 344.82 $\mu\text{L/h}$ y un tiempo de residencia de 5 min.

Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la *muestra i* (**Figura 61**) señalan la presencia de nanopartículas esféricas y algunas de ellas ovaladas, cuyos tamaños están alrededor de 20 nm, tal como se muestra en las dos primeras micrografías de izquierda a derecha, mientras que la tercer micrografía exhibe la aglomeración de las mismas.

Estos resultados contrastan con lo observado por DLS, donde se encontraron diámetros hidrodinámicos mucho mayores, lo cual podría ser explicado por dos principales razones: Una de ellas, es que el DLS es un equipo capaz de detectar la agregación dinámica de la muestra, por lo que mínimos cambios pueden alterar la distribución de tamaños. La segunda, es que en la muestra analizada por TEM las AuNPs de mayor tamaño hayan quedado en el tubo Eppendorf® que contenía la dispersión.

De acuerdo con la información recabada por todas las técnicas de caracterización para las muestras obtenidas utilizando el **Dispositivo A1**, se determinó que fue viable la síntesis de las AuNPs, obteniéndose nanopartículas de mayor tamaño cuando el tiempo de residencia en el dispositivo aumentó. A pesar de que los rendimientos de las reacciones, estimados con los valores de absorbancia, fueron bajos, sobretodo a flujos menores como en el caso de la *muestra j*, una de las razones principales pudo haber sido el depósito de las AuNPs en los canales de PDMS.

Esta deposición, ya ha sido estudiada por He Huang y colaboradores⁴⁶, quienes analizaron estos cambios de color en la superficie de los microcanales sugiriendo que, al inicio de la reacción, cuando se lleva a cabo la reducción parcial del Au³⁺, la coloración oscura en los canales evidencia los sitios de nucleación y la adsorción de los iones de oro alrededor de la pared de los canales, posiblemente causada por la atracción electrostática. Conforme la reacción avanza y disminuye la concentración de los iones de oro, el color oscuro cambia a rosa o morado, indicando la presencia de AuNPs cuya formación se ve favorecida a temperaturas más altas, éstas se quedarán adheridas de forma irreversible a la pared de PDMS, muy probablemente debido a fuerzas de Van der Waals.

Por estas razones, se formuló la hipótesis de aumentar el flujo dentro de los microcanales y de esta forma, disminuir los tamaños y polidispersidad de las nanopartículas de oro, buscando aumentar el rendimiento de la reacción. Para lograrlo, se propuso utilizar el **Dispositivo B1**, cuya longitud del serpentín fabricado en PDMS era menor. A la salida del microchip se colocó un tubo fabricado de un material diferente (politetrafluoroetileno, PTFE) sumergido en agua con calentamiento constante (90°C), tomando como referencia la temperatura de reacción aplicada en la síntesis de Turkevich.

III.3.6. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase (Dispositivo B1)

Los experimentos efectuados en el **Dispositivo B1**, se hicieron utilizando diferentes flujos totales, primero a 500 $\mu\text{L}/\text{h}$ y después a 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$, manteniendo la relación 1:1 respecto al flujo de las disoluciones de citrato:oro. Este dispositivo utiliza además el principio de enfoque hidrodinámico para el mezclado de los reactivos, el cual se lleva a cabo a temperatura ambiente (22 $^{\circ}\text{C}$). Después, el serpentín de PTFE, al final del microchip, calienta los reactivos a 90 $^{\circ}\text{C}$ y aumenta el tiempo de residencia a 30 min para el primer flujo y 15 min cuando se trabaja a 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$ (**Figura 62**).

Dispositivo B1

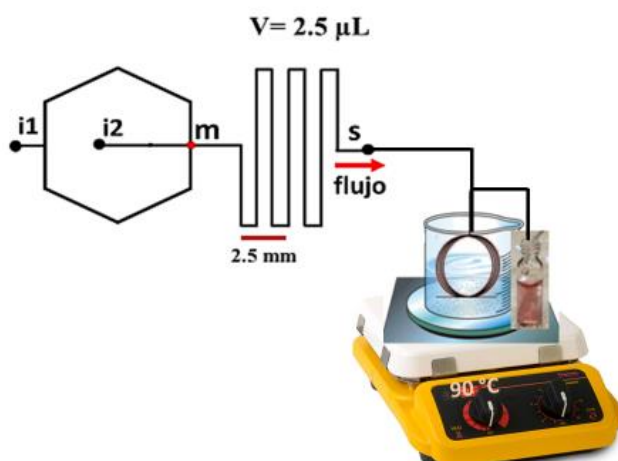


Figura 62. Plataforma microfluídica utilizando **Dispositivo B1**, para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase*. Entradas del microchip señaladas como (i1 e i2) y salida indicada como (s). Serpentín fabricado de PTFE sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

Visualmente, se pudieron apreciar diferencias significativas entre las dispersiones coloidales obtenidas a dos diferentes flujos (**Figura 63**). Por un lado, la muestra *k* (flujo total: 500 $\mu\text{L}/\text{h}$), exhibe un color morado, similar al de la *muestra i*, pero de aspecto turbio, lo que pudiera denotar tamaños mayores de nanopartículas. En cambio, al duplicar el flujo, se obtuvo la dispersión *l* (flujo total: 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$), la cual tiene un color rojo translúcido, característico de AuNPs con tamaños menores. Cabe resaltar que, tras un seguimiento de varios días (7 días), la muestra *k*, presenta la formación de precipitado en el fondo del tubo Eppendorf®, mientras que la muestra *l*, no lo presentó, al menos a simple vista.



Figura 63. Dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

III.3.7. Espectros de absorción electrónica en la región visible de las AuNPS obtenidas por el método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico en una sola fase (**Dispositivo B1**)

Posteriormente, se analizaron las muestras *k* y *l* por triplicado para conocer y comparar su respectivo espectro de absorción electrónica en la región visible, observando lo siguiente:

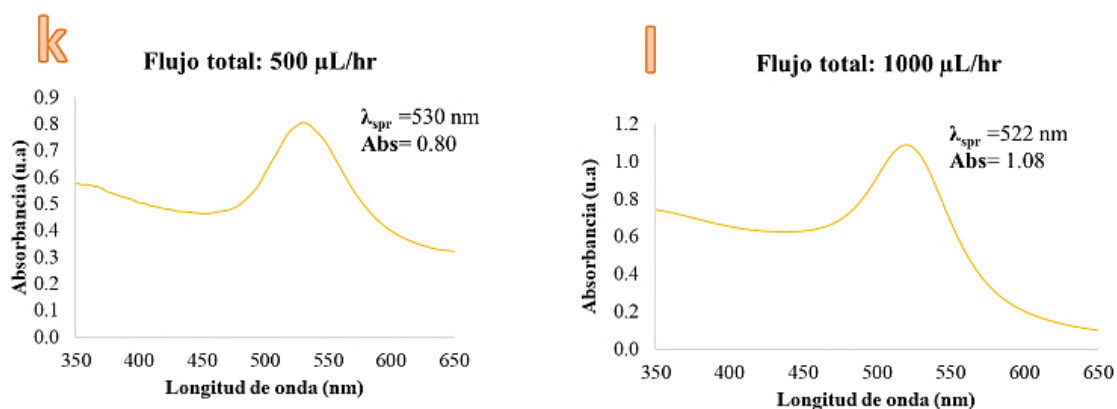


Figura 64. Espectros de absorción electrónica en la región visible correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

Los espectros de absorción de las muestras *k* y *l* presentan diferencias (**Figura 64**). En el caso de la muestra *k*, su valor de $\lambda_{\text{spr}}=530$ nm es casi el mismo valor de λ_{spr} obtenido para la dispersión *i*, lo cual coincidiría con sus resultados cualitativos, donde la coloración de estas dispersiones son similares entre sí. Al duplicar el flujo total hasta llegar a 1000 $\mu\text{L/h}$ (muestra *l*), la señal del pico de resonancia de plasmón superficial fue igual a 522 nm, este desplazamiento hacia la izquierda del espectro electromagnético en la región del visible implicaría una reducción del tamaño de las nanopartículas.

En ambos casos, el colocar el serpentín a la salida del microchip favorece el rendimiento de la reacción, dando un mayor tiempo de residencia a los reactivos, disminuyendo el depósito de las AuNPs en las paredes del serpentín de PTFE. Lo anterior, se puede ver reflejado en un aumento de la absorbancia: 0.80 para la muestra *k*, y 1.08 para la muestra *l*, en comparación con las muestras obtenidas con el **Dispositivo A1**, cuyas muestras *i* y *j*, presentaron valores de $A_{spr}=0.32$ y 0.14, respectivamente.

III.3.8. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo B1 utilizando DLS

Al realizar un análisis por triplicado de las muestras *k* y *l* en el equipo DLS, se obtuvo la siguiente información:

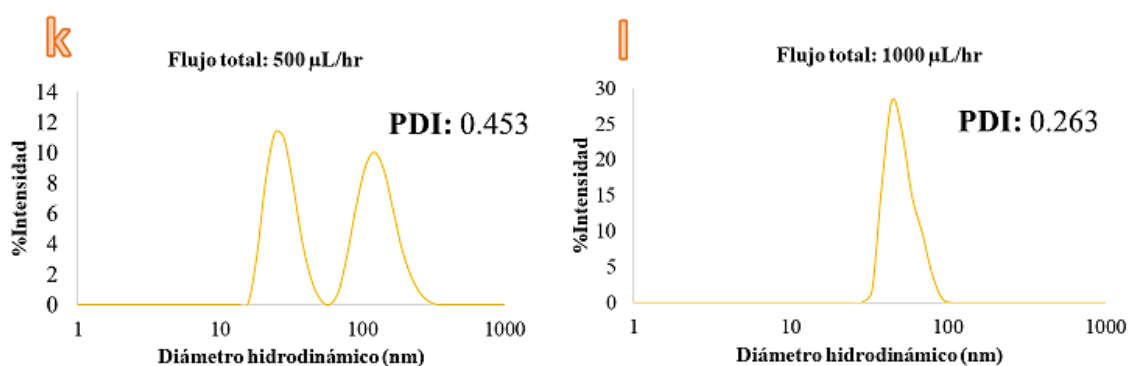


Figura 65. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a dispersiones coloidales de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a dos diferentes flujos y tiempos de residencia: **k**) 500 µL/h con un tiempo de residencia de 30 min, **l**) 1000 µL/h con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

La distribución de la intensidad del tamaño de partícula obtenido en la muestra *k*, señala la existencia de dos poblaciones de nanopartículas cuyas intensidades son similares entre sí. La primera población, presenta diámetros hidrodinámicos que se encuentran entre 16 y 60 nm, mientras que la segunda población tiene tamaños desde 61 hasta 342 nm. Además, el valor de PDI: 0.453 de esta muestra es menor en comparación con la dispersión *i* (PDI: 0.575), sintetizada esta última con un flujo total de 344.82 µL/h en el **Dispositivo A1**. Por otra parte, al duplicar el flujo (muestra *l*) se observó una sola familia de nanopartículas (monomodal), con diámetros hidrodinámicos en un intervalo de tamaños desde 30 hasta 106 nm cuyo valor de PDI fue igual a 0.263 (**Figura 65**). Esto significó una reducción considerable en la polidispersidad de las AuNPs.

III.3.9. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo B1

Las micrografías que se muestran en la **Figura 66** se refieren al análisis de la *muestra k* sin diluir de las AuNPs sintetizadas dentro del **Dispositivo B1**.

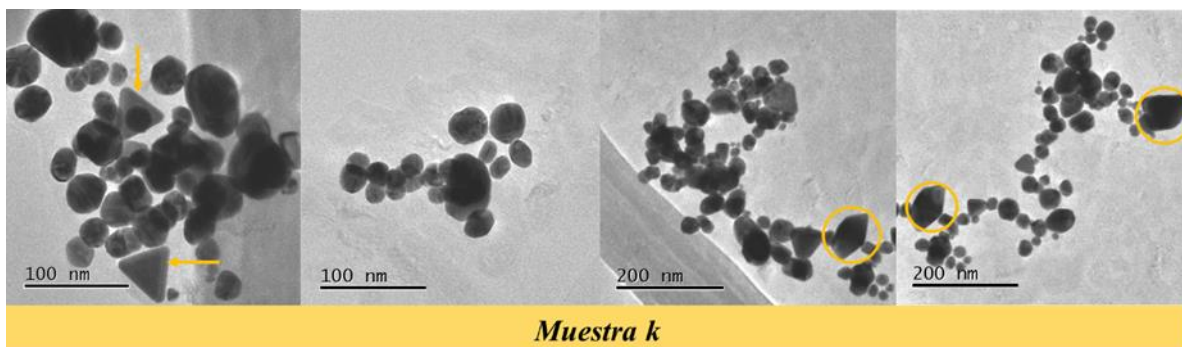


Figura 66. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra k*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a 500 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 30 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

En estas micrografías se observa que los tamaños de las nanopartículas de oro son diversos (entre 20 y 70 nm). Además, se presentan formas diferentes a las esféricas y/o semiesféricas como son aquellas partículas que se encuentran circuladas, e incluso se observaron formas triangulares (primera micrografía de izquierda a derecha). La aglomeración de estas nanopartículas sería consistente con los tamaños mayores observados por DLS, así como con la polidispersidad de las poblaciones señaladas. Aunque a simple vista no se observó la formación de precipitado, microscópicamente pudieron haberse aglomerado las nanopartículas, razón por la que existen diversos tamaños.

Las micrografías que corresponden a la *muestra l* (**Figura 67**) denotan una distribución de tamaños mucho más homogénea, formas esféricas mejor definidas, así como la disminución de la aglomeración de las nanopartículas. Incluso en la micrografía donde la escala corresponde a 200 nm, la aglomeración no es tan evidente en comparación con las dispersiones previamente sintetizadas.

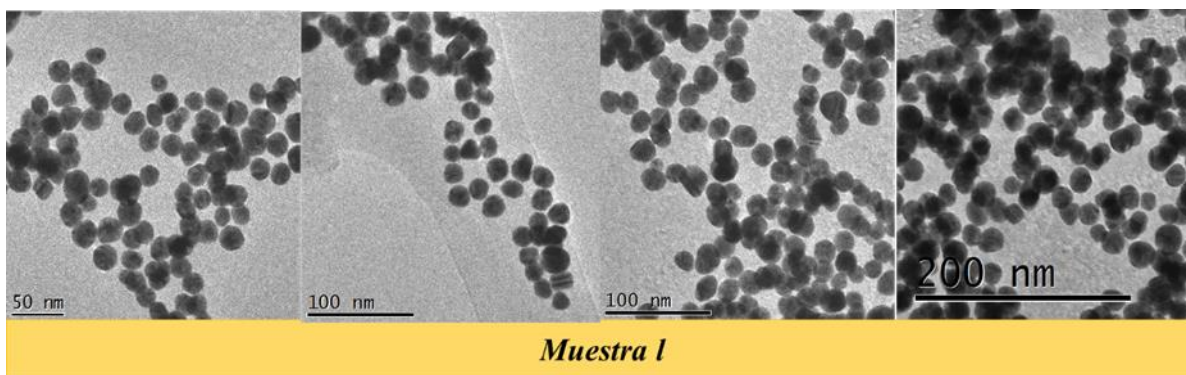


Figura 67. Micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra 1*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

III.3.10. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo B1

Las imágenes adquiridas con el microscopio electrónico fueron analizadas usando el software Image J, tomando en cuenta un mínimo de 60 NPs de oro para realizar un muestreo estadístico referente a la distribución de tamaños, obteniendo la siguiente información:

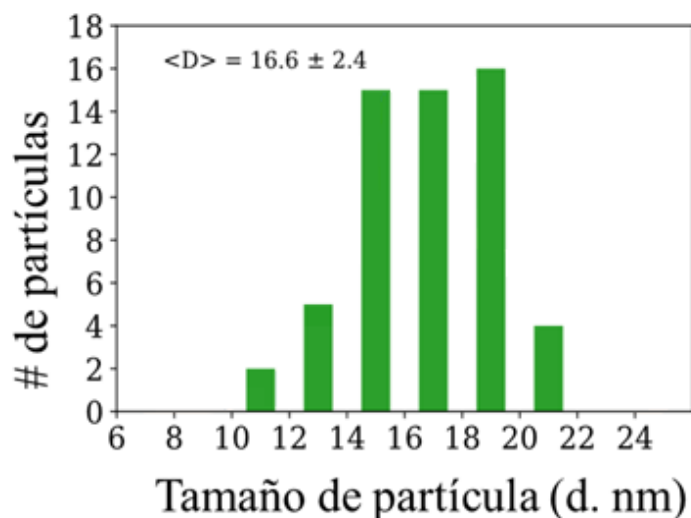


Figura 68. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs (*muestra 1*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo B1**) usando el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase*, con un diámetro promedio igual a 16.6 ± 2.4 nm.

El histograma (**Figura 68**) de la *muestra l* permitió visualizar una baja polidispersidad de las nanopartículas de oro, así como un intervalo estrecho de tamaños que va desde 11 nm hasta 21 nm, calculando un diámetro promedio igual a 16.6 ± 2.4 nm. A pesar de que este tamaño fue ligeramente mayor en comparación con el ϕ promedio obtenido por el método de Turkevich en macroescala (15.6 ± 4.4 nm), la síntesis de las AuNPs usando el **Dispositivo B1** bajo estas condiciones experimentales, demostró ser un buen método para fabricar nanopartículas estables y con menor polidispersidad.

Los mejores resultados obtenidos sintetizando AuNPs con el **Dispositivo B1**, en comparación con el **Dispositivo A1**, se pueden deber a varias razones, incluyendo: El diseño del microchip, donde la aplicación del enfoque hidrodinámico pudo haber contribuido a que la difusión de los reactivos se efectuará de forma más rápida, en comparación con un mezclado más lento por difusión simple como fue en el caso de las muestras *i* y *j*, sintetizadas a flujos totales menores (344.82 y 172.34 $\mu\text{L/h}$, respectivamente). Lo anterior, coincide con la literatura donde se ha reportado que cuando una reacción se encuentra confinada dentro de un enfoque hidrodinámico, la difusión de los reactivos es más rápida y homogénea, sobre todo al utilizar flujos altos, como fue el caso de la *muestra l* (flujo total igual a 1000 $\mu\text{L/h}$), promoviendo un mezclado más eficiente, favoreciendo así la cantidad de producto obtenida por unidad de tiempo (ver **Figura 13**)²⁸.

Otros factores, fueron la temperatura y los tiempos de residencia. Por una parte, durante los experimentos desarrollados con el **Dispositivo A1**, se aplicó calentamiento directo al microchip a una temperatura de 70 °C, manejando tiempos de residencia de 5 y 10 minutos. Sin embargo, después de 20 minutos, se observó el depósito de Au en el interior de las paredes de PDMS disminuyendo el rendimiento de la reacción. Mientras que, con el **Dispositivo B1**, se acortó la longitud del serpentín de PDMS y se mantuvo el chip a temperatura ambiente, disminuyendo el depósito de Au. En este último caso, se aumentaron los tiempos de residencia (entre 15 y 30 min), colocando a la salida del chip un tubo de PTFE, sumergido en agua a una temperatura de 90 °C, sin llegar a notar una deposición significativa de AuNPs.

Por lo tanto, la aplicación de enfoque hidrodinámico dentro de los microcanales, el manejo de flujos y temperaturas altas, puede ayudar a la formación de un mayor número de semillas en las etapas iniciales de la reacción, dando lugar a partículas más pequeñas y homogéneas¹⁵, haciendo notar que en el caso de la *muestra k*, a pesar de haber trabajado con la misma plataforma microfluídica usando el **Dispositivo B1**, la velocidad de flujo no fue lo suficientemente alta como para producir un gran número de semillas, sintetizando partículas más grandes y polidispersas.

III.4. Método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)

Con el objetivo de optimizar la síntesis de nanopartículas de oro, además de proponer un método poco utilizado, se tomaron en cuenta las condiciones experimentales correspondientes a la *muestra 1* y se ejecutó la siguiente serie de experimentos donde se aplicó el *método de flujo continuo una sola fase con cavitación* para generar un flujo turbulento dentro de los microcanales propiciando la mezcla de los reactivos de forma rápida y homogénea.

III.4.1. Análisis cualitativo de las AuNPs sintetizadas por el método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)

El montaje experimental usando el **Dispositivo C1** fue el siguiente (**Figura 69**). El piezoeléctrico que se adherió junto al microchip trabajó a **1 V** y **61 KHz** generando cavitación dentro de los microcanales.

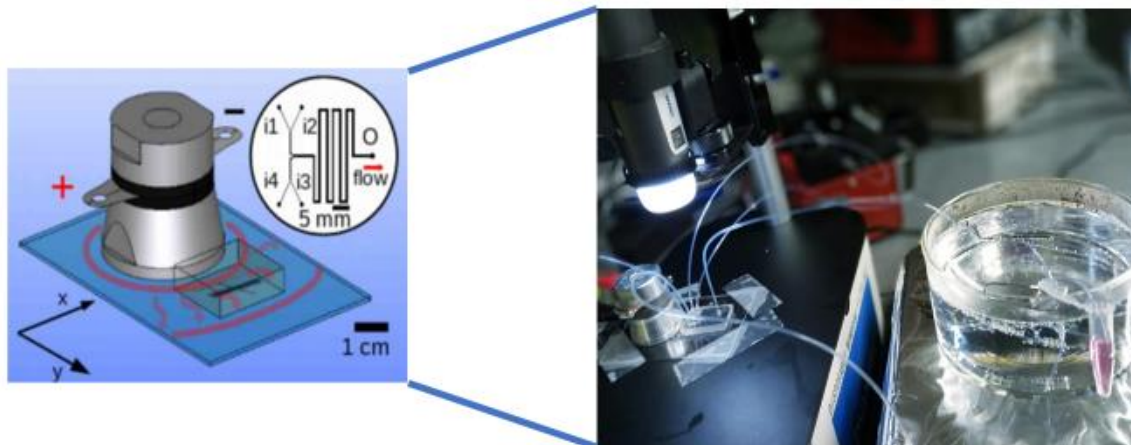


Figura 69. Plataforma microfluídica utilizando el **Dispositivo C1**, para efectuar la síntesis de AuNPs aplicando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*. Entradas del microchip señaladas como (i1, i2, i3 e i4) y salida indicada como (O). Serpentín fabricado de PTFE sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

La dispersión coloidal (**Figura 70**) corresponde al producto obtenido tras realizar la síntesis de nanopartículas de oro utilizando el **Dispositivo C1**, sin someter el microchip a calentamiento directo, pero colocando un serpentín a la salida sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C). Se utilizó un flujo total igual a 1000 $\mu\text{L/h}$ (tiempo de residencia de 15 minutos), manteniendo la relación 1:1 respecto al flujo de citrato:oro.



Figura 70. Dispersión coloidal de AuNPs sintetizadas con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

La muestra *m*, exhibe un color rosado, a diferencia de la muestra *l*, sintetizada bajo las mismas condiciones, pero sin cavitación. Esta última dispersión tiene un aspecto turbio, como en el caso de la muestra *k*, donde se lograron apreciar formas diferentes a la esférica y distintos tamaños de partícula. Tras dar un seguimiento a la muestra, manteniéndola en observación durante una semana, se logró apreciar la rápida formación de precipitado en el fondo del tubo Eppendorf $\text{\textcircled{R}}$ que contenía la muestra.

III.4.2. Espectro de absorción electrónica en la región visible correspondiente a la dispersión coloidal obtenida por el método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)

Se realizó el análisis de la muestra *m*. Cada medición realizada en el espectrofotómetro de absorción electrónica en la región del visible fue hecha por triplicado, en un intervalo de longitud de onda desde 350 hasta 650 nm (**Figura 71**).

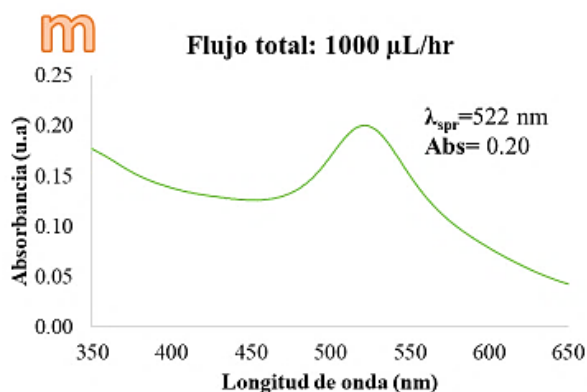


Figura 71. Espectro de absorción electrónica en la región visible correspondientes a la dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentín de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

El espectro de absorción (**Figura 71**) de la dispersión coloidal de la *muestra m* (sin diluir) presenta un valor de $\lambda_{spr}=522$ nm, este valor coincide con la longitud de onda máxima en la *muestra l*, lo que sugiere la formación de AuNPs de tamaño similares. Sin embargo, en este caso, la absorbancia (0.20) disminuyó en un 80% en comparación con dicha muestra, lo que pudo haber sido causado por la rápida precipitación de las AuNPs.

III.4.3. Distribución de la intensidad del tamaño de AuNPs para experimentos en Dispositivo C1 utilizando DLS

Los análisis en el equipo de DLS de la *muestra m* se realizaron por triplicado, recabando la siguiente información.

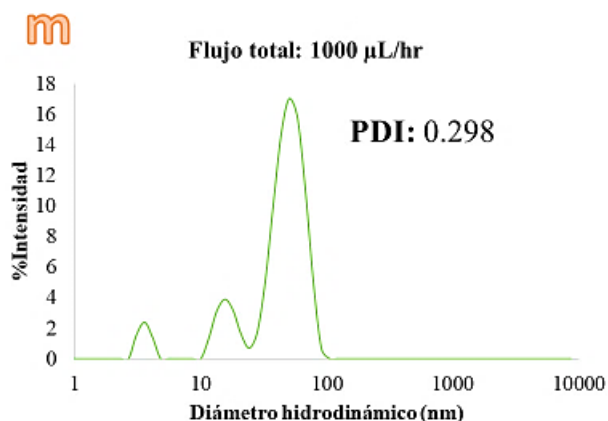


Figura 72. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondiente a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 µL/h con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 °C).

La distribución de la intensidad del tamaño de partícula (**Figura 72**) correspondiente a la *muestra m* señala la existencia de más de una familia de nanopartículas a comparación de la *muestra l*, sintetizada bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin generar cavitación. En este caso, están presentes una primera población de izquierda a derecha, con un diámetro hidrodinámico promedio igual a 4 ± 1 nm, una segunda población que abarca desde los 10 hasta los 24 nm y finalmente la tercera que tiene el pico más intenso y que va desde los 25 hasta 106 nm. Las diversas familias podrían indicar la agregación de la muestra, y/o la mezcla de diferentes tamaños de partícula, la cual es una desventaja al momento de caracterizar este tipo de muestras por DLS. A pesar de esto, la *muestra m*, tiene la segunda polidispersidad más baja de todas las muestras estudiadas, solo ligeramente por encima de la *muestra l*.

III.4.4. Micrografías obtenidas por microscopio electrónico de transmisión (TEM) de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo C1 con cavitación

Las micrografías siguientes (**Figura 73**) se refieren al análisis de la *muestra m* (sin diluir) sintetizada con el **Dispositivo C1**.

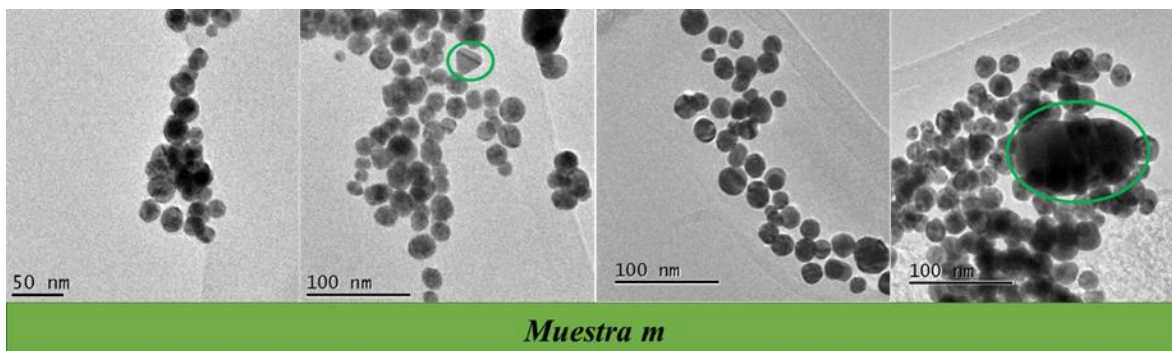


Figura 73. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) correspondientes a una dispersión coloidal de AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, trabajando a 1000 $\mu\text{L/h}$ con un tiempo de residencia de 15 min. Serpentin de PTFE a la salida del microchip sumergido en agua con calentamiento constante (90 $^{\circ}\text{C}$).

Las micrografías muestran que las formas de las nanopartículas en su mayoría son esféricas, con algunas excepciones observando partículas en forma triangular, como se logra apreciar en la segunda fotografía de izquierda a derecha. La distribución de tamaños es más homogénea en comparación con la *muestra k*, donde se distinguieron diferentes formas y una variación notable de tamaños. Tal como ocurrió con la *muestra l*, la aglomeración de las nanopartículas es menor. Sin embargo, se llegó a observar la formación de nanopartículas de mayor tamaño, como se muestra en la primera micrografía de derecha a izquierda.

En este caso, los mayores tamaños de partícula pudieron haber sido causado por errores experimentales donde el piezoeléctrico dejaba de generar cavitación por algún periodo corto de tiempo (segundos), provocando que la mezcla de los reactivos no se llevara a cabo de forma homogénea. También pudo haber sido consecuencia de haber utilizado un diseño de microchip que ya no tenía enfoque hidrodinámico.

III.4.5. Histograma de tamaños de las AuNPs sintetizadas dentro del Dispositivo C1 con cavitación

Las imágenes adquiridas con el microscopio electrónico fueron analizadas usando el software Image J, tomando en cuenta un mínimo de 60 AuNPs para realizar un muestreo estadístico referente a la distribución de tamaños obteniendo la siguiente información:

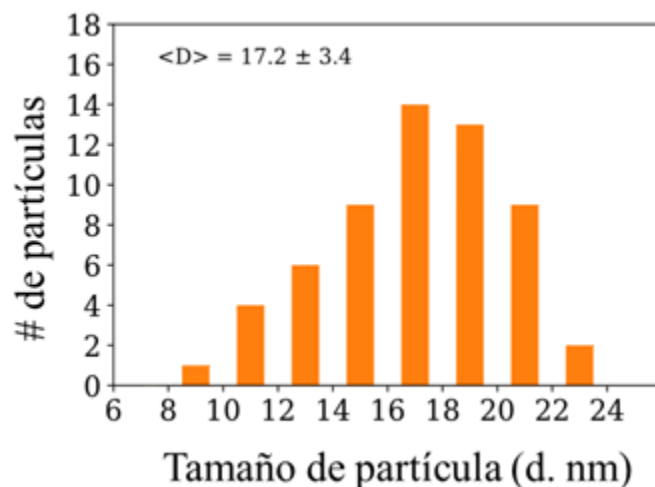


Figura 74. Histograma de la distribución de diámetros de las AuNPs (*muestra m*) sintetizada con el microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**) usando el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación*, con un diámetro promedio de 17.2 ± 3.4 nm.

La distribución de tamaños de las nanopartículas de oro que se muestran en el histograma (**Figura 74**) indican intervalos de tamaños desde 9 nm hasta 23 nm, calculando un diámetro promedio igual a 17.2 ± 3.4 nm. Este tamaño es ligeramente mayor en comparación con el diámetro promedio obtenido para la *muestra m* (16.6 ± 2.4 nm), sintetizada bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin generar cavitación dentro de los microcanales.

En esta serie de experimentos, donde se aplicó cavitación para generar un flujo turbulento dentro en interior de los microcanales, se logró llevar a cabo la síntesis de las AuNPs obteniendo formas esféricas cuya distribución de tamaños se asemeja a los resultados del método por enfoque hidrodinámico (*muestra l*). Una de las ventajas de la cavitación fue que disminuyó notablemente el depósito de Au en las paredes de PDMS y de PTFE, esto fue posible constatarlo gracias a que la reacción fue monitoreada en tiempo real utilizando una cámara digital Dino Lite ®. Sin embargo, el aspecto turbio de la dispersión final, atribuible a la cavitación, disminuyó considerablemente el rendimiento de la reacción (baja absorbancia). Al usar las técnicas de DLS y TEM, el tamaño y la distribución de las AuNPs fueron muy semejantes a la *muestra l*. En resumen, el efecto de cavitación no tuvo el impacto que se esperaba.

III.5. Método de flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones)

La síntesis de nanopartículas de oro dentro de macroemulsiones (diámetro de gota $\approx 100\mu\text{m}$) formadas en microchips de microfluídica ha presentado ciertas ventajas en cuanto a optimización de propiedades ⁵⁷. Sin embargo, la síntesis de AuNPs en nanoemulsiones (diámetro de gota $< 1000\text{ nm}$) utilizando microfluídica, aún no se ha estudiado, razón por la cual se desarrollaron la siguiente serie de experimentos.

III.5.1. Análisis cualitativo de las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones) utilizando el Dispositivo C1

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a las nanoemulsiones (*n* y *o*) sintetizadas aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases*. De primera instancia, se propuso utilizar una relación hexadecano:agua igual a 9:1 y un tensoactivo soluble en aceite (span 80) para favorecer la formación de una emulsión de agua en aceite. La mezcla de las fases para generar nanoemulsiones se realizó utilizando el **Dispositivo C1** aplicando ultrasonido. La fase acuosa consistió en una mezcla formada *in situ* de HAuCl_4 y citrato de sodio para que se formaran las nanopartículas de oro dentro de las nanogotas. Los siguientes reactivos se introdujeron en las siguientes concentraciones y flujos: **i1**) solución de citrato de sodio (1.7 mM, 40 $\mu\text{L/h}$), **i2**) sal precursora de oro (0.5 mM, 60 $\mu\text{L/h}$), **i3**) hexadecano puro (450 $\mu\text{L/h}$), **i4**) hexadecano mezclado con span 80 al 0.1 %, (450 $\mu\text{L/h}$), sumando un flujo total igual a 1000 $\mu\text{L/h}$ (ver sección II.5.2 para más detalles). Las dos nanoemulsiones obtenidas se muestran en la **Figura 75**.

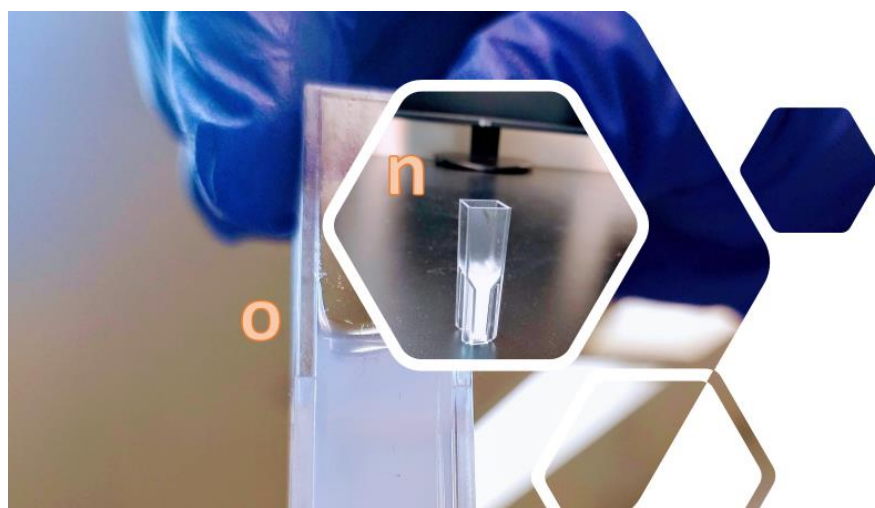


Figura 75. Emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases* donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (22 °C). **o**) La emulsión generada en el microchip fue recolectada en un tubo Eppendorf® que fue sumergido simultáneamente en un vaso de precipitado donde se mantenía en calentamiento constante (90 °C).

La emulsión *n* fue recolectada del microchip y se mantuvo a temperatura ambiente (22°C). Su apariencia es blanca lechosa, característica de las emulsiones (**Figura 75**). Sin embargo, a simple vista no se logró distinguir coloración alguna que diera indicios de la formación de nanopartículas de oro.

En cuanto a la emulsión *o*, esta fue sometida a calentamiento a una temperatura constante de 90 °C durante 40 minutos siendo éste el tiempo que se mantuvo funcionando el microchip. Su apariencia física es translúcida, más parecida a una microemulsión, aunque de igual forma no se logra apreciar algún color característico que de indicios de la formación de las AuNPs.

Ambas emulsiones (*n* y *o*) fueron monitoreadas de forma visual durante 4 semanas, tomando en cuenta la posible separación de fases o la precipitación en dado caso de las nanopartículas. Sin embargo, las emulsiones permanecieron en una sola fase durante en el lapso en que se mantuvieron en observación.

III.5.2. Distribución de la intensidad del tamaño de gota de las nanoemulsiones para experimentos en Dispositivo C1, utilizando DLS

Para caracterizar el tamaño de las gotas de las nanoemulsiones formadas dentro del **Dispositivo C1**, se utilizó el equipo de DLS (**Figura 76**). Cada una de las muestras (*n* y *o*) se diluyó 10 veces con hexadecano y se analizó por triplicado para determinar su distribución de la intensidad del tamaño de gota e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes.

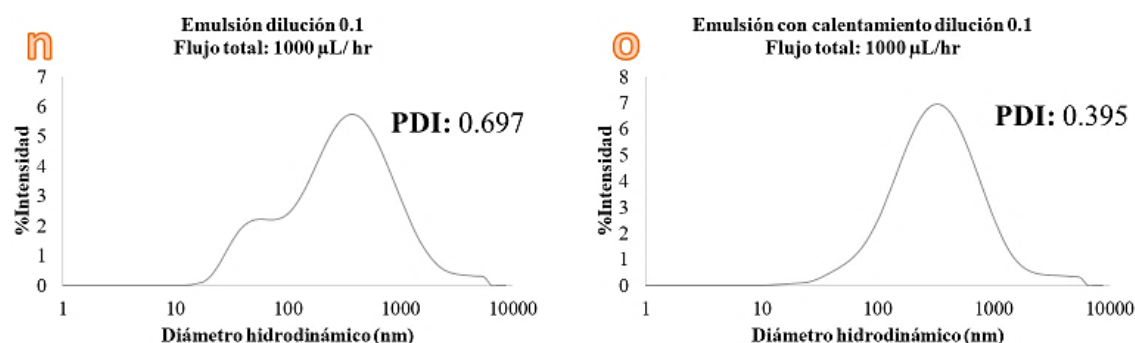


Figura 76. Distribución de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) correspondientes a las emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases*, donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (25 °C). **o**) La emulsión generada en el microchip fue recolectada en un tubo Eppendorf® que fue sumergido simultáneamente en un vaso de precipitado donde se mantenía en calentamiento constante (90 °C) durante 40 minutos. Ambas muestras diluidas con hexadecano 10 veces.

Las distribuciones de la intensidad del tamaño de partícula (**Figura 76**) son similares en ambos casos e indican la existencia de nanogotas con una variedad de diámetros hidrodinámicos muy amplia que abarcan desde los 30 hasta los más de 1000 nm de diámetro. En el caso de la *muestra n*, (22 °C), se logra visualizar un hombro, mientras que para la *muestra o* donde sí se aplicó calentamiento, la distribución de tamaños ya no sigue el comportamiento de muestra bimodal, pero aún conserva aún una distribución muy amplia, con un índice de polidispersidad menor en comparación con la *muestra n*. Una posible razón por la que se obtuvo un PDI tan alto para la *muestra n*, pudo haber sido la alta concentración de la muestra. Para corroborarlo, esta emulsión se diluyó 10 veces más y se determinó nuevamente su distribución de la intensidad del tamaño de gota (**Figura 77**).

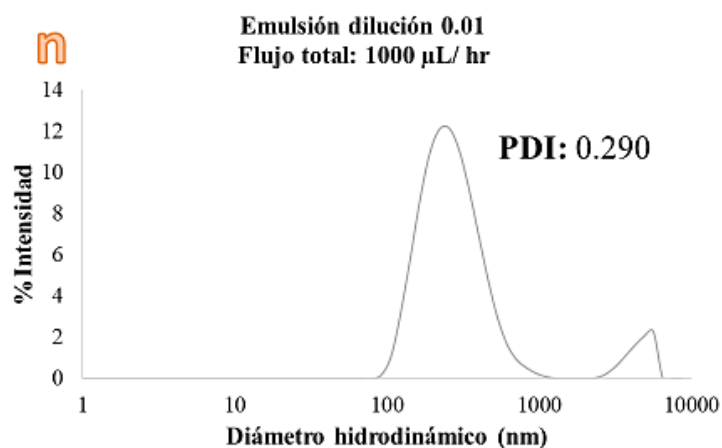


Figura 77. Distribución de la intensidad del tamaño de gota e índice de polidispersidad (PDI) correspondiente a una emulsión sintetizada dentro con un microchip de microfluídica (**Dispositivo C1**), aplicando el método de flujo segmentado en dos fases donde: **n**) La emulsión generada en el microchip recolectada directamente en un tubo Eppendorf® (22 °C). La muestra fue diluida 100 veces con hexadecano.

La nueva dilución de la *muestra n* permitió observar una distribución de tamaños más estrecha, disminuyendo también el valor del PDI a poco más de la mitad en comparación con la misma muestra diluida solo 10 veces en hexadecano.

Posteriormente, se repitieron las condiciones experimentales de la muestra *o* aplicando el método de flujo segmentado en dos fases, cambiando la relación **aceite:agua** (7:3) con calentamiento. Al final del experimento se recolectaron 6 muestras en diferentes tubos Eppendorf® denominadas como: **1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A**. Las dos primeras muestras se mantuvieron como control, mientras que el resto se les dio un tratamiento para romper la emulsión y tratar de recuperar las posibles AuNPS sintetizadas. Con este fin, las muestras **3A, 4A, 5A, 6A** se centrifugaron durante 20 min a 1500 RPM a una temperatura de 20 °C. Después de esto, se removió la fase orgánica superior y se agregaron 100 µL de hexadecano para hacer los lavados y diluir el tensoactivo. Este procedimiento se repitió adicionando ahora 200 µL de hexadecano. Estos pasos se repitieron al menos 4 veces para cada una de las muestras apreciando lo siguiente:

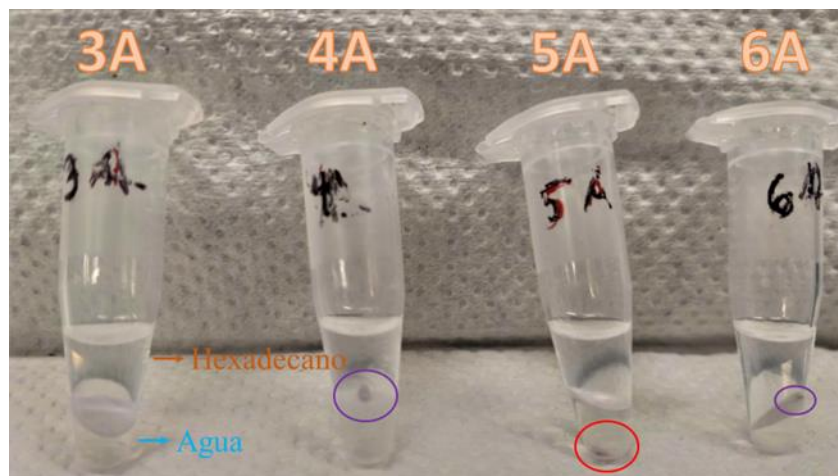


Figura 78. Separación de fases de emulsiones sintetizadas dentro de un microchip de microfluídica, aplicando el *método de flujo segmentado en dos fases*. En la fotografía se observa el cuarto y último lavado con hexadecano para cada una de las muestras **3A**, **4A**, **5A** y **6A**.

La **Figura 78** muestra la apariencia física de las dos fases separadas por centrifugación después de haber realizado 4 lavados. En el caso de la muestra **3A** no se logró visualizar algún precipitado colorido o algún producto que indique la formación de las nanopartículas de oro. Sin embargo, en el caso de las muestras restantes, sí se encontró un pequeño punto colorido en la interfase (muestras **4A** y **6A**) o en el fondo del tubo Eppendorf® (*muestra 5A*).

A pesar de que esta prueba podría ser concluyente para determinar la posible síntesis de las nanopartículas de oro dentro de la emulsión, el volumen de las muestras recolectadas no fue suficiente para su posterior caracterización por lo que representa otra área de oportunidad para perfeccionar el método en investigaciones futuras.

III.6. Resumen de resultados para la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs)

La siguiente tabla presenta los principales resultados obtenidos en este trabajo de investigación.

Tabla 10. Resumen de resultados de síntesis de nanopartículas de oro fabricadas en diferentes reactores.

Reactor utilizado en la síntesis	Volumen del reactor (μL)	Flujo Total ($\mu\text{L/hr}$)	Temperatura del reactor ($^{\circ}\text{C}$)	A_{spr} de la dispersión coloidal final (u.a)	λ_{spr} de la dispersión coloidal final (nm)	PDI por DLS	Diámetro promedio de las AuNPs (nm) por TEM	Morfología de las AuNPs
Vaso de Precipitado Método de Turkevich	1×10^5	sin flujo	90	1.6886	523	0.299	15.6 ± 4.4	esféricas
Microdispositivo A1: Flujo continuo en reactor de PDMS	28	172.34	70	0.14	535	0.444	20 ± 3	esféricas
		344.82		0.32	531	0.575		
Microdispositivo B1: Flujo continuo en serpentín de PTFE	245	500	90	0.8	530	0.453	16.6 ± 2.4	esféricas, triangulares, hexagonales
		1000		1.08	522	0.263		esféricas
Microdispositivo C1: Flujo continuo con cavitación y serpentín de PTFE	245	1000	90	0.2	522	0.298	17.2 ± 3.4	esféricas

CONCLUSIONES

El método de Turkevich es el método más utilizado hoy en día para sintetizar nanopartículas de oro gracias a: la simplicidad de las condiciones de reacción en el laboratorio, el relativo bajo costo de los reactivos, además del tiempo requerido para efectuar la reacción (5 minutos). Sin embargo, presenta limitaciones importantes, como es el control deficiente de los parámetros que definen el tamaño final, la morfología y la polidispersidad de las nanopartículas. Por esta razón, persiste el interés por describir protocolos más robustos y el uso de técnicas alternativas como las aplicadas a microfluídica, que tomen en cuenta la influencia de factores como la temperatura, la relación molar [citrato]/[Au³⁺] y cambios de pH, entre otros, que definen el mecanismo de reacción en las diferentes etapas de la síntesis.

La concentración de las AuNPs sintetizadas en macroescala (100 mL) fue estimada utilizando el método de Haiss y colaboradores⁶⁰, basándonos en el valor de sus absorbancias medidas a las longitudes de onda de **450 y 523 nm**. Al correlacionarlas, fue posible calcular los diámetros teóricos asociándolos con su coeficiente de extinción molar medido a una longitud de onda de 450 nm (ϵ_{450}). Con esta información, se obtuvo la concentración en mol/L de las AuNPs calculadas entre **1.7 a 3.1 nM**, correspondientes a diámetros de entre **21 y 26 nm**, sin embargo, con nuestro método experimental, al observar estas nanopartículas por TEM, se obtuvieron tamaños menores, de entre **9 y 23 nm**, como se observa en el histograma de la **Figura 48**, cuyo diámetro promedio fue igual a **15.6 ± 4.4 nm**.

En este trabajo se emplearon cuatro diferentes diseños experimentales que involucraron técnicas de microfluídica para fabricar nanopartículas de oro: **a)** mezclado por difusión simple en una sola fase, **b)** mezclado por difusión con enfoque hidrodinámico para una sola fase, **c)** mezclado turbulento en una sola fase con cavitación y **d)** flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones).

En el caso **a)**, utilizando el **Dispositivo A1**, se desarrolló el *método de flujo continuo en una sola fase* aplicando calentamiento directo al microchip (70 °C). Debido a la afinidad de las AuNPs con el PDMS hubo una disminución en el rendimiento de las reacciones comparadas con la técnica a macroescala. Esto conforme a los valores de absorbancia de las muestras *i* y *j* (A_{spr} = **0.32** y **0.14**). Además, se observaron señales del pico de resonancia de plasmón superficial ligeramente desplazadas hacia la derecha (λ_{spr} : **531 y 535 nm**) en comparación con las AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich en macroescala, indicando la formación de nanopartículas ligeramente más grandes. Así mismo, los índices de polidispersidad (**PDI= 0.575 y 0.444**) indicaron la existencia de poblaciones de nanopartículas más diversas y la posible agregación de estas. Por otro lado, al analizar la *muestra i* por microscopía electrónica de transmisión, se observaron AuNPs en su mayoría esféricas, con algunas formas ovaladas y aglomeradas entre sí, con diámetro promedio igual a **20 nm**.

En resumen, los resultados con el **Dispositivo A1**, fueron relevantes para deducir que es posible fabricar AuNPs de mayor tamaño cuando el flujo al interior de los microcanales es menor. Esto debido a que el mezclado por difusión simple de los reactivos es más lento cuando se ocupa un menor flujo, impidiendo el desplazamiento rápido de los iones de oro $[\text{AuCl}_4]^-$ hacia las especies menos reactivas $[\text{AuCl}_{3-x}(\text{OH})_{1+x}]$, tras la agregación del citrato de sodio. En consecuencia, el número de semillas formadas en las etapas iniciales de la reacción es bajo, generando partículas polidispersas conforme la reacción de nucleación se efectúa de manera poco uniforme ^{15,16}.

Los mejores resultados se obtuvieron aplicando la técnica **b)** usando el **Dispositivo B1**, donde se llevó a cabo el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase* trabajando a dos diferentes flujos totales de **500 y 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$** , correspondientes a las muestras **k** y **l**, respectivamente. En comparación con la técnica **a)**, hubo un incremento en los valores de absorbancia ($A_{\text{spr}} = \mathbf{0.8}$ y $\mathbf{1.08}$), además del desplazamiento hacia la izquierda de las señales del pico máximo referente al SPR ($\lambda_{\text{spr}} = \mathbf{530}$ y $\mathbf{522}$ nm), lo que implicó un mayor rendimiento y AuNPs más pequeñas. Las distribuciones de la intensidad del tamaño de partícula e índice de polidispersidad (**PDI = 0.473 y 0.263**) contrastan entre sí. Para la *muestra k*, se observan dos familias de nanopartículas, una de ellas con diámetros hidrodinámicos mayores a 100 nm, mientras que al duplicar el flujo (*muestra l*), la distribución de tamaños exhibe una sola familia, logrando disminuir hasta 12% la polidispersidad de las AuNPs en comparación con aquellas sintetizadas por el método de Turkevich en macroescala. Las micrografías obtenidas por TEM para la *muestra k*, señalan la presencia de nanopartículas con diferentes tamaños y de formas esféricas, triangulares y hexagonales. Mientras que para la *muestra l*, la morfología de las nanopartículas fueron formas esféricas bien definidas, con una distribución de tamaños más homogénea y diámetros promedios de $\mathbf{16.6 \pm 2.4}$ nm, sin la presencia significativa de aglomerados. Comparada con la muestra obtenida por el método a macroescala ($\mathbf{15.6 \pm 4.4}$ nm). Al calcular el coeficiente de variación (desviación estándar), la polidispersidad de la AuNPs se redujo hasta un 50%. Esta optimización de resultados ocurrió por varias razones, entre ellas: el uso del enfoque hidrodinámico, trabajar a flujos altos y mantener la reacción a una temperatura de 90°C. Estos factores reducen el tiempo de mezclado, lo que a su vez podría mejorar la velocidad de nucleación en el interior de las paredes de los microcanales, promoviendo la formación de una mayor cantidad de semillas en las etapas iniciales de la reacción, resultando en nanopartículas esféricas más pequeñas con una distribución de tamaños más homogénea y menos polidispersas.

Al aplicar el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación* (caso **c**, **Dispositivo C1**), manteniendo el flujo total a **1000 $\mu\text{L}/\text{h}$** y **15 min de tiempo de residencia**, las nanopartículas de oro también presentaron formas esféricas bien definidas, algunas de mayor tamaño con diámetros promedios de $\mathbf{17.2 \pm 3.4}$ nm. Sin embargo, la absorbancia de la *muestra m* disminuyó, contrario a lo que se esperaba, lo que significó un menor rendimiento. Gracias a los análisis realizados en el DLS, fue posible determinar la existencia de diversas familias de nanopartículas con diámetros hidrodinámicos incluso más pequeños en comparación con aquellos experimentos donde no se aplicó cavitación.

El valor de índice de polidispersidad ligeramente más alto en comparación con la *muestra I*, podría ser atribuido a problemas con el piezoeléctrico que por algún periodo corto de tiempo (segundos) dejaba de generar cavitación, provocando que la mezcla de los reactivos no se llevara a cabo de forma homogénea, además del diseño de microchip que ya no tenía enfoque hidrodinámico. Sin embargo, una de las ventajas de la cavitación fue la mínima deposición de AuNPs en las paredes de los microcanales, posiblemente a que todo el sistema vibra a una alta frecuencia. Por lo que se propone diseñar una plataforma microfluídica aplicando cavitación, pero con un diseño que aplique enfoque hidrodinámico.

Para el caso **d)** se efectuaron los experimentos referentes al *método de flujo segmentado en dos fases (nanoemulsiones)* usando el **Dispositivo C1**. Al romper la nanoemulsión, se pudo observar una pequeña cantidad de nanopartículas de oro (**Figura 78**), sin embargo, la cantidad de muestra no fue suficiente para poder ser caracterizada, por lo que se propone cambiar la formulación de la nanoemulsión para mejorar el rendimiento y la concentración de AuNPs presentes en las nanoemulsiones.

Como se pudo constatar, al realizar las caracterizaciones para las nanopartículas de oro, no es lo más recomendable comparar de forma directa las diferentes técnicas, ya que cada una proporciona diferente información, como en el caso del espectro de absorción electrónica en la región del visible, donde se determinó tanto la longitud de onda como el valor de la absorbancia medidas en el pico máximo referente al plasmón superficial (λ_{spr} , A_{spr}), logrando estimar la concentración de las AuNPs. Mientras que el equipo dispersor dinámico de luz fue capaz de revelar detalles de los cambios dinámicos y de la estabilidad de las nanopartículas en dispersión, lo cual no es posible conocer usando otras técnicas. Sin embargo, su uso es limitado al medir muestras muy polidispersas o heterogéneas. Por otro lado, para conocer la morfología, así como el tamaño de las AuNPs, las técnicas microscópicas como microscopía electrónica de transmisión donde la muestra se analiza, sin tomar en cuenta las capas iónicas y de disolvente asociadas a ella en dispersión.

El uso de plataformas de microfluídica para efectuar la síntesis de nanopartículas de oro permite tener control sobre variables relevantes en la reacción como son: Temperatura, velocidad de flujo y tiempos de reacción. Además de una considerable **reducción** en el **volumen mínimo requerido** de reactivos (**< 1 mL**) a comparación de los experimentos efectuados en macroescala (**100 mL**). Lo que resultó en la **disminución de residuos** y una importante **reducción de costos**. También fue posible reutilizar los dispositivos de microfluídica en los casos donde no se observó deposición sustancial de AuNPs, como fue en los experimentos donde se generó cavitación. Cabe destacar que todos los experimentos pudieron ser **monitoreados en tiempo real**, gracias al uso de microchips fabricados con un material ópticamente transparente, dando seguimiento a la reacción usando cámaras digitales lo que permitió observar el desarrollo de la reacción al interior de los microcanales.

PERSPECTIVAS

Considerando las conclusiones a las que se llegó tras realizar este trabajo de investigación, se proponen los siguientes puntos:

- Como se observó, el depósito de oro en las paredes de PDMS puede llegar a ser una limitante al momento de sintetizar nanopartículas de oro por lo que se plantea la fabricación de los dispositivos haciendo usos de otros materiales, por ejemplo, vidrio o acrílico (Poli (metil 2-metilpropenoato) ó PMMA). También se podría recubrir o dar un tratamiento químico a las paredes de PDMS para evitar la integración de las nanopartículas.
- Caracterizar los microchips donde se observa a simple vista la deposición de oro, para conocer la forma en que se están depositando las nanopartículas, así como su distribución espacial ya que, de ser posible, esto podría ser aprovechado para aplicaciones futuras como biosensores ópticos o electrodos.
- Realizar un estudio sistemático de la relación que existe entre los cambios de flujo y los tiempos de residencia, con el tamaño y polidispersidad de las nanopartículas, utilizando diferentes relaciones molares citrato/Au.
- Repetir los experimentos del *método de flujo segmentado en dos fases* utilizando otros disolventes orgánicos y otros tensoactivos (tween 20, sodio dodecil sulfato (SDS), polivinilpirrolidina (PVP) disuelto en dimetilformamida (DMF), quitosán).

ANEXOS

AI. Tablas correspondientes a la elaboración de los histogramas de los tamaños de las AuNPs

Tabla AI.1 Datos correspondientes a la distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich en macroescala.

Método de Turkevich en macroescala						
Área píxeles	Diámetro en función del área píxeles	Diámetro en función del área nanómetros	Área píxeles	Diámetro en función del área píxeles	Diámetro en función del área nanómetros	
515	25.607	17.783	202	16.037	11.137	
999	35.665	24.767	366	21.587	14.991	
696	29.769	20.673	267	18.438	12.804	
793	31.775	22.066	241	17.517	12.165	
357	21.320	14.806	301	19.577	13.595	
564	26.798	18.609	260	18.195	12.635	
944	34.669	24.076	193	15.676	10.886	
715	30.172	20.953	377	21.909	15.215	
594	27.501	19.098	215	16.545	11.490	
227	17.001	11.806	234	17.261	11.987	
834	32.587	22.630	394	22.398	15.554	
140	13.351	9.272	280	18.881	13.112	
461	24.227	16.825	253	17.948	12.464	
509	25.457	17.679	310	19.867	13.797	
265	18.369	12.756	463	24.280	16.861	
253	17.948	12.464	329	20.467	14.213	
253	17.948	12.464	369	21.675	15.052	
504	25.332	17.592	902	33.889	23.534	
320	20.185	14.017	547	26.391	18.327	
194	15.717	10.914	696	29.769	20.673	
156	14.093	9.787	194	15.717	10.914	
299	19.511	13.550	918	34.188	23.742	
209	16.313	11.328	728	30.445	21.143	
251	17.877	12.415	513	25.557	17.748	
303	19.642	13.640	286	19.083	13.252	
174	14.884	10.336	260	18.195	12.635	
854	32.975	22.899	808	32.075	22.274	
126	12.666	8.796	317	20.090	13.952	
376	21.880	15.195	326	20.373	14.148	
179	15.097	10.484	958	34.925	24.254	

Tabla AI.2 Datos correspondientes a la distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas por el *método de flujo continuo con enfoque hidrodinámico para una sola fase (Dispositivo B1)*.

Método de flujo continuo en una sola fase (Dispositivo B1)					
Área píxeles	Diámetro en función del área píxeles	Diámetro en función del área Nanómetros	Área píxeles	Diámetro en función del área píxeles	Diámetro en función del área Nanómetros
535	26.099	18.125	218	16.660	11.570
394	22.398	15.554	207	16.235	11.274
436	23.561	16.362	598	27.593	19.162
334	20.622	14.321	236	17.334	12.038
407	22.764	15.808	383	22.083	15.335
324	20.311	14.105	288	19.149	13.298
288	19.149	13.298	478	24.670	17.132
415	22.987	15.963	491	25.003	17.363
430	23.399	16.249	526	25.879	17.972
433	23.480	16.306	325	20.342	14.126
453	24.016	16.678	345	20.959	14.555
688	29.597	20.554	417	23.042	16.001
696	29.769	20.673	240	17.481	12.139
496	25.130	17.452	145	13.587	9.436
547	26.391	18.327	553	26.535	18.427
480	24.722	17.168	654	28.857	20.039
557	26.631	18.494	351	21.140	14.681
544	26.318	18.276	405	22.708	15.770
357	21.320	14.806	347	21.019	14.597
612	27.915	19.385	502	25.282	17.557
590	27.408	19.033	417	23.042	16.001
561	26.726	18.560	664	29.076	20.192
430	23.399	16.249	592	27.455	19.066
639	28.524	19.808	437	23.588	16.381
585	27.292	18.953	552	26.511	18.410
328	20.436	14.192	402	22.624	15.711
505	24.357	17.609	512	25.532	17.731
572	26.987	18.741	631	28.345	19.684
307	19.771	13.730	539	26.197	18.192

Tabla AI.3 Datos correspondientes a la distribución de tamaños de AuNPs sintetizadas por el *método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)*.

Método de flujo continuo en una sola fase con cavitación (Dispositivo C1)						
Área	Diámetro en función del área	Diámetro en función del área	Área	Diámetro en función del área	Diámetro en función del área	
pixeles	pixeles	Nanómetros	pixeles	pixeles	Nanómetros	
651	28.790	19.993	268	18.472	12.828	
501	25.257	17.539	731	30.508	21.186	
516	25.632	17.800	501	25.257	17.539	
215	16.545	11.490	610	27.869	19.353	
309	19.835	13.774	575	27.058	18.790	
288	19.149	13.298	762	31.148	21.631	
234	17.261	11.987	842	32.742	22.738	
216	16.584	11.516	360	21.409	14.868	
175	14.927	10.366	598	27.593	19.162	
425	23.262	16.154	470	24.463	16.988	
375	21.851	15.174	449	23.910	16.604	
629	28.300	19.653	431	23.426	16.268	
358	21.350	14.826	612	27.915	19.385	
538	26.173	18.175	288	19.149	13.298	
783	31.574	21.927	722	30.320	21.055	
931	34.429	23.909	370	21.705	15.073	
449	23.910	16.604	369	21.675	15.052	
544	26.318	18.276	294	19.348	13.436	
476	24.618	17.096	543	26.294	18.260	
681	29.446	20.449	490	24.978	17.346	
623	28.164	19.559	740	30.695	21.316	
375	21.851	15.174	967	35.089	24.367	
381	22.025	15.295	495	25.105	17.434	
115	12.101	8.403	726	30.403	21.114	
569	26.916	18.692	652	28.812	20.009	
536	26.124	18.142	347	21.019	14.597	
477	24.644	17.114	264	18.334	12.732	
536	26.124	18.142	784	31.595	21.941	
477	24.644	17.114	323	20.279	14.083	
			428	23.344	16.211	

REFERENCIAS

1. Rodríguez, F. D. D. C. Introducción a los nanomateriales. *Lecturas de ingeniería* 20 79 (2012).
2. Grupo, D. E. L. & Trabajo, D. E. GT-13.
3. Inshakova, E. & Inshakov, O. World market for nanomaterials: structure and trends. *MATEC Web of Conferences* 129, 02013 (2017).
4. Zanella, R. Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Www.Mundonano.Unam.Mx* 5, 69–81 (2012).
5. Habiba, K., Makarov, V. I., Weiner, B. R. & Morell, G. *O Fabrication of Nanomaterials by Pulsed Laser Synthesis Outline*.
6. Módulo 5 : Reflexión y refracción Algunos procesos físicos importantes Refracción y reflexión.
7. INSHT. Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales. *Blamey y otros* 2, 36–59 (2015).
8. Las nanopartículas de oro, ¿la nueva llave para almacenar energía solar? <https://www.ticbeat.com/innovacion/nanoparticulas-oro-energia-solar/>.
9. Oro y láser contra el cáncer. <https://centrosconacyt.mx/objeto/oro-y-laser-contra-el-cancer/>.
10. Científicas, P. Nanomateriales. (2016).
11. Gold Nanoparticles: Properties and Applications | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>.
12. Mancini, G. F. *et al.* Order/Disorder Dynamics in a Dodecanethiol-Capped Gold Nanoparticles Supracrystal by Small-Angle Ultrafast Electron Diffraction. *Nano Letters* 16, 2705–2713 (2016).
13. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 11, 55–75 (1951).
14. Gulati, S., Sachdeva, M. & Bhasin, K. K. Capping agents in nanoparticle synthesis: Surfactant and solvent system. *AIP Conference Proceedings* 1953, (2018).
15. Wuithschick, M. *et al.* Turkevich in New Robes : Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. 7052–7071 (2015) doi:10.1021/acs.nano.5b01579.
16. Shi, L., Buhler, E., Boué, F. & Carn, F. How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question. *Journal of Colloid and Interface Science* 492, 191–198 (2017).

17. Trouiller, A. J., Hebie, S., el Bahhaj, F., Napporn, T. W. & Bertrand, P. Chemistry for oncotheranostic gold nanoparticles. *European Journal of Medicinal Chemistry* **99**, 92–112 (2015).
18. Kimling, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 15700–15707 (2006).
19. Wang, J. T., Wang, J. & Han, J. J. Fabrication of advanced particles and particle-based materials assisted by droplet-based microfluidics. *Small* **7**, 1728–1754 (2011).
20. Farré, M., Kantiani, L. & Barceló, D. *Microfluidic Devices: Biosensors. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* (2012). doi:10.1016/B978-0-12-384862-8.00007-8.
21. Fernández Rivas, D. Microfluidos: Nuevas fronteras. *Revista Cubana de Física* **28**, 60–67 (2011).
22. Jiménez, P. J. & Jiménez, P. J. MODULAR . LAB-ON-A-CHIP. (2018).
23. Alvarado, A. S., Erro, L. E., María, S. & Puebla, T. Propiedades físico-químicas de membranas PDMS empleadas en lentes líquidas. *Superficies y vacío* **22**, 61–66 (2009).
24. Guerrero, A. O. Tesis Abraham.pdf. (2016).
25. Yu, L. & Skov, A. L. Monolithic growth of partly cured polydimethylsiloxane thin film layers. *Polymer Journal* **46**, 123–129 (2014).
26. PDMS. <https://chem.beloit.edu/edetc/nanolab/PDMS/PDMS.html>.
27. Vilchis, Paloma, Medina, Abraham, Oropeza, L. Fabricacion de un dispositivo microfluidico para el estudio de fluidos complejos. **1**, 110 (2011).
28. Lu, M. *et al.* Nano Today Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. *Nano Today* **11**, 778–792 (2016).
29. Saliba, J. *et al.* Development of microplatforms to mimic the in vivo architecture of CNS and PNS physiology and their diseases. *Genes* **9**, 1–29 (2018).
30. PFITZNER, J. Poiseuille and his law. *Anaesthesia* **31**, 273–275 (1976).
31. Malvern Instruments Limited. Understanding Taylor Dispersion Analysis. 8 (2015).
32. Song, H., Tice, J. D. & Ismagilov, R. F. A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie - International Edition* **42**, 768–772 (2003).
33. Lu, M. *et al.* Shape-Controlled Synthesis of Hybrid Hydrodynamic Focusing. 10026–10034 (2014).

34. Lu, M. *et al.* Three-dimensional hydrodynamic focusing method for polyplex synthesis. *ACS Nano* **8**, 332–339 (2014).
35. DeMello, A. J. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature* **442**, 394–402 (2006).
36. Stroock, A. D. *et al.* Chaotic mixer for microchannels. *Science* **295**, 647–651 (2002).
37. 3.6.1 Fundamento de la técnica | Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ). <http://www.ub.edu/talq/es/node/252>.
38. Jalal, J. & Leong, T. S. H. Microstreaming and its role in applications: A mini-review. *Fluids* **3**, (2018).
39. Manickam, S. & Ashokkumar, M. *Cavitation: A novel energy-efficient technique for the generation of nanomaterials*. *Cavitation: A Novel Energy-Efficient Technique for the Generation of Nanomaterials* (2014). doi:10.4032/9789814411554.
40. Kerboua, K. & Hamdaoui, O. Energetic challenges and sonochemistry: A new alternative for hydrogen production? *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **18**, 84–89 (2019).
41. Yeung, S. A., Hobson, R., Biggs, S. & Grieser, F. Formation of gold sols using ultrasound. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 378–379 (1993) doi:10.1039/C39930000378.
42. Pol, V. G. *et al.* Sonochemical deposition of silver nanoparticles on silica spheres. *Langmuir* **18**, 3352–3357 (2002).
43. Shen, Q., Jiang, L., Miao, J., Hou, W. & Zhu, J. J. Sonoelectrochemical synthesis of CdSe nanotubes. *Chemical Communications* 1683–1685 (2008) doi:10.1039/b718022e.
44. Cancino, C. E. Análisis teórico experimental de transductores de ultrasonido tipo Langevin. *58* (2011).
45. Lee, Y. T. *et al.* Ultrasound-based formation of nano-Pickering emulsions investigated via in-situ SAXS. *Journal of Colloid and Interface Science* **536**, 281–290 (2019).
46. Huang, H. *et al.* Continuous flow synthesis of ultrasmall gold nanoparticles in a microreactor using trisodium citrate and their SERS performance. *Chemical Engineering Science* **189**, 422–430 (2018).
47. Muñoz-Espí, R. & Álvarez-Bermúdez, O. *Application of Nanoemulsions in the Synthesis of Nanoparticles*. *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization* (2018). doi:10.1016/B978-0-12-811838-2.00015-1.

48. Nazarzadeh, E., Anthonypillai, T. & Sajjadi, S. Journal of Colloid and Interface Science On the growth mechanisms of nanoemulsions. *Journal of Colloid And Interface Science* **397**, 154–162 (2013).
49. SadAbadi, H., Packirisamy, M. & Wuthrich, R. Uniform integration of gold nanoparticles in PDMS microfluidics with 3D micromixing. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **25**, 94006 (2015).
50. Weng, C. H., Huang, C. C., Yeh, C. S., Lei, H. Y. & Lee, G. bin. Synthesis of hexagonal gold nanoparticles using a microfluidic reaction system. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **18**, (2008).
51. Wagner, J. & Köhler, J. M. Continuous synthesis of gold nanoparticles in a microreactor. *Nano Letters* **5**, 685–691 (2005).
52. Wagner, J., Tshikhudo, T. R. & Köhler, J. M. Microfluidic generation of metal nanoparticles by borohydride reduction. *Chemical Engineering Journal* **135**, 104–109 (2008).
53. Li, D. E. & Lin, C. H. Microfluidic chip for droplet-based AuNP synthesis with dielectric barrier discharge plasma and on-chip mercury ion detection. *RSC Advances* **8**, 16139–16145 (2018).
54. Boleininger, J., Kurz, A., Reuss, V. & Sönnichsen, C. Microfluidic continuous flow synthesis of rod-shaped gold and silver nanocrystals. *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**, 3824–3827 (2006).
55. Uson, L., Sebastian, V., Arruebo, M. & Santamaria, J. Continuous microfluidic synthesis and functionalization of gold nanorods. *Chemical Engineering Journal* **285**, 286–292 (2016).
56. Thiele, M. *et al.* Combination of microfluidic high-throughput production and parameter screening for efficient shaping of gold nanocubes using Dean-flow mixing. *Lab on a Chip* **17**, 1487–1495 (2017).
57. Abalde-cela, S., Taladriz-blanco, P., Oliveira, M. G. de & Abell, C. Droplet microfluidics for the highly controlled synthesis of branched gold nanoparticles. *Scientific Reports* 1–6 (2018) doi:10.1038/s41598-018-20754-x.
58. Microchem. SU-8 3000 Permanent Epoxy. *Product Datasheet* **20**, 4 (2000).
59. Zheng, T., Bott, S. & Huo, Q. Techniques for Accurate Sizing of Gold Nanoparticles Using Dynamic Light Scattering with Particular Application to Chemical and Biological Sensing Based on Aggregate Formation. *ACS Applied Materials and Interfaces* **8**, 21585–21594 (2016).
60. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical Chemistry* **79**, 4215–4221 (2007).
61. Approach, C. *et al.* Supporting Information. *Scanning Electron Microscopy* 1–7 (2007) doi:10.1002/anie.201006763.

62. Eaton, P. *et al.* A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy* **182**, 179–190 (2017).
63. Ghisleri, C. *et al.* Patterning of gold-polydimethylsiloxane (Au-PDMS) nanocomposites by supersonic cluster beam implantation. *Journal of Physics D: Applied Physics* **47**, (2014).
64. Duraiswamy, S. & Khan, S. A. Droplet-based microfluidic synthesis of anisotropic metal nanocrystals. *Small* **5**, 2828–2834 (2009).