

**Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas**

Departamento de Química Orgánica
Instituto de Investigaciones en Físicoquímica
de Córdoba (INFIQC), CONICET

Tesis doctoral

***Estrategias analíticas basadas en sensores
moleculares para la detección de nanomateriales
sintéticos***

Bioq. María Andrea Molina Torres

Directora: Prof. Dra. Natalia L. Pacioni

2020

Esta tesis ha sido presentada para optar al grado de DOCTOR en
Ciencias Químicas ante la siguiente comisión evaluadora:

Dra. Alicia V. Veglia

Dra. Marcela R. Longhi

Dra. Marcela C. Rodríguez

Evaluador Externo: **Dra. Liliana Fernández**

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a las instituciones que hicieron posible que pudiera realizar esta tesis doctoral; entre ellas a CONICET por otorgarme la beca doctoral, y a la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas por la excelente formación académica y profesional que favorece el crecimiento del interés de los egresados de todo el país por la investigación y el crecimiento de la ciencia en Argentina.

Agradecer principalmente a la Dras Alicia Veglia, Marcela Longhi y Marcela Rodríguez que me acompañaron a lo largo de estos años, me aconsejaron y guiaron en cada reunión y en la revisión de esta tesis doctoral. También a la Dra. Liliana Fernández, por dedicar parte de su tiempo a la revisión y evaluación de esta tesis.

A continuación, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que estuvieron presentes y me brindaron su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera, tanto de manera profesional como personal.

A mi directora de tesis, Nati; que a lo largo de estos años me enseñaste a través del ejemplo, la paciencia y la humildad, me ayudaste a crecer como persona y como profesional y me guiaste en este camino; nuevo para ambas. Gracias por todo el trabajo y esfuerzo; por confiar en mi a pesar de las circunstancias y por ser la mejor guía en esta etapa.

A todo el grupo de Química Analítica, ya que entre todos logramos formar una familia y no sólo un grupo de trabajo. Gracias a Alicia por sus consejos e interés en el trabajo diario; a Hugo por compartir toda esta experiencia conmigo desde el inicio, por tu ayuda y apoyo en los

momentos felices y sobre todo en los más difíciles; a Guada, Rodri, Johannes, Noe, David, Ariel, Santi, Guille, y todos los que pasaron por este grupo a lo largo de los años; conservo las interesantes conversaciones, los momentos de esparcimiento y el increíble compañerismo que logramos forjar. También a todos mis amigos del Departamento de Química Orgánica, a Erica, Martín, Jhon, Vir y Cata, por todos los momentos compartidos.

A mis amigos que quedaron en La Rioja; Ale, Ram y Yoyi; les agradezco las charlas, las salidas y el apoyo incondicional; los extraño y los quiero demasiado.

A mis amigas de Córdoba; Nati, Diana y Cami, gracias por ayudarme, cada una de diferente manera, a seguir adelante en los momentos complicados, por escucharme y aconsejarme desde el cariño y la preocupación.

A mi familia; a mi madre Vilma, que me apoyó incondicionalmente en todo lo que me propuse, en todas mis decisiones y que estuvo ahí para acompañarme también en todas mis equivocaciones, siempre desde el amor y el cariño. A mi padre Carlos y a mis hermanas, Cecilia (Chechu), Sofia (Sopa) y Lucia (Lubri); por su cariño y apoyo en las buenas y en las malas. Las quiero a todas y las extraño todos los días.

A Carlos, a pesar de la distancia, me ayudaste a ser mejor persona, me ayudaste a crecer, a comprender lo que significa el amor y me salvaste de infinitas formas. Gracias por ser mi amigo y compañero en toda esta etapa. Te amo y te extraño todo el tiempo.

Finalmente, gracias a Jehová Dios; por mostrarme su misericordia, amor leal y liberarme de todas las cargas de este mundo. Sin ti Jehová, nada de esto sería posible.

CONTENIDO

RESUMEN	XIII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 MARCO TEÓRICO	1
1.2 NANOMATERIALES	4
1.2.1 TIPOS DE NANOMATERIALES.....	7
1.2.1.1 Clasificación en función de su composición.....	7
<i>Nanomateriales inorgánicos</i>	7
1.2.1.2 Clasificación en función de su morfología.....	10
1.2.2 PROPIEDADES DE LOS NANOMATERIALES.....	11
1.2.2.1 Propiedades Ópticas.....	12
<i>Factores que influyen en la resonancia de plasmones superficiales</i>	14
1.2.3 SÍNTESIS DE NANOMATERIALES.....	18
1.2.3.1 Reducción Química.....	19
<i>Reducción por el anión citrato</i>	20
<i>Reducción por borohidruro de sodio</i>	21
<i>Reducción por ácido gálico</i>	23
1.2.3.2 Efecto de surfactantes en la síntesis de nanopartículas metálicas.....	24
1.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS	27
1.3.1 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.....	28
1.3.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	30
1.3.2.1 Espectroscopia UV-visible.....	30
1.3.2.2 Espectroscopia Vibracional.....	31
1.3.3 TÉCNICAS DE DISPERSIÓN.....	33

1.3.3.1	Dispersión dinámica de luz.....	33
1.3.3.2	Potencial Zeta (ζ).....	34
1.3.4	ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	35
1.3.5	TÉCNICAS DE ANÁLISIS TÉRMICOS.....	36
1.4	APLICACIONES DE LAS MNP.....	36
1.5	DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	39
1.6	BIBLIOGRAFÍA.....	45
 CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		59
2.1	PROBLEMÁTICA.....	59
2.2	HIPÓTESIS.....	62
2.3	OBJETIVOS.....	63
2.3.1	OBJETIVO GENERAL.....	63
2.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
2.4	ORGANIZACIÓN DE RESULTADOS.....	63
2.5	BIBLIOGRAFÍA.....	64
 CAPÍTULO III: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON UN SURFACTANTE GÉMINI.....		67
3.1	ANTECEDENTES.....	67
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
3.3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	71
3.3.1	Reactivos.....	71
3.3.2	Instrumentos.....	71
3.3.3	Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC.....	72
3.3.4	Caracterización de las nanopartículas.....	73
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
3.4.1	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRESENCIA DE SDDC.....	73
3.4.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTICULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON SDDC.....	74
3.4.2.1	Morfología y caracterización espectroscópica de las nanopartículas.....	74

3.4.2.2 Estudio de la funcionalización de nanopartículas de plata por SDDC.....	78
<i>Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier</i>	78
<i>Análisis Termogravimétrico</i>	79
<i>Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X</i>	82
<i>Espectroscopia Raman y Espectroscopia Raman intensificada por la superficie</i>	84
3.5 CONCLUSIONES PARCIALES	86
3.6 BIBLIOGRAFÍA	86
CAPÍTULO IV: NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON SDDC COMO CATALIZADORES	91
4.1 NANOPARTÍCULAS COMO CATALIZADORES	91
4.1.1 CATÁLISIS EN LA REDUCCIÓN DE 4-NITROFENOL.....	92
4.1.2 AUTOCATÁLISIS EN EL CRECIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS MEDIADO POR SEMILLAS.....	94
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	96
4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	96
4.3.1 Reactivos.....	96
4.3.2 Síntesis de semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con citrato.....	97
4.3.3 Actividad catalítica de las nanopartículas.....	97
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
4.4.1 REDUCCIÓN DE 4-NITROFENOLATO.....	97
4.4.1.1 Análisis del perfil cinético de la reducción de 4-nitrofenolato.....	99
4.4.1.2 Determinación de la constante de velocidad aparente.....	100
4.4.1.3 Comparación de la actividad catalítica de las nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC con otras nanopartículas de plata similares.....	102
4.4.1.4 Evaluación de la <i>performance</i> del catalizador en reacciones consecutivas....	104
4.4.2 CRECIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EMPLEANDO SEMILLAS.....	106
4.4.2.1 Semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con citrato.....	107
4.4.2.2 Semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC.....	109
4.5 CONCLUSIONES PARCIALES	113

4.6 BIBLIOGRAFÍA.....	114
CAPÍTULO V: EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SONDAS MOLECULARES CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	119
5.1 INTERRUPTORES MOLECULARES.....	119
5.1.1 COMPUESTOS AZO.....	120
5.2 SONDAS FLUORESCENTES.....	123
5.2.1 RODAMINAS.....	124
5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	126
5.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	126
5.4.1 Reactivos.....	126
5.4.2 Instrumentos.....	126
5.4.3 Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido gálico.....	127
5.4.4 Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con citrato.....	127
5.4.5 Soluciones de Para Red empleadas en espectroscopía UV-visible.....	127
5.4.6 Fluorescencia de rodamina 6G o rodamina B con nanopartículas metálicas.....	128
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	128
5.5.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	128
5.5.2 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PARA RED.....	130
5.5.2.1 Espectros de absorción UV-visible de Para Red y determinación de su absortividad molar.....	130
5.5.2.2 Efectos de la relación etanol/agua en el espectro de absorción de Para Red.....	131
5.5.2.3 Efectos del pH en la absorción UV-visible de Para Red.....	132
5.5.3 INTERACCIÓN DE PARA RED CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	133
5.5.3.1 Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido gálico.....	134
5.5.3.2 Nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC.....	136
5.5.4 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE RODAMINA 6G Y RODAMINA B.....	137
5.5.5 INTERACCIÓN DE RODAMINAS CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	138
5.6 CONCLUSIONES PARCIALES.....	145

5.7 BIBLIOGRAFÍA.....	145
CAPÍTULO VI: DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EMPLEANDO RODAMINAS.....	151
6.1 INTRODUCCIÓN.....	151
6.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	152
6.2.1 LÍMITE DE DETECCIÓN.....	152
6.2.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	155
6.2.3 EXACTITUD.....	155
6.2.3.1 Ensayos de recuperación.....	156
6.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	158
6.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	158
6.4.1 Soluciones de nanopartículas con agua de red y de río.....	158
6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	159
6.5.1 LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN.....	159
6.5.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.....	161
6.5.3 SELECTIVIDAD.....	163
6.5.4 APLICABILIDAD DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES.....	164
6.5.4.1 Nanopartículas de oro funcionalizadas con citrato.....	165
6.5.4.2 Nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC.....	168
6.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....	169
6.6 BIBLIOGRAFÍA.....	169
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES GENERALES.....	175
7.1 PERSPECTIVAS.....	176
7.2 BIBLIOGRAFÍA.....	177
ANEXOS.....	179
A. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	179
A.1 BIBLIOGRAFÍA.....	181
B. CONCEPTOS BÁSICOS DE FLUORESCENCIA.....	183

Contenido

B.1 NATURALEZA DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA.....	183
B.2 <i>QUENCHING</i> DE FLUORESCENCIA.....	185
B.3 BIBLIOGRAFÍA.....	187
C. CONCEPTOS BÁSICOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	189
C.1 PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	189
C.1.1 Calibración y linealidad.....	190
C.2 BIBLIOGRAFÍA.....	193

RESUMEN

La necesidad de generar estrategias analíticas sensibles, simples y económicas para la determinación de nanopartículas metálicas sintéticas, principalmente de oro y de plata, motivó el desarrollo de esta tesis durante los últimos cinco años. Particularmente, nos enfocamos en el estudio de las interacciones que se establecen entre las nanopartículas metálicas y algunos sensores moleculares. Por ejemplo, en función de la distancia entre una sonda fluorescente y una nanopartícula metálica, es posible modular la emisión de fluorescencia de la sonda y, en consecuencia, existe la posibilidad de desarrollar un método analítico para la detección y cuantificación de estas nanopartículas.

Este trabajo de tesis se presenta de la siguiente manera:

En el **capítulo I**, se introducen los conceptos más importantes para una mejor comprensión de los resultados. En primer lugar, se presenta la problemática de los nanomateriales como contaminantes emergentes. Luego, se describe la naturaleza, las propiedades de los nanomateriales focalizando en nanopartículas metálicas, y las estrategias sintéticas más relevantes. Posteriormente, se presentan las metodologías que con mayor frecuencia se emplean para su caracterización, y las aplicaciones de los nanomateriales en diferentes áreas. Por último, se describe cómo las nanopartículas metálicas se consideran analitos especiales y los principales métodos para su detección y cuantificación.

En el **capítulo II**, se efectúa un análisis más profundo de la problemática de los nanomateriales en el medio ambiente y cómo pueden ejercer toxicidad sobre diversos organismos. Luego, se sientan las bases sobre las que se llevó a cabo esta tesis doctoral, planteando la estrategia propuesta para la detección y cuantificación de nanopartículas

metálicas empleando sensores moleculares y el estudio de un surfactante gémuni para la síntesis de nanopartículas con propiedades diferentes y novedosas. Finalmente, se plantean los objetivos de este trabajo de tesis y la organización de los resultados obtenidos.

En el **capítulo III**, se estudia el rol de un surfactante gémuni aniónico en la síntesis de nanopartículas de plata. Se realiza la caracterización de este nuevo nanomaterial evaluando su estabilidad y la funcionalización utilizando didecamido cistina de sodio como ligando de las nanopartículas metálicas por diversas técnicas que incluyen, la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X, espectroscopia infrarroja y espectroscopia Raman intensificada por la superficie.

En el **capítulo IV**, se evalúan las propiedades catalíticas de las nanopartículas estabilizadas con el surfactante gémuni aniónico utilizando una reacción modelo que involucra la reducción de un compuesto orgánico y, además, mediante la formación de nuevas partículas en soluciones de crecimiento que contienen el surfactante.

En el **capítulo V**, se describe la interacción entre un compuesto azo con nanopartículas de plata de diferentes tamaños y ligandos mediante espectroscopia UV-visible; y se estudia la influencia del tautomerismo azo-hidrazona que presenta este compuesto. A su vez, se evalúa cómo las nanopartículas metálicas de oro y plata generan la desactivación de la emisión de fluorescencia de sondas fluorescentes de la familia de las rodaminas.

En el **capítulo VI**, se propone un método espectrofluorimétrico basado en la desactivación de la fluorescencia de rodamina B y rodamina 6G como método analítico para la detección y cuantificación de nanopartículas de oro y de plata. Se presentan los principales parámetros analíticos de validación y la aplicación del método al análisis de las nanopartículas estudiadas en muestras reales de agua de red domiciliaria y agua de río.

En el **capítulo VII**, se presentan las conclusiones más importantes del presente trabajo de tesis, con relación a los objetivos planteados inicialmente.

En los **anexos A, B y C**, se describen algunos detalles para la estimación de la concentración de nanopartículas metálicas empleando un algoritmo denominado NANOpoLC, conceptos básicos de fluorescencia y de validación de métodos analíticos, respectivamente.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 MARCO TEÓRICO

Las **Nanociencias** son el estudio de las propiedades y los fenómenos de los materiales en función de sus dimensiones. La Organización Internacional de Estandarización (International Organization for Standardization - ISO) definió a los nanomateriales (NM) como aquellos que miden al menos en una dimensión de 1 a 100 nm y que exhiben propiedades, funcionalidad y fenómenos notables que son consecuencia de su tamaño [1,2]. Los nanomateriales han sido sintetizados y empleados por los seres humanos por cientos de años. El primer estudio científico relacionado a los NM fue publicado en 1857 por Michael Faraday, donde reportó la síntesis de una solución coloidal de nanopartículas de oro (AuNP) a las que llamó "oro activado" empleando como agente reductor fósforo. En esta publicación, Faraday expresó: *"el oro es reducido a partículas extremadamente finas, que al difundir, producen un fluido rojo rubí... varias preparaciones de oro, sean rojo rubí, verde, violeta, o azul... consisten en un estado metálico dividido o particionado de esa sustancia"* [3]. Si bien, la existencia de nanomateriales se remonta de épocas más antiguas, recién con el advenimiento de tecnologías más avanzadas se ha permitido identificar a ciertos materiales como materiales nanoestructurados. Por ejemplo, ahora es conocido que el intenso color rojo rubí de algunos vitrales se debe a nanopartículas de oro y de plata atrapadas en la matriz del cristal [4]. Estos avances fueron posibles gracias al desarrollo de técnicas avanzadas de análisis que impulsaron la identificación y caracterización de los

nanomateriales, que incluyen las técnicas microscópicas como por ejemplo: el microscopio de efecto túnel (STM), el microscopio electrónico de transmisión (TEM) o el microscopio de fuerza atómica (AFM), entre otros [4,5].

De esta manera, el desarrollo tecnológico fomentó la manipulación, el control y la integración de átomos y moléculas para crear materiales, estructuras, componentes, dispositivos y sistemas en la nanoescala con un objetivo industrial y comercial. Esto dio lugar a la **nanotecnología** [1] y al reciente incremento en la producción y empleo de NM alrededor del mundo; lo que ha fomentado a que esta época sea llamada “*Nano Era*” [3]. Este hecho nos lleva a preguntarnos ¿por qué la producción, el empleo y el estudio de los nanomateriales ha ganado tanta importancia en estos últimos años? Si las dimensiones de los materiales se encuentran en la nanoescala, ¿este pequeño tamaño hace la diferencia? Sorprendentemente, la respuesta a esta pregunta es un enfático SI. Las modificaciones en las propiedades de los materiales en función de sus dimensiones nanométricas son inmensas, y en muchos casos, las propiedades resultantes son superiores a las de los materiales convencionales. Esto los convierte en excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas, electrónicas, ópticas y catalíticas, entre otras [6,7].

En la actualidad, el desarrollo de nuevos NM y su aplicación ha favorecido la elaboración de una gran variedad de productos que los contienen. Un proyecto sobre nanotecnología llamado PEN (*Project on Emerging Nanotechnologies* [8]) realizó un inventario de productos disponibles en el mercado que contienen nanomateriales. Por ejemplo, el 60% de las nanopartículas metálicas adicionadas a estos productos son de plata (figura 1.1A). A su vez, se evidencia un claro crecimiento en la cantidad de productos que poseen nanopartículas de plata, principalmente en el área de salud y cuidado personal, entre 2006 y 2019 (figura 1.1B) [8]. De esta manera, el incremento en la utilización de NM inevitablemente genera incrementos en la producción de sus desechos al medioambiente, particularmente en ambientes acuáticos [9]. Sin embargo, debido a que aún no se conocen los potenciales efectos que podrían generar a la salud humana, animal o al medio ambiente, a estos materiales se los clasifica como **contaminantes emergentes** [10]. Actualmente, las investigaciones científicas se han concentrado en evaluar las propiedades toxicológicas de un gran espectro de NM buscando el posible riesgo que podrían tener sobre la salud humana. No obstante, el potencial impacto de los NM en el medio ambiente todavía carece de la suficiente atención. El ambiente acuático actúa como sumidero de todos los contaminantes desechados, y debido a que la cantidad de NM prevalece en los mismos, es sumamente importante evaluar su riesgo potencial para la vida acuática [9].

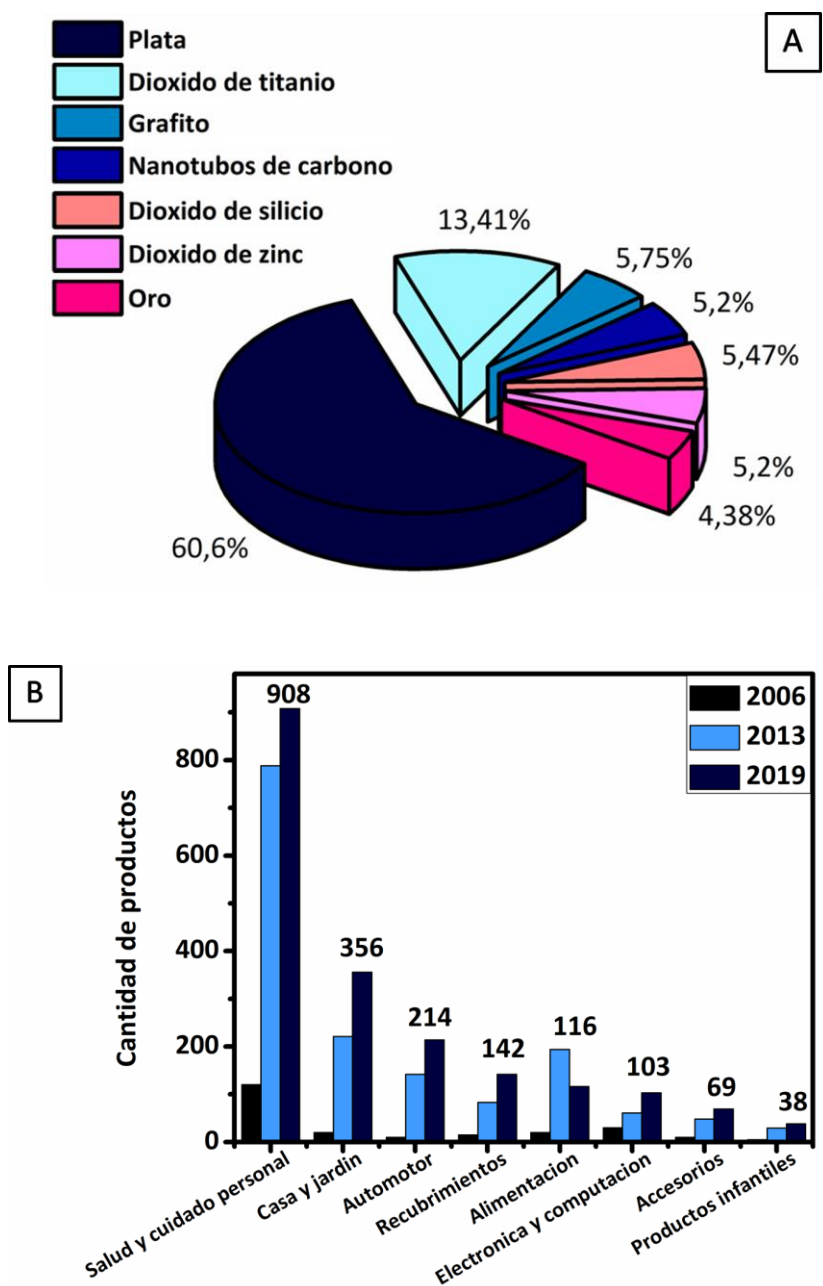


Figura 1.1. Representación de la cantidad de productos disponibles en el mercado que poseen nanopartículas metálicas clasificados de acuerdo a su naturaleza (A) y de la utilización de AgNP en diferentes áreas (B). Fuente: Ref. [8].

En general, el problema que existe en el estudio de los nanomateriales es su comportamiento impredecible. En este contexto, la determinación de NM en el medio ambiente es un factor crucial y para ello es necesario el desarrollo de metodologías robustas para la caracterización y cuantificación de NM en matrices ambientales [11]. De esta manera, la interrelación de las nanociencias con otras áreas científicas, especialmente con la química analítica, favoreció el

estudio de los NM y permitió el desarrollo de numerosas técnicas que permiten aislar, manipular, caracterizar y cuantificar nanomateriales de diferente naturaleza [11].

La **Química Analítica** es un área de la ciencia que se enfoca principalmente en la detección, cuantificación y determinación de la composición y naturaleza de un *analito* mediante la utilización de diversas moléculas simples y/o de instrumentos electrónicos capaces de transformar la información química en una señal de utilidad analítica [12]. Esta área juega un rol crucial en diversos campos de la ciencia y la sociedad, participando en el diseño de materiales y protocolos sustentables de síntesis, desarrollo de productos farmacéuticos y el estudio de sistemas biológicos complejos al proporcionar un abanico de técnicas que lo hacen posible [13]. En el caso de los NM, actualmente se disponen de distintas metodologías de fraccionamiento, extracción y separación de los mismos, entre las que podemos mencionar la ultrafiltración (UF), la extracción de punto nube (CPE) o la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Finalmente, la cuantificación se realiza principalmente empleando técnicas ópticas atómicas, siendo algunas de ellas la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) o espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) [11]. Si bien el empleo de este conjunto de metodologías permite la cuantificación de NM en el orden de las partes por trillón (ppt), se requiere de instrumentación muy costosa, personal altamente capacitado, es necesaria la digestión previa de la muestra y poseen una baja disponibilidad para el análisis de rutina. De esta manera, se observa que la química analítica avocada a la detección y cuantificación de NM es un campo en vías de desarrollo y aún es necesario el diseño de estrategias que sean capaces de responder a las demandas planteadas, motor de este trabajo de Tesis.

A lo largo de este capítulo se introducirán diferentes tipos de nanomateriales, específicamente nanopartículas metálicas. También se mencionarán sus propiedades, síntesis, caracterización, clasificación y se describirán las metodologías más empleadas para la detección y cuantificación de las mismas.

1.2 NANOMATERIALES

El término “nano” deriva de la palabra griega “*enano*”. Un nanómetro (nm) es simplemente la billonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). A fines comparativos, la relación de tamaño entre el planeta tierra y una pelota de fútbol es aproximadamente la misma que entre una pelota de fútbol y una esfera compuesta por 60 átomos de carbono conocida como fullereno C-60 (figura

1.2). La tierra mide aproximadamente 100 millones de veces más que una pelota de fútbol, de la misma forma, una pelota de fútbol mide aproximadamente 100 millones de veces más que el fullereno [14].

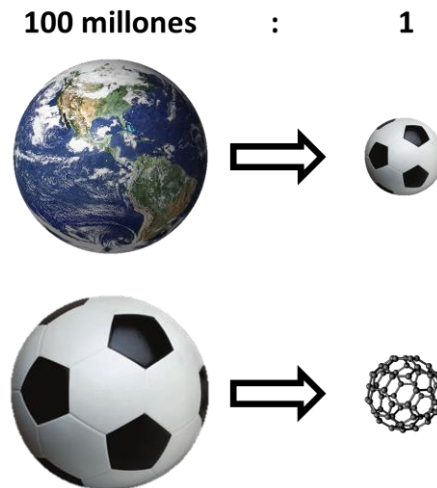


Figura 1.2. Esquematación de la comparación de los tamaños del planeta Tierra con una pelota de fútbol, y de ésta con el fullereno C-60.

Este ejemplo nos brinda una perspectiva de lo que implica la manipulación de materiales en la nanoescala. De esta manera, es importante preguntarnos ¿cómo definiríamos la nanoescala? La definición más aceptada de la **nanoescala** corresponde al rango entre 1 y 100 nm [15]. En este sentido, los materiales de dimensiones menores a una micra pero mayores a un nanómetro, al menos en una dimensión, se consideran materiales en la nanoescala [1]. Existen varios ejemplos que permiten visualizar esta escala y en la figura 1.3 se presentan algunos de ellos. Por ejemplo, un cabello humano mide aproximadamente 100.000 nm (0,01 cm) de diámetro mientras que un glóbulo rojo mide alrededor de 7.000 nm de diámetro. Incluso a esta escala se hallan organismos tan pequeños como los virus más comunes, como el virus del herpes o de la influenza (45 a 200 nm); y en la escala atómica, la longitud de enlace entre átomos de carbono se encuentra en el orden de 0,12 – 0,15 nm.

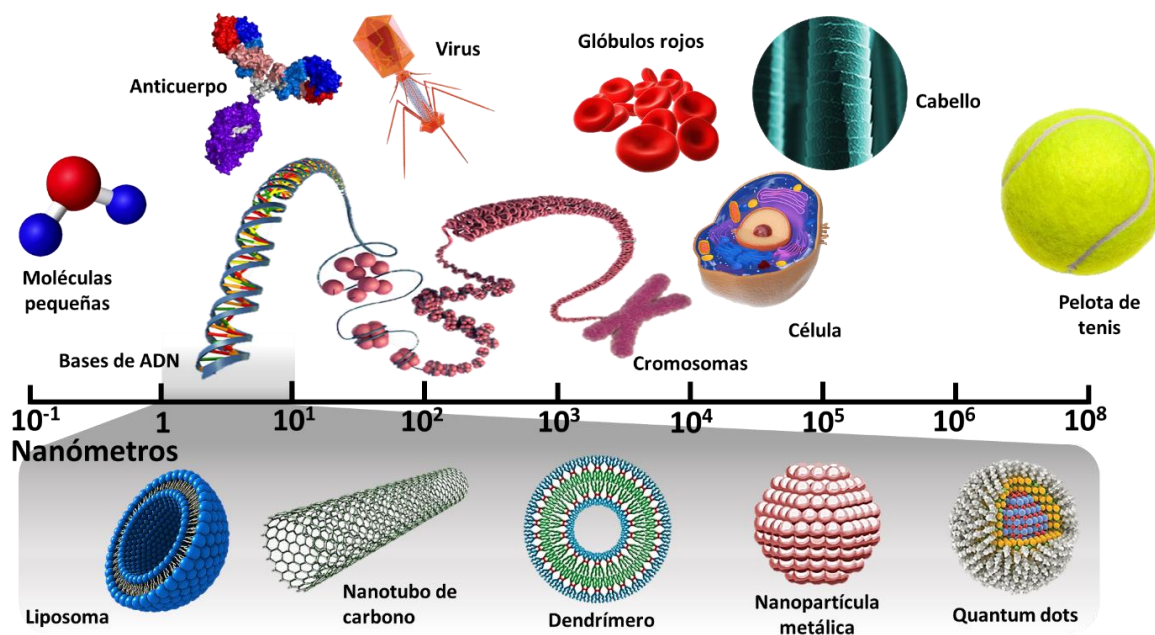


Figura 1.3. Representación de la escala nanométrica. Los nanomateriales se encuentran entre 1-100 nm; aproximadamente 10 millones de veces menos que una pelota de tenis.

Como ya se mencionó, en esta escala se encuentran los **nanomateriales**, aquellos materiales que exhiben propiedades únicas a consecuencia de su tamaño [1]. A lo largo de la historia, el hombre ha empleado diferentes tipos de nanomateriales. Sus usos se remontan a la medicina tradicional china y maya, y a las pinturas italianas medievales. Un ejemplo notable de esto es la magnífica copa de Licurgo que data del siglo V. Cuando se ilumina desde afuera, la copa se observa de color verde (figura 1.4A); mientras que, al ser iluminada desde adentro, la misma se torna rojo carmesí, excepto por el rey, que se observa púrpura (figura 1.4B). Este fenómeno fue explicado recién en 1990 gracias al análisis de la copa en un microscopio electrónico de barrido (SEM). Se descubrió que se apreciaba ese dicroísmo espléndido debido a la presencia de nanopartículas de plata, oro y cobre embebidas en la matriz del cristal [1]. De esta manera, el avance de la tecnología ha permitido la caracterización de una amplia variedad de nanomateriales. En la figura 1.3 se incluyen algunos ejemplos de diferentes tipos de nanomateriales, entre los que se encuentran las nanopartículas metálicas (MNP), *quantum dots* (QDs) o puntos cuánticos, materiales basados en carbono como los nanotubos de carbono (CNTs), nanomateriales orgánicos como los dendrímeros o liposomas, entre otros. Cada uno de estos materiales poseen formas, tamaños y propiedades

únicas que las diferencian de sus análogos de mayor tamaño y que permiten su aplicación en una inmensa cantidad de áreas.

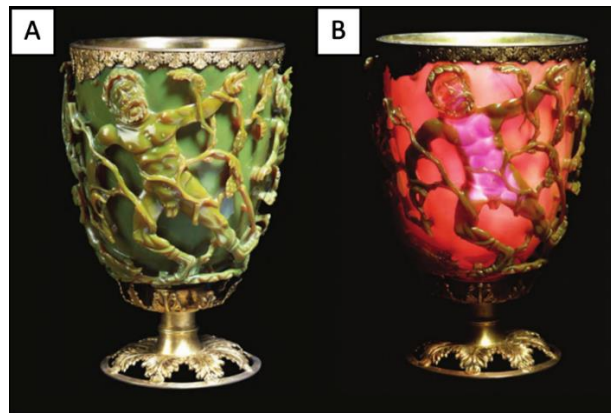


Figura 1.4. *Copa de Licurgo iluminada desde afuera (A), de color verde; y desde adentro (B), de color rojo carmesí y púrpura.*

1.2.1 TIPOS DE NANOMATERIALES

Los nanomateriales poseen diferentes formas, tamaños, estructuras y naturaleza. La mayoría de ellos puede ser clasificado en función de su morfología o de su composición.

1.2.1.1 Clasificación en función de su composición

De acuerdo a su composición, podemos clasificar a los nanomateriales en 4 grandes grupos: inorgánicos, orgánicos, basados en carbono, orgánicos, y otros nanomateriales semiconductores como los QDs. En esta sección se desarrollarán los aspectos más relevantes de los nanomateriales inorgánicos.

Nanomateriales inorgánicos

En esta categoría se encuentran aquellos NM formados por metales u óxidos de metales. Se han sintetizado nanopartículas de diferentes metales: aluminio, cobre, cobalto, cadmio, plomo, hierro, zinc, entre otras [16]. Sin embargo, las nanopartículas de metales nobles, específicamente de oro (Au) y plata (Ag), son de las MNP más estudiadas.

Las nanopartículas inorgánicas poseen propiedades únicas, como una gran área superficial, densidad superficial de carga, pueden ser cilíndricas o esféricas y de estructura cristalina o amorfa [16]. Estos NM poseen múltiples aplicaciones en el transporte de fármacos [17,18], catálisis

[19,20], como sensores ópticos [21,22], en biorremediación [23], paneles solares [24], detección de biomoléculas [25], entre otros.

Por ejemplo, los NM de plata comenzaron a emplearse hace más de 100 años, no obstante, Lea fue el primero que publicó la síntesis de un coloide de plata estabilizado por citrato en 1889, donde obtuvo partículas de 7-9 nm de diámetro promedio [26,27]. En las últimas décadas, la investigación y desarrollo de nanomateriales de plata ha crecido considerablemente. Se ha observado que las **nanopartículas de plata** (AgNP) tienen una actividad antimicrobiana excelente promovida por el contacto cercano entre el núcleo de plata y las paredes celulares bacterianas que desencadena la disrupción de la membrana [11]. A su vez, AgNP de diferentes formas y tamaños exhiben actividad antimicrobiana diferente. Las nanopartículas más pequeñas son más eficientes para eliminar bacterias más largas, probablemente debido a su gran área superficial, lo que les permite adherirse a las membranas celulares e ingresar a la célula más fácilmente [27] y también se observó efecto antibacteriano en partículas cilíndricas y en nanoplatos triangulares [28].

Las AgNP constan de un área superficial extensa que les permite ser excelentes candidatos como catalizadores, principalmente debido a la gran cantidad de sitios reactivos que poseen y su alta energía superficial. Estos nanomateriales han sido utilizados como catalizadores de varias reacciones químicas, por ejemplo, en la oxidación del benceno [29], la reducción de algunos colorantes [30] o de 4-nitrofenol [31]. Una de sus mayores ventajas es la posibilidad de modificar las propiedades de la nanopartícula al cambiar los grupos funcionales de la superficie o al emplear materiales de soporte en su diseño, lo que permite conseguir catalizadores más eficientes y duraderos [27].

Por otra parte, las AgNP se han utilizado ampliamente en la espectroscopía de dispersión Raman incrementada por la superficie (*Surface Enhance Raman Scattering* – SERS). Esta metodología está basada en la amplificación de los espectros vibracionales de moléculas cercanas a superficies metálicas nanoestructuradas. Algunas AgNP son capaces de generar incrementos de las señales observadas en el orden de 10^{14} - 10^{15} , lo que permitiría la detección de cantidades muy pequeñas de la molécula de interés [27]. Estas propiedades ópticas permiten emplear las AgNP como sensores para la detección de diversos compuestos [32–34]. Debido a sus aplicaciones, el estudio de las AgNP ha desarrollado un crecimiento más rápido y amplio en comparación con otros nanomateriales [11].

Por otra parte, en las últimas décadas, las **nanopartículas de oro** (AuNP) también se han convertido en el objeto de estudio en una amplia gama de investigaciones. Estas nanopartículas metálicas se han considerado tan atractivas para una inmensa variedad de aplicaciones debido a tres razones principales [35–37]:

- ✓ su elevada estabilidad química y física, lo que involucra la biocompatibilidad intrínseca de las AuNP,
- ✓ funcionalización de la superficie muy simple con moléculas orgánicas o biológicas, y
- ✓ electrones de conducción superficiales polarizables que le brindan múltiples propiedades ópticas.

Es por ello que ha crecido el interés del área biomédica en estas nanopartículas con el objetivo de ser utilizadas como sensores [38], en imágenes celulares [39], transporte de fármacos [40,41] y terapias contra el cáncer [42]. En este último campo, se han empleado AuNP en terapias fototérmicas que se basan en generar calor para dañar o destruir las células y el tejido cancerígeno [43]. Las ventajas de emplear AuNP incluyen la posibilidad de limitar la terapia al área donde se encuentran las nanopartículas y de alcanzar temperaturas de cientos de grados sobre la temperatura fisiológica del organismo en una escala de tiempo relativamente corto [43]. De esta manera, las terapias fototérmicas son selectivas para tejidos tumorales protegiendo al tejido sano y reduciendo los efectos negativos de las terapias tradicionales [44]. El primer ejemplo del uso de AuNP en terapia fototérmica del cáncer fue publicado en 2003 por West y sus colaboradores [44]. La investigación consistió en emplear nanopartículas conformadas por un corazón (*core*) de sílica de 110 nm rodeado de una corteza (*shell*) de AuNP de 10 nm y funcionalizadas con un polímero biocompatible (polietilenglicol, PEG) encargado de minimizar la agregación de las MNP e incrementar su vida media y la circulación en sangre. Al ser inyectadas en el tumor e irradiadas a 820 nm (radiación NIR), se alcanzó una temperatura promedio de 37,4° C en el sitio del tumor comparada a los 9° C que se alcanzaban empleando únicamente el láser, generando daño en el tejido tumoral, coagulación y contracción celular [44]. A partir de esto, se han desarrollado AuNP de diferentes tamaños y formas con el objetivo de ser aplicadas en terapia fototérmica y en diferentes estrategias para combatir el cáncer [42,45–48].

Por otra parte, las AuNP también se han empleado en catálisis [20,49], electrónica [50,51] y óptica no lineal [52–54]. En el caso de la catálisis, las AuNPs de tamaños menores a 10 nm han resultado tener actividad catalítica eficiente para varias reacciones químicas; principalmente, gracias a su tamaño nanométrico. El oro masivo suele ser químicamente inerte y posee una baja

quimisorción en la superficie. Sin embargo, la gran fracción de átomos superficiales y la extremadamente alta relación área superficial/volumen de las AuNP les otorgan la capacidad de ser catalizadores muy eficientes que proveen mayores rendimientos, son selectivos y efectivos incluso a menores temperaturas [55]. En la actualidad, los catalizadores basados en AuNP han adquirido gran interés debido a la posibilidad de ser aplicados en diversas reacciones químicas de importancia industrial y ambiental, sumado al bajo costo comparado a la utilización de Pt o Pd [55].

1.2.1.2 **Clasificación en función de su morfología**

Además del tamaño, la forma de los nanomateriales es un factor que gobierna las propiedades del mismo. Tanto la relación de aspecto, como la porosidad y la rugosidad de la superficie cambian la relación superficie-volumen y, por lo tanto, otras propiedades del material. La morfología de los nanomateriales permite su clasificación en base a su dimensionalidad, estructura o relación de aspecto. En la figura 1.5 se esquematizan ejemplos de nanomateriales de diferente morfología y su clasificación.

Los **nanomateriales cero dimensionales (0-D)** incluyen aquellos materiales en donde todas sus dimensiones (x, y, z) se encuentran entre 1 y 100 nm. La mayoría de estos materiales son esféricos, sin embargo, aquellos que son cúbicos o poligonales de dimensiones nanométricas también se encuentran en esta clase. Algunos ejemplos de nanomateriales de este tipo son las nanopartículas de oro y plata, *quantum dots* y *core-shell quantum dots*, esferas huecas, fulerenos, entre otros [56,57].

Los **nanomateriales uni-dimensionales (1 – D)** son aquellos que poseen al menos dos de sus dimensiones (x, y) en la escala nanométrica y la tercera dimensión se encuentra *fuera* de la nanoescala (> 100 nm). Ejemplos de materiales 1 – D son nanoalambres, nanocilindros (de dimensiones mayores a 100 nm) y nanotubos de metales u óxidos de metales, fibras, filamentos, entre otros [56].

Los **nanomateriales bi-dimensionales (2 – D)** son aquellos con una dimensión en la nanoescala, y con dos de sus dimensiones no confinadas a la nanoescala. Los nanomateriales 2 – D exhiben formas similares a láminas. Los materiales más comunes en esta clase son las denominadas nanoláminas, nanoparedes, nanofilms, algunas fibras, nanocapas, etc. El grafeno es un material muy estudiado perteneciente a esta clase; que corresponde a una lámina de grafito formado por

un sistema conjugado de carbonos sp^2 organizados en una estructura similar a la de un panel de abejas [56].

Finalmente, los **nanomateriales tri-dimensionales (3 -D)** son estructuras donde todas sus dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala (> 100 nm). Sin embargo, estos materiales poseen una estructura nanocrystalina o están formados por materiales que están a nanoescala. Pueden estar compuestos por múltiples arreglos de nanocristales, la mayoría en diferentes orientaciones. Estos materiales incluyen aquellos formados por bloques individuales, por ejemplo fulerenitas, esqueletos de fibras o de nanotubos, partículas en una matriz, “nanobrotes” (*nanobuds*) que son combinaciones de nanotubos de carbono y fulerenos unidos covalentemente, entre otros [56].

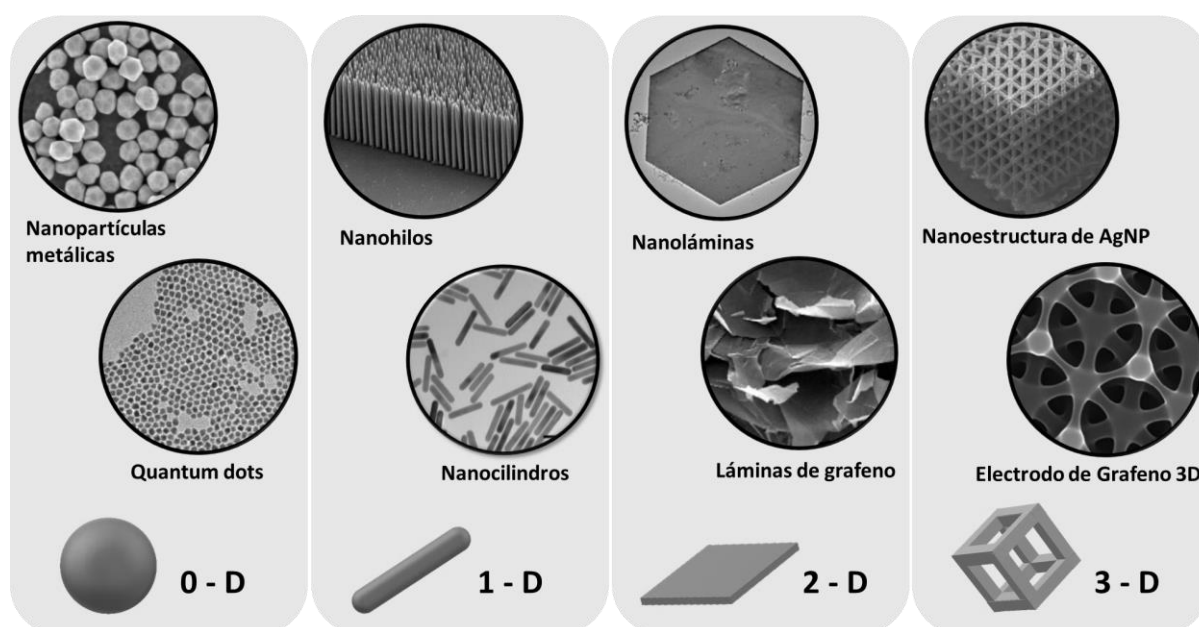


Figura 1.5. Ejemplos de nanomateriales de diferente dimensionalidad.

1.2.2 PROPIEDADES DE LOS NANOMATERIALES

A medida que reducimos el tamaño de un material hasta la nanoescala, sus propiedades cambian abruptamente, y algunas de ellas son excepcionales. Por ejemplo, en la década de 1970, investigadores japoneses descubrieron que metales como cobre o plata que originalmente poseen conductividad eléctrica y térmica, al ser reducidos a la nanoescala, pierden su naturaleza original y se convierten en materiales no conductivos y no térmicos [58]. Sin embargo, aunque las dimensiones del material se encuentren en la escala nanométrica, si estos no presentan

propiedades únicas que los diferencian del material masivo, entonces no se consideran nanomateriales [58].

A continuación, se describirán las propiedades ópticas de los nanomateriales.

1.2.2.1 Propiedades Ópticas

Las propiedades ópticas de los nanomateriales dependen de diversos parámetros, entre los que se encuentran el tamaño, la forma, las características superficiales y otras variables que incluyen el dopaje y la interacción con el ambiente que lo rodea o con otras nanoestructuras. Un ejemplo de esto es el corrimiento al azul del espectro de absorbancia y fotoluminiscencia de nanopartículas semiconductoras con la disminución del tamaño de la partícula [59]. En la figura 1.6 se observa una representación de la variación de los espectros de emisión de fluorescencia de nanopartículas de CdTe o QDs en función del tamaño del nanomaterial. Para semiconductores, el tamaño es un parámetro crítico que afecta las propiedades ópticas.

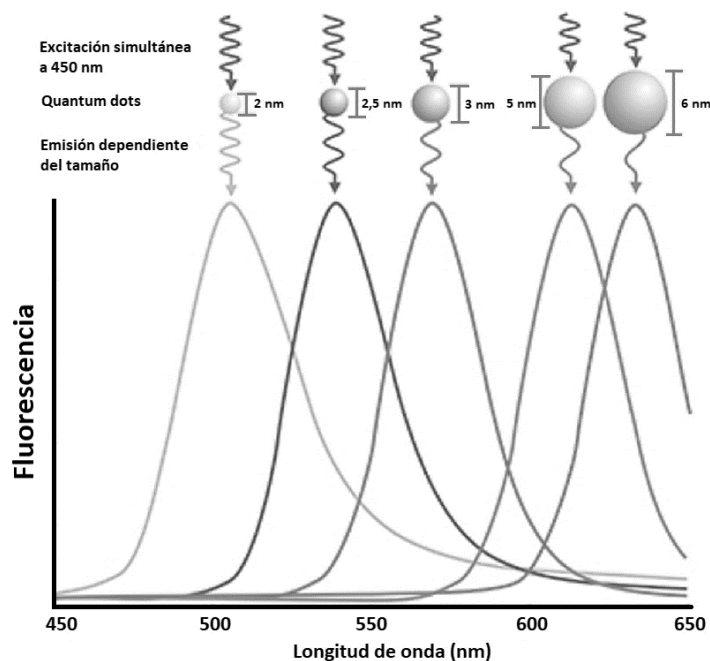


Figura 1.6. Representación de espectros de emisión de fluorescencia de QDs en función de su tamaño. Se observa cómo la disminución en el tamaño del nanomaterial genera un corrimiento al azul de la emisión de fluorescencia. Imagen adaptada de Ref [60].

Las nanopartículas de metales de transición, como Au, Ag y Cu; exhiben una banda de extinción intensa en la región visible, que es un producto del pequeño tamaño de las partículas. Cuando estas nanopartículas interactúan con la luz se produce una oscilación coherente de los

electrones superficiales inducido por el campo magnético incidente. Los modos de oscilación comprenden un campo electromagnético acoplado a las oscilaciones de los electrones superficiales, denominados plasmones de superficie. Cuando las dimensiones del material se reducen, los efectos de contorno y de superficie toman una gran importancia, y por esta razón las propiedades ópticas de pequeñas nanopartículas metálicas están dominadas por la oscilación colectiva de electrones superficiales. Se observa una banda de absorción cuando la frecuencia del fotón incidente es resonante con la oscilación colectiva de electrones y esto se conoce como **Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)**. Este efecto se esquematiza en la figura 1.7. Para algunos metales, por ejemplo Pb, In, Hg, Sn y Cd, las frecuencias del plasmón se encuentran en la región UV del espectro y las nanopartículas no exhiben efectos intensos de color [61].

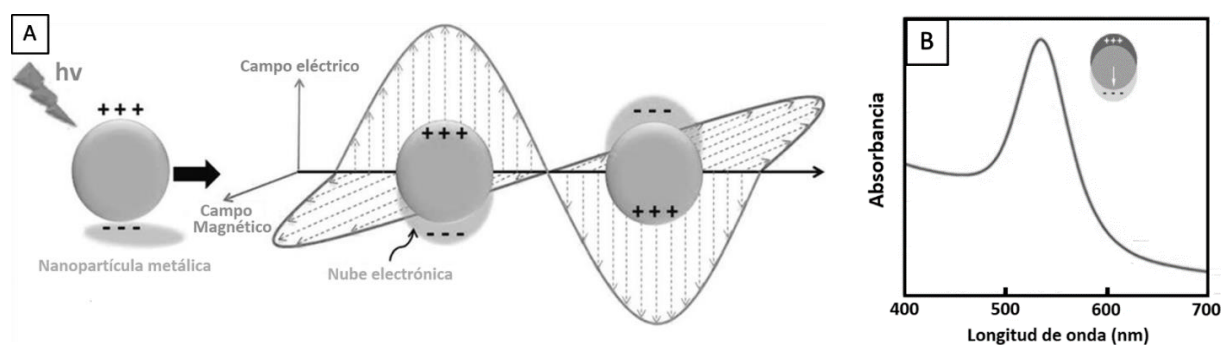


Figura 1.7. Ilustración esquemática de la resonancia de plasmones superficiales de una nanopartícula metálica esférica (A) y del espectro de absorción de la banda SPR (B) en AuNP esféricas.

La banda de extinción del plasmón observada en los espectros de absorción de las dispersiones coloidales de MNP se origina por la suma de los fotones absorbidos y dispersados, en una proporción que depende en gran medida del tamaño de la partícula [62]. Por ejemplo, para AuNP, si el diámetro $d \ll \lambda$; donde λ es la longitud de onda de la radiación electromagnética incidente; la absorción prevalece por sobre la dispersión. Sin embargo, la dispersión y la absorción escalan con la 6ª y 3ª potencia del diámetro de una partícula, respectivamente. Por lo tanto, los efectos se hacen comparables para AuNP de 50 nm y la dispersión prevalece a mayores diámetros [63].

La frecuencia de resonancia de SPR depende fuertemente del tamaño, de la forma, de la interacción entre partículas, de las propiedades dieléctricas y del ambiente local de la nanopartícula [61].

Factores que influyen en la resonancia de los plasmones superficiales

El tamaño de las nanopartículas metálicas influye en la resonancia de plasmones superficiales observada cuando las mismas interactúan con luz. Los efectos generados por el tamaño de las MNP pueden dividirse en dos categorías: efectos extrínsecos e intrínsecos. El **efecto extrínseco** corresponde a un efecto de retardo debido a la excitación de modos multipolares múltiples al incrementar el tamaño de la nanopartícula en relación a la longitud de onda electromagnética. Este efecto es un fenómeno electromagnético que se manifiesta en el espectro de absorción con un ensanchamiento o un desplazamiento al rojo de la banda SPR al incrementar el tamaño de la MNP [63]. El efecto extrínseco predomina en MNP mayores a 60 nm y en el caso de las AuNP, permite variar la longitud de onda de la SPR al incrementar el tamaño de las MNP [62].

Los **efectos intrínsecos** se deben a modificaciones de las constantes ópticas del metal cuando el mismo posee tamaños menores a 30 nm [62]. Las constantes ópticas cambian debido a las contribuciones adicionales de la relajación de electrones libres cuando el tamaño de la partícula se reduce. Específicamente, la dispersión de los electrones libres en la superficie de la partícula ya no es despreciable cuando el camino libre medio (distancia promedio que viaja el electrón antes de ser dispersado) de los electrones de conducción se hace comparable al tamaño de la nanopartícula [62]. En el espectro de absorción, el efecto intrínseco incrementa el decaimiento del SPR y, en consecuencia, disminuye la intensidad de banda SPR al disminuir el tamaño de la MNP. En el caso de las AuNP, es posible lograr una disminución casi completa de la banda del plasmón cuando estas partículas poseen tamaños menores a 2 nm [63]. Los efectos mencionados se ejemplifican en la figura 1.8.

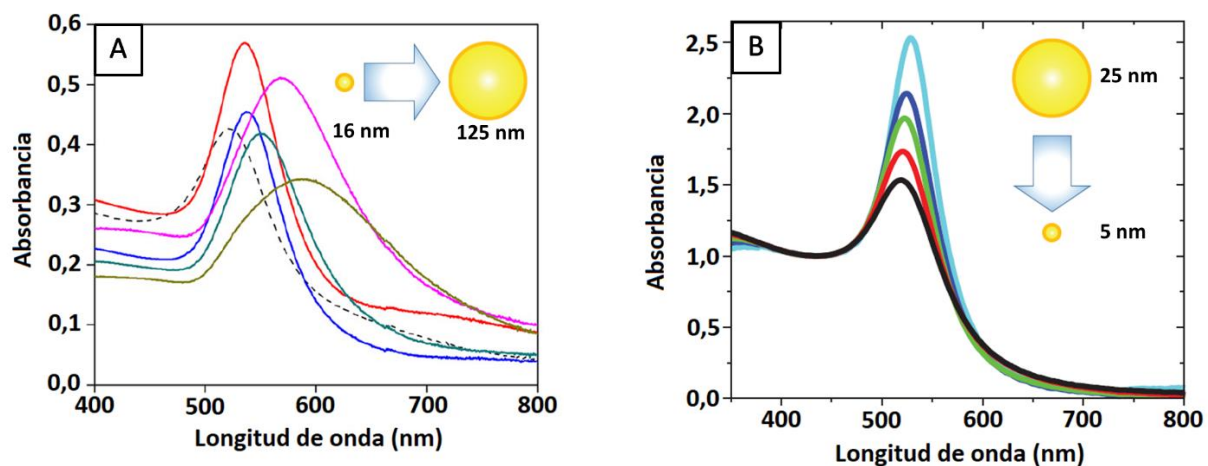


Figura 1.8. Efectos del tamaño de la MNP en la banda SPR. Los efectos extrínsecos generan un corrimiento al rojo y ensanchamiento de la banda SPR, principalmente, en MNP de tamaños mayores a 60 nm (A); mientras que en MNP con tamaños menores a 25 nm se observa una disminución de la banda SPR consecuente a la disminución del tamaño de MNP (B). Imagen adaptada de Ref. [62,64].

El ancho, la posición y el número de bandas de SPR también está influenciado por la forma de las MNP. Las nuevas bandas de SPR que se observan en el espectro de absorción de los nanocilindros tienen la particularidad de aparecer a niveles energéticos menores comparados con la de las esferas [62]. Por ejemplo, AuNP esféricas de tamaños entre 2-50 nm presentan una banda SPR centrada en 520 nm aproximadamente; a diferencia de los nanocilindros de oro (AuNR) que presentan dos bandas de SPR. La primera banda corresponde a la oscilación de electrones transversales, mientras que la segunda banda corresponde a la oscilación de electrones longitudinales [62]; como se observa en la figura 1.9.

La relación de aspecto (RA) entre la longitud y ancho de los nanocilindros también influye en la longitud de onda a la que se observa la banda longitudinal de SPR. Si la RA aumenta se observa un corrimiento batocrómico o hacia el rojo de la banda longitudinal, la cual puede pasar del espectro visible al rango del infrarrojo cercano (NIR) [62]. Esto se ilustra en la figura 1.10, donde se evidencia el desplazamiento de la banda longitudinal con el incremento en la RA de los nanocilindros (figura 1.10B), la variación de colores de la solución de AuNR (figura 1.10A) y la variación en la morfología de las partículas visualizadas por TEM (figura 1.10C). Al disminuir la simetría de las nanoestructuras, se observan nuevos modos de resonancia [63].

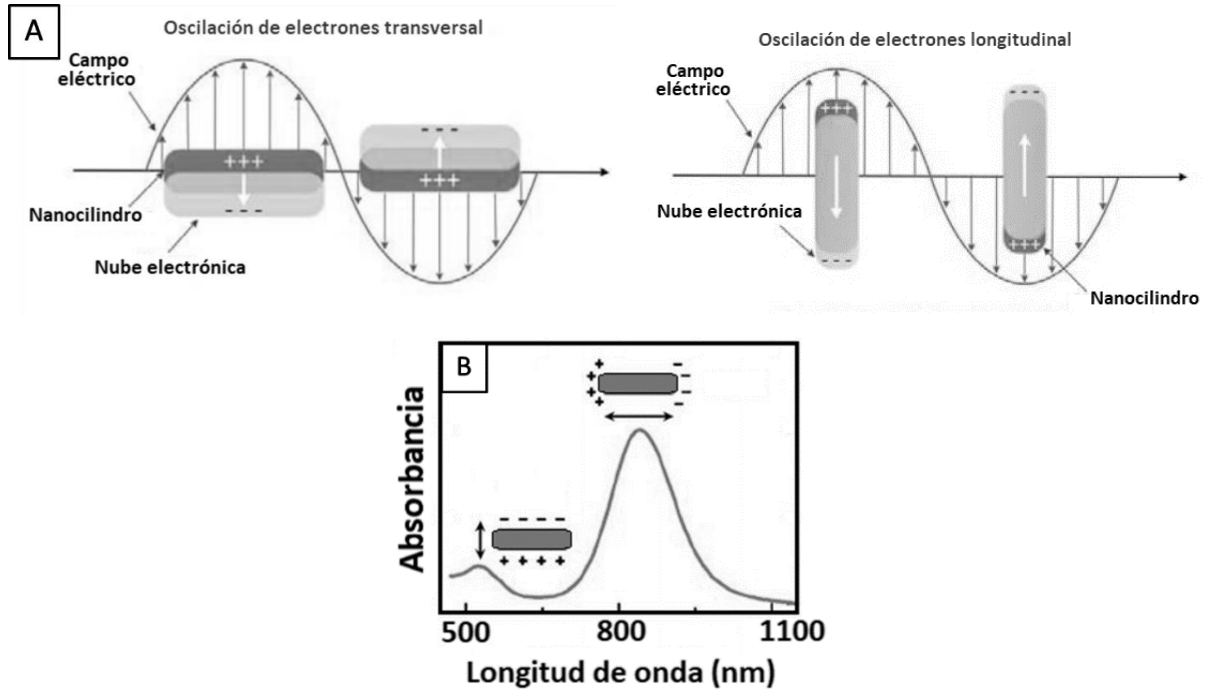


Figura 1.9. Representación esquemática de la oscilación de electrones superficiales transversales y longitudinales (A) y espectro de absorbancia de AuNR con las respectivas bandas SPR (B).

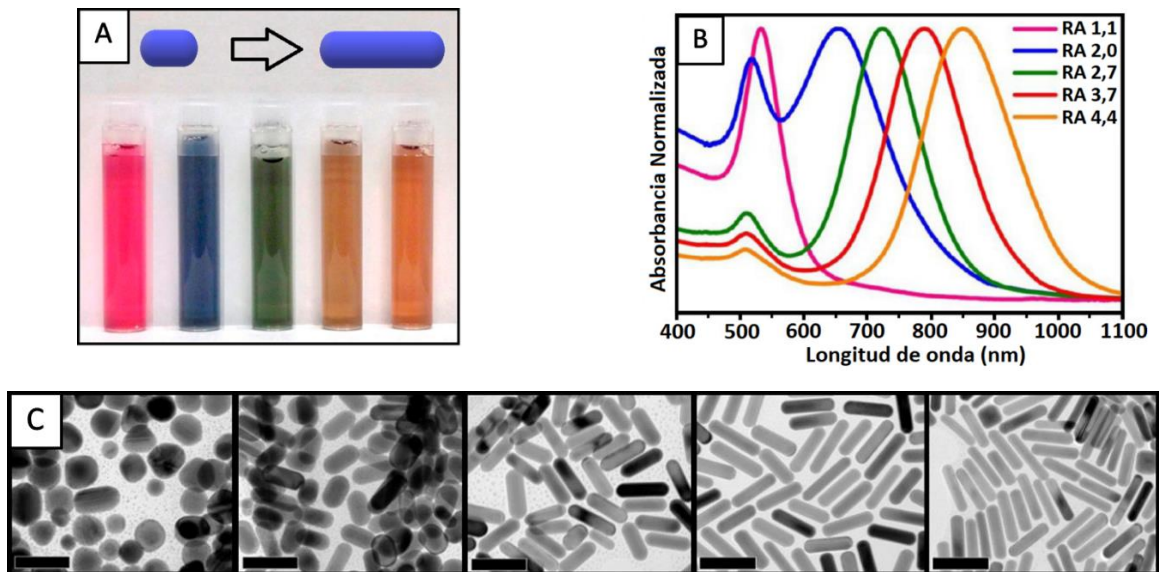


Figura 1.10. Efectos del incremento de la relación de aspecto de AuNR en el color de la solución (A), el desplazamiento de la banda longitudinal SPR en el espectro de absorción UV-visible (B) y la morfología de las partículas (C) observada mediante microscopía TEM. Ref [65].

El ambiente físico-químico en el que se encuentran las nanopartículas también influye en la SPR de diferentes maneras. El principal mecanismo involucrado corresponde al *damping* (amortiguación) de la interfaz química (CID). Este mecanismo consiste en la transferencia directa de energía en forma de electrones “calientes” interfaciales desde un metal a una molécula o

material encontrado en la superficie metálica [66]. El proceso se aplica a la quimisorción, como, por ejemplo, de moléculas unidas a la superficie de las nanopartículas por enlaces tiol; y a la fisisorción, como en el caso de nanopartículas estabilizadas por citrato. El CID genera un ensanchamiento y un desplazamiento al rojo de la banda SPR cuando un adsorbato se encuentra unido a la superficie de la nanopartícula [63]. Este efecto se debe a las nuevas vías de relajación que ofrece la presencia del adsorbato para los electrones y fonones excitados del metal. Al unirse distintos adsorbatos que poseen diferentes energías en el orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) y localizaciones diferentes, se generan varios acoplamientos con la banda de conducción del metal y originan distintos ensanchamientos de la banda SPR [62].

Por otra parte, las propiedades dieléctricas del medio que rodea la nanopartícula es otro factor a tener en cuenta. El efecto de la función dieléctrica local se basa en el incremento de la polarizabilidad de la partícula y de un desplazamiento al rojo de la banda SPR en los medios que tengan mayor función dieléctrica [67]. Este comportamiento se debe a las cargas inducidas en un medio polarizable cercano a la superficie de la nanopartícula. Estas cargas producen una “fuerza restauradora” sobre los electrones oscilantes que afecta la frecuencia e intensidad de la resonancia del plasmón. A mayores funciones dieléctricas, existe una mayor polarizabilidad del medio y se genera una fuerza restauradora mayor que causa que la frecuencia del plasmón se desplace a energías menores [67,68]. Por ejemplo, en AuNP dispersadas en una matriz homogénea y transparente (solución líquida o matriz polimérica) el incremento en el índice de refracción del medio genera un incremento en la intensidad, corrimiento al rojo e incremento del ancho máximo a media altura (FWHM) [63].

Además, el plasmón de distintas nanopartículas pueden influenciarse de forma recíproca entre ellas en función de la distancia entre partículas, la geometría y la polarización relativa de los fotones [63]. En general, agregados de esferas poseen un nuevo SPR debido a que cuando disminuye la separación de las nanopartículas, los plasmones de partículas individuales comienzan a interactuar y se hibridan con los plasmones de otras partículas [63,69]. En el caso de dímeros, la hibridación del plasmón produce un desplazamiento al rojo de la SPR, efecto que disminuye casi exponencialmente con el aumento en la distancia entre partículas y que es independiente del tamaño de la nanopartícula, de su forma, naturaleza y de la constante dieléctrica del medio [70]. Este efecto se esquematiza en la figura 1.11.

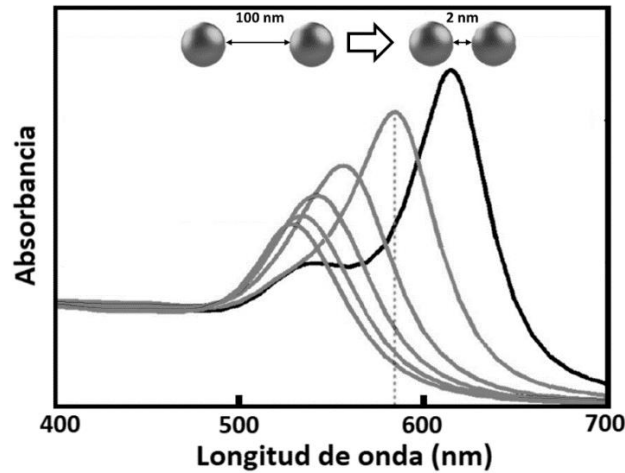


Figura 1.11. Efecto de la distancia entre partículas en el espectro de absorción de AuNP, donde se visualiza el desplazamiento al rojo de la banda SPR. Ref [71].

1.2.3 SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

Los nanomateriales pueden sintetizarse mediante dos procesos generales: *top-down* (de arriba hacia abajo) o *bottom-up* (de abajo hacia arriba). En la figura 1.12 se esquematizan ambos procesos.

Los métodos de síntesis *top-down* comienzan con el material masivo (arriba) que subsecuentemente se reduce generando nanopartículas (abajo) por medio de procesos físicos, químicos o mecánicos. Mientras que los métodos de síntesis *bottom-up* comienzan con moléculas o átomos (abajo) y estos reaccionan en ciertas condiciones químicas o físicas para formar nanomateriales (arriba) [1].

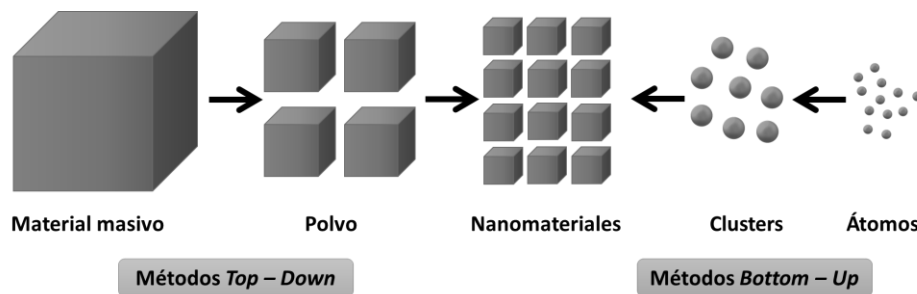


Figura 1.12. Métodos de síntesis de nanomateriales.

Dentro de estos, los métodos *bottom-up* son los que con mayor frecuencia se emplean en la síntesis de MNP. Éstos incluyen métodos que involucran reducción química, métodos

fotoquímicos, métodos electroquímicos, métodos que emplean plantillas (micelas o surfactantes), entre otros [1].

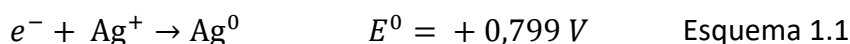
A continuación, se desarrollarán algunos aspectos importantes de las síntesis por reducción química y sobre el empleo de surfactantes en la síntesis de MNP.

1.2.3.1 Reducción Química

La **reducción química** es un método de síntesis que consiste en la reducción del catión metálico a un estado de oxidación cero generando agregados que posteriormente formarán la nanopartícula deseada.

Debido a que las nanopartículas son pequeñas y no son termodinámicamente estables, la estabilidad se logra con la adición de agentes estabilizantes, como ligandos orgánicos o inorgánicos, o colocándolas en un medio inerte, como una matriz inorgánica o polimérica. A su vez, las dispersiones de MNP son estables si la interacción entre el solvente y el ligando es favorable, ya que éste provee una barrera energética que contrarresta las atracciones de van der Waals y magnéticas (materiales magnéticos) entre nanopartículas [7]. El crecimiento de estos agregados puede ser controlado mediante el empleo de agentes estabilizantes adecuados.

Por otra parte, la factibilidad en este tipo de metodología depende de la termodinámica que gobierna el proceso, es decir, de los potenciales electroquímicos de las hemi-reacciones correspondientes (potenciales de reducción estándar). La suma de los potenciales de reducción de las reacciones debería ser positivo ($\Delta E^0 > 0$) para que el proceso este favorecido termodinámicamente; lo que implica que éste posea energía libre neta negativa ($\Delta G^0 < 0$). En el caso de la plata, por ejemplo, el potencial electropositivo relativamente alto de la reacción de reducción en agua (esquema 1.1), permite la utilización de varios agentes reductores, como en el caso de citrato de sodio ($E^0 = -0,180$ V), borohidruro de sodio ($E^0 = -0,481$ V), hidracina ($E^0 = -0,230$ V) e hidroquinona ($E^0 = -0,699$ V) [72].



A su vez, algunas moléculas o iones pueden actuar como agente reductor en la síntesis y como agente estabilizante conjuntamente. Este es el caso del anión citrato, aminas, alcoholes, tioles, entre otros. El mejor ejemplo de ello es la reducción y consecuente estabilización que realiza el citrato de sodio en la síntesis de AuNP. A continuación se discutirán los aspectos más relevantes de algunas de las estrategias de síntesis empleada en este trabajo de tesis doctoral.

Reducción por el anión citrato

En 1951, Turkevich fue el primero que empleó citrato de sodio para reducir AuCl_4^- sintetizando nanopartículas de oro en solución acuosa y a temperaturas altas [73]. Desde ese momento, esta metodología, conocida como método de Turkevich, se ha extendido a la síntesis de nanopartículas a partir de otros metales, como la plata por ejemplo [74–76].

Se ha investigado ampliamente que el anión citrato actúa como agente reductor sobre el catión metálico y como estabilizante de la nanopartícula resultante [73]. En general, para controlar el tamaño y la forma de las MNP es necesario comprender los mecanismos y los procesos cinéticos de reducción del precursor y el crecimiento de la partícula. Existen varios estudios que abordan el mecanismo de crecimiento por reducción del anión citrato [77–79]. Por ejemplo, se observó que para AgNP obtenidas por reducción con radiólisis de pulso, el anión citrato actúa complejándose con dímeros de Ag_2^+ y modulando el crecimiento de las partículas. En este caso, una vez que se producen las primeras semillas formadas por la reducción de Ag^+ mediado por citrato, el anión restante puede complejarse con la superficie metálica disminuyendo la cantidad total de citrato disponible para reducir más Ag^+ en la solución. Así, se forman pocas semillas nuevas y las partículas iniciales comienzan a crecer por coalescencia o maduración de Ostwald, en donde las partículas más grandes crecen a expensas de las más pequeñas [78]. En el caso de AuNP, un estudio del mecanismo de crecimiento fue desarrollado por Polte *et al.* [77]. Este mecanismo incluye 4 etapas en la formación de la nanopartícula:

- i) Nucleación rápida (60 segundos) para formar partículas de 2 nm aproximadamente.
- ii) Crecimiento por coalescencia o maduración de Ostwald (20 minutos). Proceso de reducción lento.
- iii) Crecimiento por difusión de las partículas por medio de la reducción del precursor metálico sumado a la continua coalescencia (25-50 minutos). Usualmente, el crecimiento controlado por la difusión ocurre en pocos segundos. Sin embargo, la causa de que en estos casos se observen tiempos más largos se debe a la constante reducción de Au^{3+} que ocurre en la solución, siendo la concentración de precursor metálico el factor limitante de este proceso.
- iv) Crecimiento final con el consumo de las especies de precursor remanente atribuida a la reducción autocatalítica en la superficie de las nanopartículas ya sintetizadas (50-70 minutos).

En la figura 1.13 se observa una representación de estos procesos.

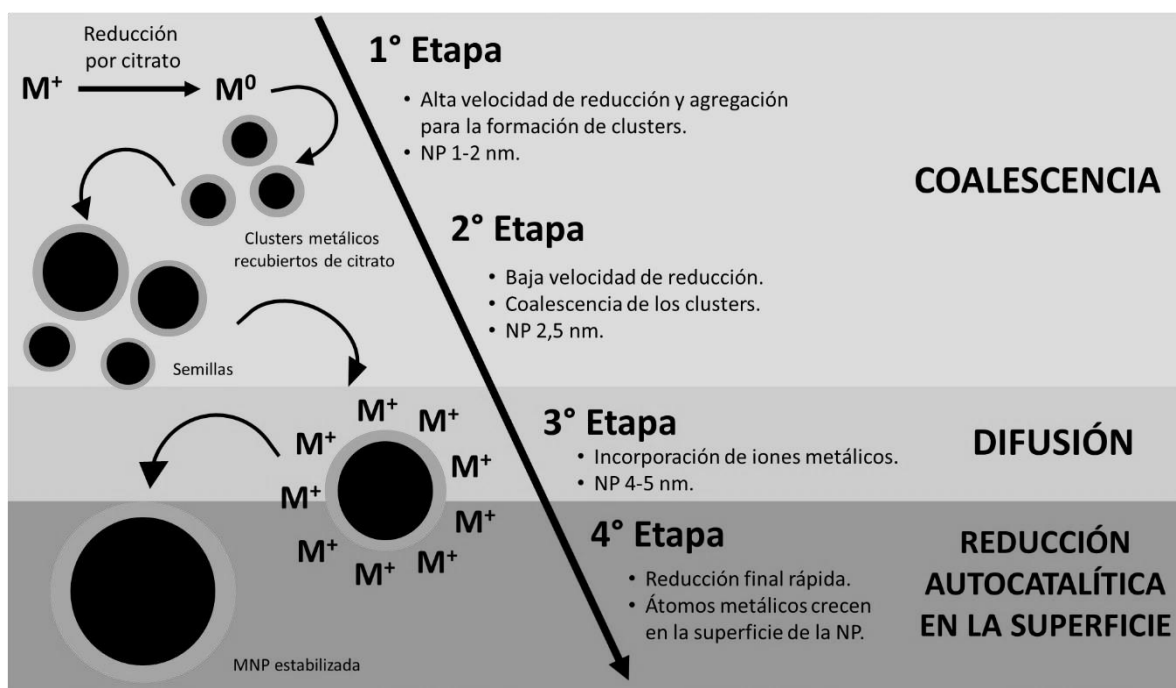
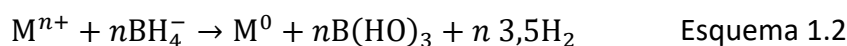


Figura 1.13. Representación del crecimiento de nanopartículas metálicas mediadas por citrato.

Recientemente, Al Gharib *et al.* dedujeron el mecanismo de oxidación del anión citrato, la reducción de los iones plata y la nucleación de las nanopartículas por el método de Turkevich, mediante los rendimientos obtenidos por radiólisis gamma y de pulso para dicarboxiacetona, H_2 , CO_2 y la reducción de iones plata [80]. Observaron que el agente reductor fuerte no es el anión citrato (Cit), sino un radical oxidado $Cit(-H)^\bullet$. Durante la síntesis de Turkevich, el radical $Cit(-H)^\bullet$ se libera a la solución proveniente de la oxidación del citrato por Ag^+ adsorbidos en las paredes del recipiente de reacción, o directamente por iones Au^{3+} presentes en la solución. Luego, el reductor fuerte $Cit(-H)^\bullet$ es capaz de sobrepasar la barrera termodinámica de gran potencial negativo de reducción de iones libres monovalentes que es necesaria para iniciar la nucleación y el crecimiento de pequeñas partículas [80].

Reducción por borohidruro de sodio

La reducción por $NaBH_4$ involucra la hidrólisis del borohidruro acompañada por la formación de hidrógeno (esquema 1.2). Se han sintetizado nanopartículas de diferente naturaleza empleando esta metodología, como AgNP, AuNP, PtNP, entre otras [81].



Polte *et al.* propusieron un mecanismo de formación de las MNP que consiste en una primera etapa donde se produce la reducción de los precursores metálicos (<200 ms) con la formación de dímeros, trímeros y *clusters* de diferentes tamaños. En una segunda etapa se produce la coalescencia de las partículas más pequeñas para formar otras más grandes. En el caso de las AuNP, la falta de un agente estabilizante hace que estas nanopartículas crezcan continuamente incluso luego de 24 horas del inicio de la síntesis (figura 1.14) [82,83]. Para las AuNP, luego de la coalescencia, el crecimiento llega a un estado metaestable, donde las nanopartículas alcanzan un tamaño constante por aproximadamente 5-10 minutos, relacionada a la hidrólisis del BH_4^- a $\text{B}(\text{HO})_4^-$. En un momento determinado de la reacción (cuando casi todo el BH_4^- se ha hidrolizado), la estabilidad coloidal de las partículas disminuye iniciando una segunda y última coalescencia, siendo esta la última etapa de la síntesis y donde las nanopartículas alcanzan su tamaño promedio final (figura 1.15) [83].

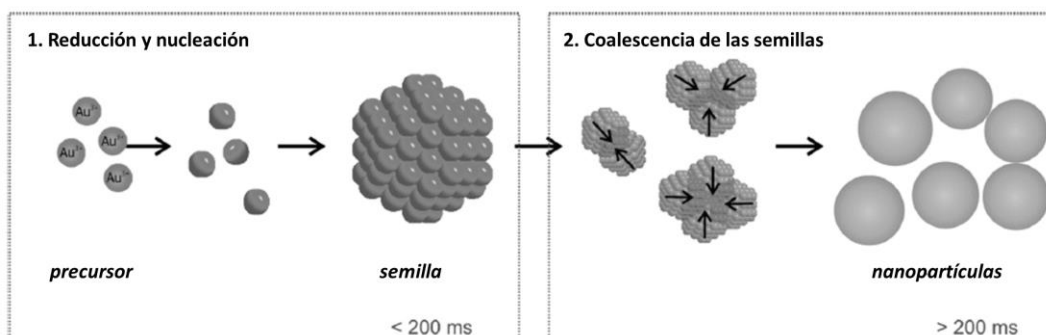


Figura 1.14. Esquema representativo de la formación de nanopartículas de oro. Ref. [82].

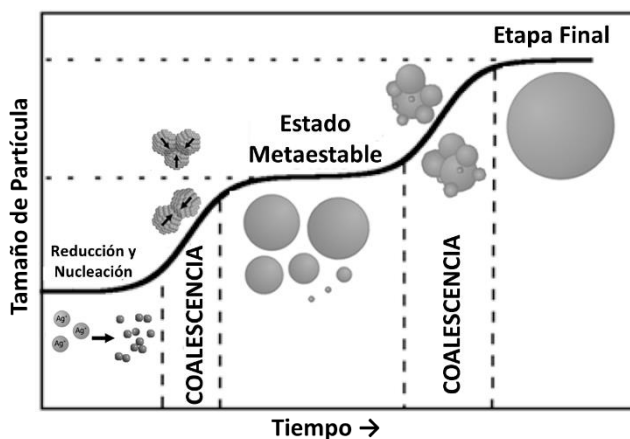


Figura 1.15. Ilustración del mecanismo de crecimiento de AgNP sintetizadas usando NaBH_4 propuesto por Polte *et al.* Imagen adaptada de Ref. [3,13].

En resumen, usando un agente reductor fuerte, como NaBH_4 ($E^0 = -0,481\text{V}$, [84]), se produce una reducción más rápida de Ag^+ que el proceso de crecimiento. El mecanismo está gobernado por la coalescencia, relacionada a la estabilización electrostática de las nanopartículas.

Reducción por ácido gálico

El ácido gálico es un compuesto polifenólico abundante en una gran variedad de plantas, entre las que se encuentran la espinaca, la uva, el té verde, etc. [85] Su actividad biológica incluye propiedades como antioxidante [86], antiinflamatorio [87], antibacterial [88], entre otros.

El ácido gálico también puede ser empleado para la reducción de metales en agua y a temperatura ambiente, ya que posee un potencial de oxidación de 0,5 V (figura 1.16).

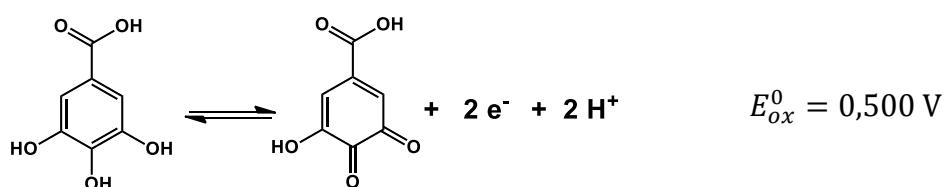


Figura 1.16. Oxidación del ácido gálico a la forma hidroquinona. Ref. [89]

Se observó que para AgNP, además de los valores de potencial redox, la presencia de grupos hidroxilos en el ácido benzoico, organizados en una posición determinada, juega un rol importante en la síntesis de MNP. Por ejemplo, no fue exitosa la generación de nanopartículas cuando se emplearon derivados de ácido benzoico sustituido con grupos hidroxilos en las posiciones *meta*, pero sí se obtuvieron nanopartículas cuando éstos se localizaban en las posiciones *orto* y *para*. En este caso, los hidroxilos son la parte reactiva (figura 1.16) y el grupo carboxilo actúa como la parte estabilizante (figura 1.17). La idea de tener grupos hidroxilos en esas posiciones puede explicarse por la formación de una red de moléculas de estabilizante alrededor de la nanopartícula mediante interacciones de puente hidrógeno entre las moléculas superficiales (figura 1.17), que incrementa la estabilidad coloidal (potencial zeta; $\xi = -45\text{ mV}$). A su vez, es necesaria la adición de NaHO para obtener coloides de Ag. De esta forma, las especies reactivas de plata puede ser Ag_2O que es considerado buen precursor de AgNP por descomposición térmica [90].

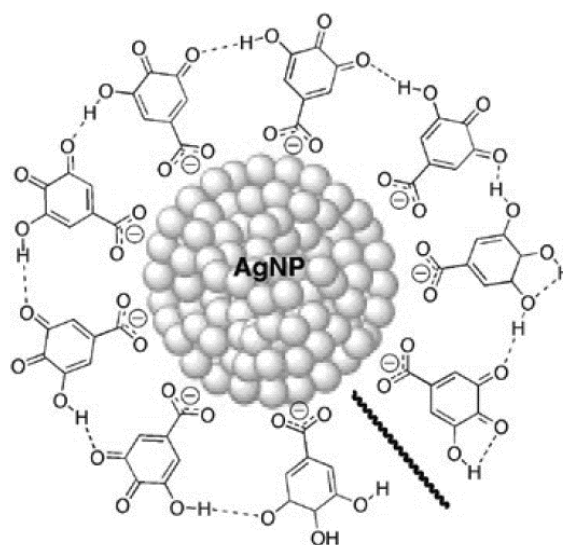


Figura 1.17. Ilustración de la AgNP estabilizadas con ácido gálico. Ref. [90]

1.2.3.2 Efecto de surfactantes en la síntesis de nanopartículas metálicas

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que poseen una cabeza polar hidrofílica y una cadena o cola apolar hidrofóbica. El grupo que conforma la cabeza del surfactante puede estar cargado o ser polar debido a la inclusión de átomos de oxígeno o similares; mientras que la cola generalmente está formada por cadenas hidrocarbonadas. Esto permite que existan una gran cantidad de surfactantes de diferente clase (figura 1.18). Los surfactantes más comunes son los surfactantes aniónicos, donde la cabeza está conformada por un grupo aniónico como el sulfato, fosfato o carboxilato; los surfactantes catiónicos formados por un catión como el amonio cuaternario o el piridinio; y los surfactantes no iónicos, donde la cabeza hidrofílica no se encuentra cargada, pero posee una determinada polaridad brindada por la inclusión de átomos de oxígeno o similares [91].

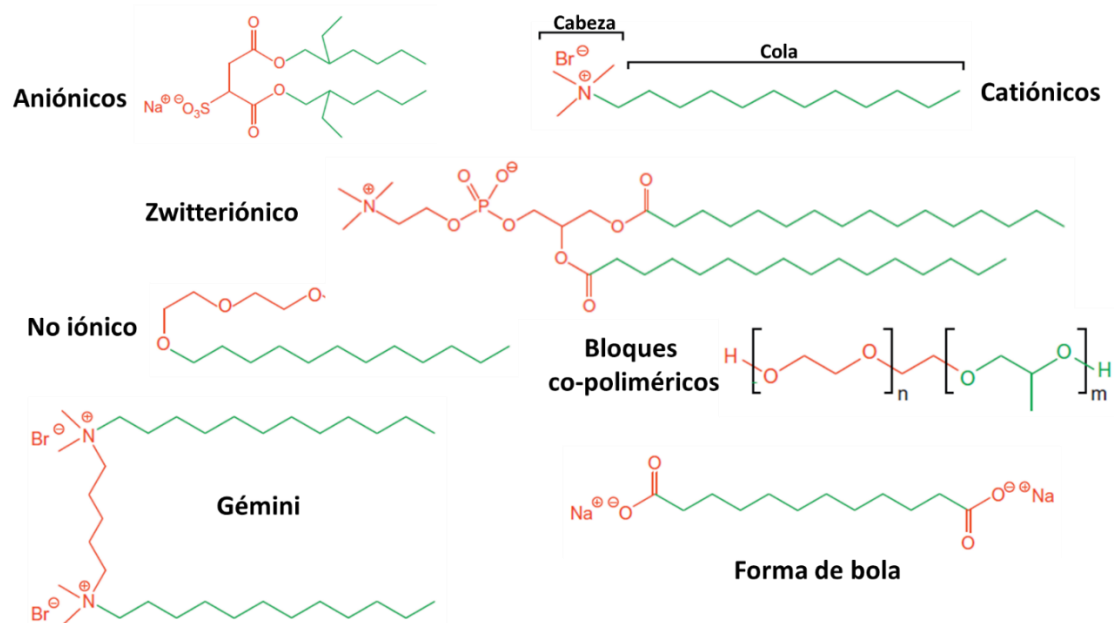


Figura 1.18. Ejemplos de estructuras químicas de las clases de surfactantes más importantes.

Los surfactantes más empleados en biología son los surfactantes zwitteriónicos neutros, que poseen dos especies de carga opuesta en la cabeza polar. Existen otros surfactantes con estructuras más inusuales que han exhibido ciertas propiedades que resultaron ventajosas. Entre ellos se incluyen los surfactantes con forma de bola, que poseen dos cabezas polares unidas por una cadena hidrocarbonada, y los surfactantes gémini (SG), que son dos moléculas de surfactante unidas mediante un espaciador [91].

Los surfactantes han demostrado ser capaces de dirigir las síntesis de los nanomateriales hacia la formación de nanopartículas de diferente morfología, fenómeno asociado a la adsorción de moléculas de surfactante en diferentes planos cristalinos de las semillas formadas durante el crecimiento de las partículas, controlando la forma de las mismas [92]. Se han empleado diferentes tipos de surfactantes para controlar la morfología de los nanomateriales. Por ejemplo, se observó que empleando tosilato de cetiltrimetilamonio (CTAT) es posible sintetizar nanocilindros de plata (AgNR) (figura 1.19A) [93]. El CTAT forma micelas cilíndricas debido a que el gran volumen de la cabeza polar experimenta impedimento estérico para acomodarse en micelas esféricas, por lo que prefiere organizarse en micelas cilíndricas. Este surfactante posee mayor afinidad por el plano (100) de las semillas y permite el crecimiento diferencial por el plano (111) para formar nanocilindros de Ag (figura 1.19B).

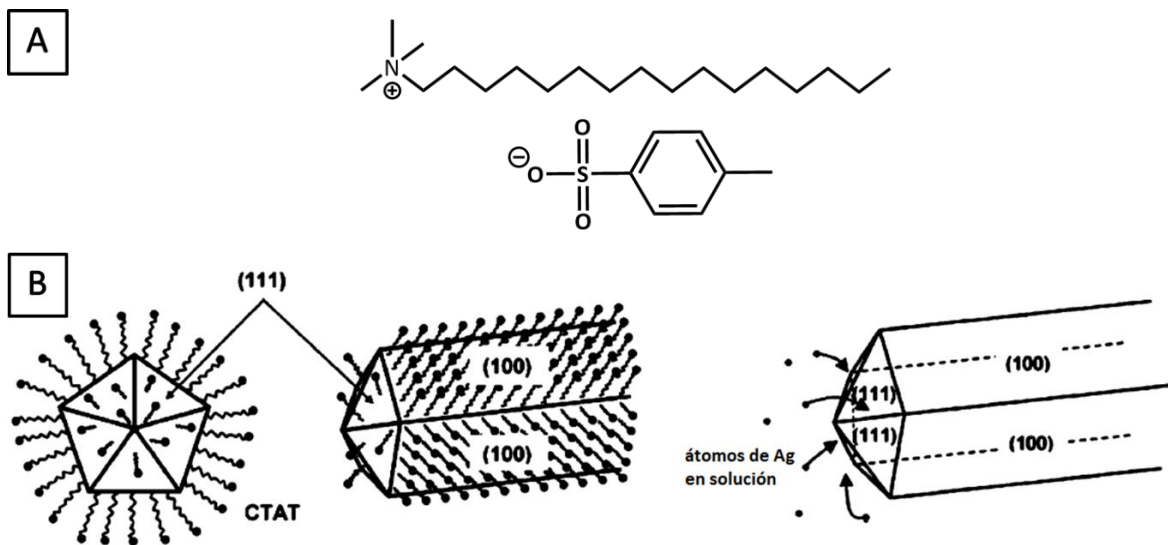


Figura 1.19. (A) Estructura química del CTAT. (B) Adsorción preferencial de CTAT al plano (100) del nanocilindro de plata y crecimiento del mismo por reducción de átomos de Ag en el plano (111). Ref. [93].

Empleando DFT (Teoría Funcional de Densidad) fue posible estudiar el rol de los iones haluro y de plata en el crecimiento de nanocilindros de oro (AuNR) empleando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como surfactante [94]. Cuando se adicionan semillas de Au a una solución de crecimiento que contiene CTAB, Ag^+ , Au^{3+} y un agente reductor suave (ej.: ácido ascórbico), los cationes Ag^+ y aniones Br^- forman un complejo $[\text{Br} - \text{Ag} - \text{Br}]^-$ que puede interactuar con los cationes CTA^+ , formando $\text{CTAB} - \text{AgBr}$. El plano (100) posee una estructura geométrica (figura 1.20A) que permite la adsorción preferencial de $\text{CTAB} - \text{AgBr}$, favorecida por la posibilidad de conservar el complejo luego de la adsorción y debido a la formación de parches de AgBr que crecen en el plano (100) de la semilla original. Simultáneamente, la estructura mantiene las interacciones alifáticas entre las colas del surfactante y permite que se generen interacciones electrostáticas entre los cationes amonio y aniones Br^- (figura 1.20B). Este tipo de adsorción no puede tener lugar en el plano (111) debido a que el cristal AgBr presenta una estructura de roca salina con planos no polares de patrones cuadrados similares al plano (100) de la superficie de Au. La adsorción preferencial, con el consecuente bloqueo de la superficie, origina la ruptura de la simetría que lleva a la formación de cilindros. De esta manera, la interacción iónica entre $\text{Ag}-\text{Br}$, la interacción electrostática entre CTA^+ y Br^- , y las interacciones de dispersión entre las moléculas de CTA^+ obstaculizan el crecimiento de la nanoestructura, excepto en dirección perpendicular al plano (100). Como los

surfactantes tienen una larga cadena alifática, intentan alinearse para maximizar la atracción, generando un cilindro que establece una dirección de crecimiento preferencial.

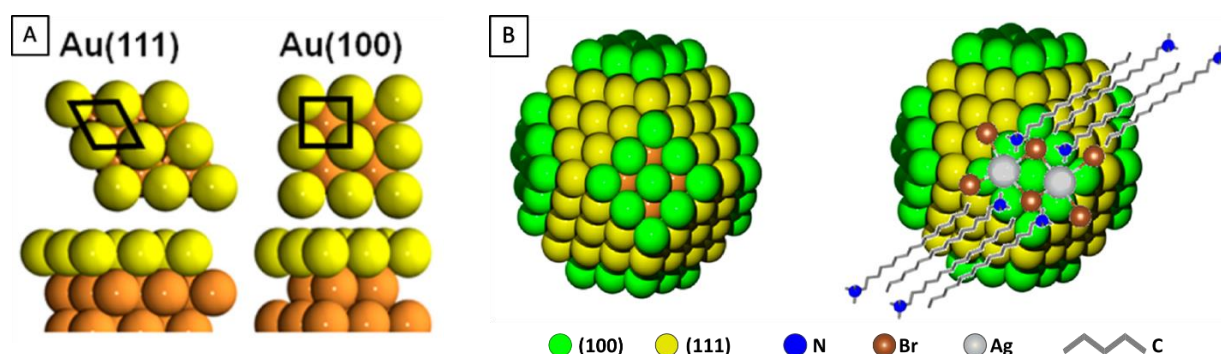


Figura 1.20. (A) Representación de la vista superior y lateral de los planos (111) y (100) de Au. (B) Representación de una semilla de Au con sus planos cristalinos (izquierda) y adsorción de CTAB en la superficie de la semilla de Au (derecha).

1.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La caracterización de las nanopartículas metálicas es un paso muy importante en la manipulación de nanomateriales, por al menos tres razones principales:

- ✓ Para proveer un entendimiento comprensivo del nanomaterial que se utilizará.
- ✓ Para comprender cómo sus propiedades se ven alteradas debido a un fenómeno específico.
- ✓ Para correlacionar las mediciones de las propiedades del nanomaterial con una respuesta específica.

La caracterización química y elemental de los nanomateriales está enfocada en la composición atómica (incluyendo la pureza), los enlaces y sus estados de oxidación que incluyen mediciones del material masivo y de la superficie. Esto provee información acerca de las concentraciones atómicas, la pureza y/o reactividad de las MNP. A su vez, la caracterización del comportamiento de estos materiales, donde la propiedad medida indica como el nanomaterial responde a factores externos, depende fuertemente del entorno en que se encuentra la MNP. De la misma manera, la carga de superficie, el potencial Z y la estabilidad de la partícula dependen específicamente de la matriz en la que se encuentren [9].

Existen múltiples técnicas de caracterización de MNP que se encuentran resumidas en la tabla 1.1. De manera general, podemos encontrar diversas técnicas microscópicas que incluyen a aquellas que emplean haces de electrones como fuente de “iluminación”, como en el caso de

TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión) y SEM (Microscopio Electrónico de Barrido). A lo largo de los años, la modificación de estas técnicas permitió una caracterización más completa o específica del material en estudio. Estas innovaciones van desde TEM de Alta Resolución (HRTEM) que permite evaluar la composición cristalográfica del material hasta el desarrollo de TEM Líquido (*Liquid TEM*), técnica que es capaz de estudiar el crecimiento dinámico y oscilatorio de nanopartículas [95]. De la misma forma, TEM y SEM pueden ser acopladas a distintos métodos espectroscópicos como la Espectroscopia de Rayos X de Energía Dispersiva (EDX, EDAX o EDS), Difracción de Rayos X (SAED) o Espectroscopia de pérdida de energía de electrones (EELS).

Dentro de las técnicas basadas en rayos X, la Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para el análisis químico de superficies de MNP, ya que permite elucidar la estructura electrónica, la composición elemental y el estado de oxidación de los elementos que forman parte del material. A su vez, otras técnicas en esta categoría incluyen espectroscopia de absorción de rayos X (XAS), fluorescencia de rayos X (XRF), difracción de rayos (XRD), entre otras.

Otras técnicas que completan la caracterización de las MNP corresponden a las técnicas espectroscópicas empleadas, comúnmente, en el ámbito de la Química Orgánica, como absorción UV-Visible y de Infrarrojo cercano (NIR), FT-IR (Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier), RMN (Resonancia Magnética Nuclear), y algunas más específicas como Raman.

Estas técnicas, en conjunto con las demás citadas en la tabla 1.1, facilitan el estudio integral de los nanomateriales sintéticos, especialmente de las MNP, y nos proveerán de la información necesaria para describir y caracterizar estos materiales. A continuación, se describirán algunas de ellas, principalmente las empleadas en esta tesis doctoral, con el objetivo de presentar la instrumentación que utilizan, la información que puede obtenerse y cómo se preparan las muestras destinadas a su análisis por medio de estas técnicas.

1.3.1 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Las técnicas microscópicas son las más empleadas como técnicas de caracterización de nanomateriales debido a que permiten obtener una imagen superficial al escanear la muestra [11]. La microscopía electrónica (EM), específicamente, emplea un haz de electrones como fuente de iluminación y explota la naturaleza ondulatoria de los electrones para obtener una imagen. Los microscopios electrónicos poseen un poder resolutivo mayor al de microscopios ópticos que usan radiación electromagnética, lo que permite obtener una magnificación de más de dos

millones de veces, en comparación con la magnificación de hasta dos mil veces de los microscopios ópticos [96].

Existen dos tipos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM).

La **microscopía electrónica de transmisión** es la técnica más común para analizar el tamaño y la morfología de las MNP, ya que, además de proveer imágenes de la muestra también nos permite estimar con mayor certeza la homogeneidad de las nanopartículas. Sin embargo, esta técnica posee algunas limitaciones, entre las que se encuentran la dificultad para cuantificar una gran cantidad de partículas o la interpretación incorrecta de las imágenes debido a efectos de orientación [95].

Las muestras que pueden analizarse por esta técnica deben ser estables en condiciones de alto vacío [97] y ser lo suficientemente delgadas para que el haz de electrones pueda atravesarlas.

Por otra parte, la **microscopía electrónica de barrido** es una técnica utilizada ampliamente para la obtención de imágenes de alta resolución de superficies y puede ser empleada en la caracterización de materiales en la nanoescala [95]. Debido a la capacidad de detectar variaciones en la morfología de las partículas de la muestra, la microscopía SEM ha sido empleada para evaluar la influencia de ciertos reactivos en la síntesis de nanopartículas metálicas [98].

Las muestras para SEM pueden analizarse en su forma masiva, por lo que su preparación es más sencilla. Las muestras pueden montarse directamente en láminas de aluminio o carbón. Sin embargo, existe el riesgo de acumulación de campos eléctricos estáticos en la muestra debido a la irradiación de electrones durante el análisis; debido a esto es importante que al menos la superficie de la muestra sea conductora. En el caso de muestras no conductoras se realiza un recubrimiento de una lámina delgada de oro, aunque esto genera que se pierda parte de la información de la muestra [27].

La información que se obtiene de la técnica SEM incluye [4]:

- ✓ Topografía: aspecto de la superficie de la muestra.
 - ✓ Morfología: forma, tamaño y ensamblaje de las partículas que forman parte de la muestra.
 - ✓ Composición: (acoplado a otro detector) compuestos químicos por los que está formada la muestra en áreas de aproximadamente 1 μm en diámetro y profundidad.
 - ✓ Información cristalográfica: arreglo de átomos en la muestra y su grado de orden, empleado solamente en partículas individuales mayores de 20 μm .
-

1.3.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

La espectroscopia se define como el área de la ciencia que estudia la interacción de la materia con la radiación electromagnética. La absorción, transmisión y dispersión de radiación electromagnética son los fenómenos que emplean los diferentes métodos de caracterización espectroscópica. A continuación, se describirán algunos de ellos.

1.3.2.1 Espectroscopia UV-visible

La absorción de luz en el espectro UV-visible (UV-vis) es un método espectroscópico muy útil para detectar la presencia de cromóforos en pequeñas moléculas y macromoléculas.

En la sección 1.2.2 se desarrollaron las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas. Se mencionó que son muy sensibles a variaciones en la forma, el tamaño, la agregación y los cambios de concentración de las nanopartículas. La oscilación colectiva de los electrones en la superficie de las MNP, causada por la irradiación de luz, influye en el índice de refracción cercano a la nanopartícula, lo que permite caracterizarlos por espectroscopia UV-vis [96]. Las ventajas de esta técnica incluyen la simplicidad, selectividad hacia nanopartículas, sensibilidad y tiempos cortos de medición. La preparación de las muestras es muy simple y consiste en diluir suspensiones coloidales de las MNP a analizar y efectuar la medición en el rango de longitudes de onda seleccionado.

Las nanopartículas metálicas, principalmente las de oro y plata, se caracterizan por presentar una absorción de resonancia del plasmón que produce soluciones intensamente coloreadas. Por ejemplo, la banda de plasmón de AgNP de 20 nm de diámetro está centrada en 395 nm, resultando en una solución amarilla. En el caso de AuNP de 20 nm de diámetro, la banda de plasmón se centra en 520 nm y la solución es de color rojo intenso. La absorción de las MNP puede darse en el área del espectro UV-visible y las mismas pueden visualizarse en soluciones de concentración nano y picomolar [96]. En la figura 1.21 se observan las variaciones en color de las soluciones de AgNP al variar el tamaño o la forma de las nanopartículas.

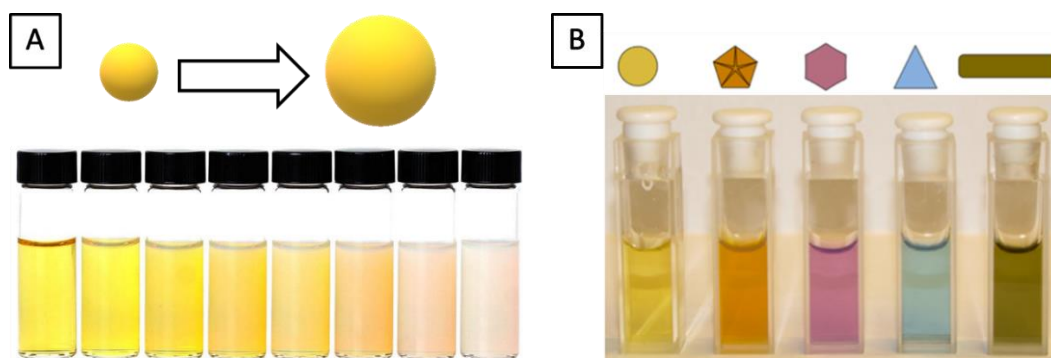


Figura 1.21. Efecto del tamaño (A) y la forma (B) de AgNP en la coloración de las suspensiones coloidales de las mismas. Ref. [99,100].

1.3.2.2 Espectroscopia Vibracional

La espectroscopía vibracional comprende la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y la espectroscopia Raman (RS). Estos métodos se emplean para investigar la estructura de las moléculas y se aplican en muestras secas (polvos) o en suspensiones líquidas. Los estados vibracionales estudiados en la espectroscopia Raman son similares a los involucrados en la espectroscopia infrarroja. Sin embargo, ambas técnicas son complementarias debido a que vibraciones que suelen ser intensas en el espectro infrarrojo (por involucrar momentos dipolares fuertes) son generalmente débiles en el espectro Raman. De la misma forma, las vibraciones de grupos funcionales no polares que generan bandas muy intensas en Raman, usualmente resultan en débiles señales infrarrojas. Mientras que la espectroscopia FTIR es más sensible a grupos funcionales específicos y a enlaces altamente polares, la espectroscopia Raman es más sensible a estructuras C – C y a enlaces simétricos [96].

La **espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier** (FTIR) es un método de transmisión/absorción empleado para detectar enlaces químicos y el ambiente en el que se encuentran en sistemas moleculares basado en las vibraciones y rotaciones de los enlaces que conforman las moléculas [96].

Esta técnica resulta muy útil para caracterizar nanomateriales cuyas superficies han sido modificadas, al detectar los grupos funcionales presentes en la misma. De la misma manera, permite discernir si una modificación superficial se realizó con éxito al evaluar la presencia de las señales de nuevos grupos funcionales luego de realizar la reacción de modificación [101]. La espectroscopia FTIR también puede ser empleada para evaluar cuáles son los grupos funcionales en la superficie de nanopartículas metálicas al finalizar una síntesis. Por ejemplo, en la síntesis de

AgNP empleando miel se midió el espectro FTIR de la muestra para identificar las posibles moléculas que actuaban como ligandos en la estabilización de las MNP [102].

Por otra parte, la **espectroscopia Raman** (RS) estudia los modos vibracionales, rotacionales y otras frecuencias bajas en un sistema molecular. La espectroscopia Raman se emplea comúnmente para obtener información sobre ciertos enlaces químicos de una molécula y su simetría. Por lo tanto, provee de una “huella dactilar” a partir de la cual es posible la identificación de una molécula en función de la posición e intensidad de las señales observadas en el espectro Raman [96]. Debido a que esta técnica no es invasiva, ofrece una gran cantidad de ventajas para el análisis molecular. Por ejemplo, los especímenes no requieren ser seccionados, los espectros pueden recolectarse a partir de volúmenes muy pequeños de muestra y el agua no interfiere en el análisis.

Las señales Raman son generalmente débiles debido a que sólo una pequeña fracción de la luz dispersada lo hace a una frecuencia diferente a la radiación incidente. La **espectroscopia Raman intensificada por la superficie** (SERS) es una herramienta excelente para incrementar la intensidad de la señal para el análisis y detección altamente sensible de analitos de interés. En SERS, las señales débiles provenientes de la dispersión Raman de las moléculas de analito se intensifican en presencia del plasmón de nanoestructuras de metales nobles (figura 1.22) [101].

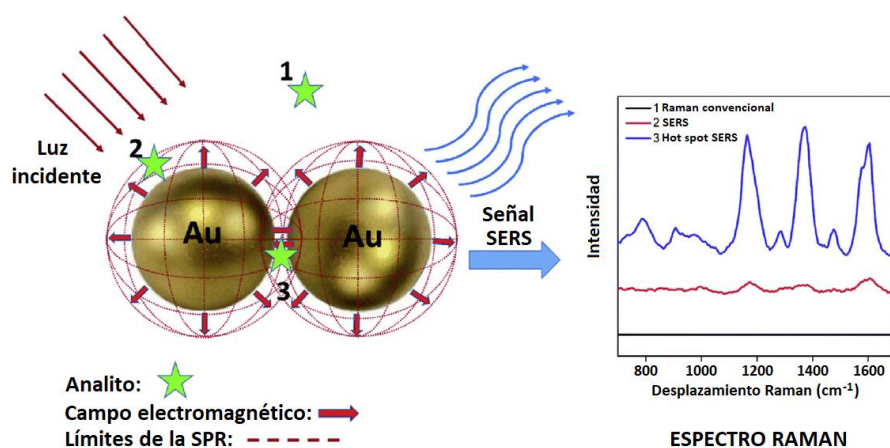


Figura 1.22. Representación esquemática de la espectroscopia SERS para un analito orgánico sobre nanopartículas de oro. SPR: resonancia de plasmón superficial. Ref [103].

La espectroscopia SERS se ha empleado principalmente para la detección de analitos debido a que, mediante su uso, es posible alcanzar límites de detección del orden fM [104,105]. Sin embargo, es posible utilizar SERS para estudiar los ligandos que estabilizan las superficies

metálicas. Por ejemplo, Lopez-Sanchez *et al.* estudiaron diferentes metodologías para remover PVA (polivinil alcohol), el ligando que estabilizaba AuNP, y empleó SERS para monitorear el éxito de estos cambios al observar la desaparición de las señales de PVA de las nanopartículas en cada etapa del proceso [106]. Una de las ventajas de los métodos de detección SERS consiste en la posibilidad de emplear una solución coloidal de las MNP para el análisis [101], la técnica no es destructiva, posee alta sensibilidad y es muy sencilla de realizar.

1.3.3 TÉCNICAS DE DISPERSIÓN

La dispersión puede ser generada a partir de distintas fuentes de radiación (rayos X, neutrones, electrones y luz láser), cada una con diferentes características que dan lugar a la gran variedad de técnicas de dispersión disponibles para la nanocaracterización. Dentro de ellas se pueden mencionar la dispersión dinámica de luz (DLS), el potencial zeta, la difracción de rayos X (XRD), la dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS), la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), entre otras [96]. En esta sección nos enfocaremos en la descripción de las técnicas DLS y potencial Z.

1.3.3.1 Dispersión dinámica de luz

La **dispersión dinámica de luz** (DLS) es una herramienta importante y la más empleada para la determinación del tamaño hidrodinámico de nanopartículas en solución [96]. Esta metodología está basada en la medición de la dispersión de la luz de pequeñas moléculas durante su movimiento browniano en solución y su correlación con el tamaño de las partículas. El tamaño de las MNP medido por DLS (diámetro hidrodinámico) puede ser ligeramente más grande que el determinado por microscopía electrónica (diámetro real), debido a que las moléculas del solvente y de los ligandos se encuentran incluidas en el diámetro hidrodinámico (figura 1.23A) [27]. Las partículas más grandes difunden más lento que las pequeñas y el equipo de DLS mide la dependencia del tiempo de la dispersión de luz generada y lo correlaciona con el tamaño de la partícula mediante una función matemática [96].

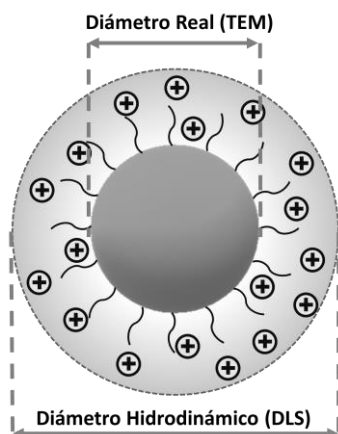


Figura 1.23. Representación del diámetro hidrodinámico y del diámetro real de una partícula. Entre paréntesis se especifica la técnica a partir de la cual es posible determinarlo.

Algunas de las ventajas que posee DLS es la exactitud con la que determina el tamaño hidrodinámico de muestras monodispersas, la capacidad de medir muestras diluidas, el análisis de muestras en un amplio rango de concentraciones, como la capacidad de obtener mediciones reproducibles en tiempos cortos (minutos) [96].

1.3.3.2 Potencial Zeta (ζ)

El **potencial Z** corresponde al potencial electrocinético de un sistema coloidal, usualmente denotado por letra griega zeta (ζ) [96]. Los instrumentos que miden potencial zeta registran el cambio de fase de la luz dispersada por partículas que se mueven bajo la influencia de un campo eléctrico externo; fenómeno que se denomina *electroforesis*. El cambio de fase es proporcional a la movilidad electroforética (velocidad) de las partículas. A partir de estos parámetros se calcula el potencial zeta [96].

El potencial zeta es una herramienta importante para predecir la estabilidad (entendida como menor tendencia hacia la floculación) a largo plazo de nanopartículas en solución, debido a que el mismo indica el grado de repulsión de partículas adyacentes con la misma carga en la dispersión. Un valor alto de potencial zeta indica mayor resistencia a la agregación en solución. Cuando el potencial es bajo, la atracción excede la repulsión y las nanopartículas tenderán a flocular [96].

A su vez, ζ es sensible a cambios en el ambiente de la partícula, como el pH o la fuerza iónica. Por lo tanto, es importante el preparado de la muestra en su medición. La misma debe ser un

particulado monodisperso, en un solvente polar y a una concentración suficiente para dispersar luz de longitud de onda de 633 nm o 532 nm (las longitudes de onda más comunes utilizada en los instrumentos).

1.3.4 ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA

La espectroscopia electrónica es utilizada para identificar la composición química de una muestra de interés. Dependiendo de la fuente de excitación y de la señal detectada, existen tres tipos de técnicas en esta categoría: espectroscopia de electrones Auger (AES), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) [96]. En esta sección se describirán los fundamentos y aplicaciones de la técnica XPS.

La **espectroscopia fotoelectrónica de rayos X** (XPS), también conocida como ESCA (espectroscopia electrónica para análisis químico), es una técnica espectroscópica cuantitativa que mide la composición elemental, la fórmula empírica, y el estado químico y electrónico de los elementos que se encuentran en la superficie de un material.

El análisis de superficie por XPS requiere irradiar la muestra en un ambiente de ultra-alto vacío que resulta esencial para incrementar el camino libre medio de los fotones y electrones, remover gases adsorbidos en la muestra y prevenir la adsorción de contaminantes en la superficie de la misma. Por lo tanto, las muestras deben ser sólidas y estables en estas condiciones [107]. Para muestras no conductoras, la fotoemisión genera la acumulación de cargas positivas en la superficie de la muestra y produce desplazamientos y deformación de las señales. En estos casos, se emplea un neutralizador de carga que inyecta electrones de baja energía en la superficie de la muestra para compensar el exceso de carga [107].

Además de elucidar las estructuras electrónicas, la composición química o el estado de oxidación de los elementos en la superficie de un material, XPS también permite analizar las interacciones de las MNP con los ligandos de la superficie y evaluar la funcionalización de MNP como por ejemplo, de estructuras *core/shell* [95]. A su vez, esta técnica se ha empleado para evaluar la interacción de ciertas moléculas con MNP, ha permitido conocer el grosor de los recubrimientos de superficie de determinadas nanopartículas, ha brindado información sobre las propiedades dieléctricas de un nanomaterial al evaluar su comportamiento en procesos de carga o descarga, entre otros [95].

1.3.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS TÉRMICOS

Las técnicas de análisis térmico son un conjunto de técnicas que monitorean una propiedad de la muestra en función del tiempo o la temperatura. Para ello, la muestra se calienta o enfría programando una rampa de temperatura determinada; manteniendo constante la temperatura; o cualquier secuencia entre ellas [108]. Dentro de este conjunto podemos mencionar: análisis termogravimétrico (TGA), análisis térmico diferencial (DTA), calorimetría de barrido diferencial (DSC), difracción de rayos X de alta temperatura (HTXRD), entre otras. A continuación, se profundizará en el análisis termogravimétrico.

El **análisis termogravimétrico** (TGA) mide la cantidad o el cambio de masa de un material en función de la temperatura o el tiempo en una atmósfera de nitrógeno, helio, aire, otro gas o en vacío. Las mediciones son usadas principalmente, para determinar la composición de los materiales o para predecir su estabilidad térmica [108]. La técnica puede caracterizar materiales que exhiben pérdida o ganancia de masa debida a descomposición, oxidación o deshidratación.

En el área de las nanociencias, el empleo de TGA ha permitido predecir la estabilidad térmica de ciertos nanomateriales. Esta técnica también permite estudiar la modificación química de la superficie de las nanopartículas por diferentes grupos funcionales y la cantidad de ligando unido a la superficie de la misma [108]. Por ejemplo, Ramanujan *et al.* empleó TGA para determinar la cantidad de acetato de polivinilo (PVA) unido a nanopartículas de óxido de hierro [109]. A su vez, mediante TGA es posible obtener información sobre el recubrimiento de las partículas y sobre la pureza de algunas de ellas [110].

1.4 APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

En la actualidad, se ha extendido enormemente la utilización de NM. En la figura 1.24 se esquematizan algunas de las áreas más relevantes donde se utilizan MNP. A continuación, se desarrollará en mayor detalle cuales son las nanopartículas más empleadas y cómo se explotan sus propiedades únicas en una gran cantidad de aplicaciones.



Figura 1.24. Esquema que representa las diferentes áreas donde se emplean nanopartículas metálicas.

En la primera sección de este capítulo se presentó información sobre el proyecto PEN [8] y respecto a la gran variedad de nanopartículas que se han incorporado a diversos productos comerciales. Actualmente, el inventario cuenta con 1628 productos, de los cuales, 443 poseen AgNP. Mediante este reporte se observa que las AgNP son el nanomaterial emergente de mayor empleo y con un crecimiento más acelerado en comparación a todas las nanopartículas disponibles en el inventario [111]. Este enorme crecimiento se debe a las excelentes propiedades antibacteriales que presentan las AgNP, las cuales se han incorporado en empaques y contenedores de alimentos [112], cosméticos [113], ropa interior [114], detergentes, lociones y jabones [27], prótesis [115,116], entre otros.

A su vez, se han desarrollado agentes antibacteriales a partir de AuNP debido a la biocompatibilidad de las mismas, su gran capacidad de funcionalización, facilidad en su detección y actividad fototérmica. Por ejemplo, se investigó el efecto antimicrobiano de AuNP de 5 nm contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Estas nanopartículas redujeron en un 90-95% las colonias de *E. coli* y *S. typhi*, donde los factores que influyeron en mayor medida en las propiedades biocidas de las AuNP son la rugosidad y dispersión de las NP en el medio [117]. Sin embargo, las AuNP se han empleado principalmente en aplicaciones médicas, como transportadores de fármaco [18], en generación de imágenes [118] o en dispositivos de

diagnóstico [37], específicamente en las terapias contra el cáncer. A su vez, el empleo en conjunto de AuNP y biomacromoléculas permitió el desarrollo de varias estrategias para la detección óptica de analitos de interés, entre los que se encuentran los métodos colorimétricos, tiras reactivas, quimioluminiscencia, biosensores fluorescentes, SERS, etc [38]. Por ejemplo, es posible detectar ácidos nucleicos de una secuencia específica al emplear AuNP modificadas superficialmente con oligonucleótidos, que, al reconocer su secuencia complementaria, generan la agregación de las AuNP [119].

En los últimos años, los productos cosméticos que emplean nanomateriales incrementaron su popularidad. Dentro de estos productos, se pueden mencionar los protectores solares, productos antienvjecimiento y de cuidado personal, que se encuentran disponibles comercialmente en la actualidad [8]. Los protectores solares, por ejemplo, contienen nanopartículas de dióxido de titanio o de óxido de zinc para prevenir quemaduras de piel, ya que estos materiales poseen un buen coeficiente de absorción de los rayos UV [4].

La industria alimenticia también se ha visto beneficiada con el desarrollo de las nanociencias. El empleo de nanosensores en los empaques de alimentos y los productos agrícolas asegura la libre contaminación de los alimentos y proveen una protección contra el bioterrorismo [4]. La degradación fotocatalítica para el tratamiento de aguas residuales y como proceso de desinfección es otra área de interés. Se ha observado que las nanopartículas de óxido de Ti, Sn y Zn son buenos materiales fotocatalíticos para su empleo en la desinfección de paquetes de alimentos y en productos agrícolas. Los procesos fotocatalíticos producen la liberación de electrones excitados, los que son capaces de penetrar a las bacterias adheridas a las nanopartículas, generando la desinfección del material [4].

La industria textil ha empleado a los nanomateriales para producir indumentaria resistente a las manchas, absorbente o repelente de agua, emisoras de luz, antibacterianas, que liberen fragancias de forma controlada, entre otras [120]. También, se han empleado nanomateriales para la resistencia al calor, resistencia mecánica al desgaste, protección balística, sensores y camuflaje [4].

De esta manera, es posible observar que el empleo de los nanomateriales se ha extendido en diferentes áreas e industrias, que se comercializan actualmente una gran cantidad de productos que los incluyen y se espera que en los próximos años la utilización de los mismos se incremente aún más. De esta forma, su detección y cuantificación en el medio ambiente se convierte en una

tarea sumamente importante. A continuación, se desarrollarán algunos aspectos fundamentales en la detección y cuantificación de nanopartículas.

1.5 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a un **analito** como “*el componente del sistema que ha de ser analizado*” [121]. Este concepto puede extenderse a cualquier especie química que puede ser identificada, detectada y cuantificada en una muestra desconocida. A partir de esto, es posible hacer una distinción entre analitos convencionales y analitos especiales [122].

Un **analito convencional** es aquel cuya composición química, peso molecular y propiedades físicas y químicas están bien determinadas y son conocidas. A partir de ellos, es posible obtener soluciones estándar que sean capaces de producir curvas de calibración precisas y exactas. Por otro lado, un **analito especial** se define como cualquier compuesto cuya composición química, peso molecular, propiedades físicas y químicas pueden presentar variaciones en función del lote. Como consecuencia, las concentraciones de las soluciones “estándar” son siempre estimaciones y es importante reportar todas las aproximaciones realizadas para calcular las mismas [123]. Por ejemplo, una muestra ideal de AuNP monodispersas o isométricas de cualquier morfología sería la representada en la figura 1.25A. Sin embargo, en realidad las muestras de nanopartículas están formadas por una población de AuNP cuyos tamaños siguen una distribución Gaussiana caracterizada por una media y una desviación estándar (figura 1.25B); y, por lo tanto, el peso molecular de las mismas también corresponde a un valor promedio. Por ello las MNP se consideran como analitos especiales [123].

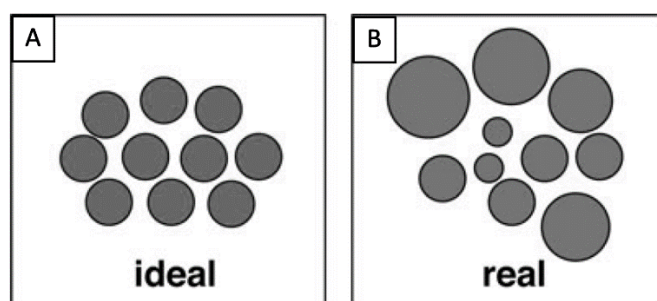


Figura 1.25. Representación de una muestra ideal (A) y de una muestra real (B) de MNP, observando la distribución de tamaños. Ref [123].

Cuando se trata de nanopartículas, reportar su concentración es más complejo que para analitos convencionales, ya que la misma puede estar expresada como concentración en masa, concentración en área superficial o concentración en número de nanopartículas. En general, todas incluyen ciertas suposiciones en el cálculo y es recomendable conocerlas debido a que pueden influenciar en gran medida el valor de concentración informado [124].

La concentración en masa indica la cantidad de masa por unidad de volumen, usualmente se informa en $\mu\text{g L}^{-1}$ o en la notación partes por litro (ppm, ppb y ppt) y es empleada para expresar concentraciones ambientales o rangos de toxicidad de ciertas NP. La concentración en número de partículas está expresada por unidad de volumen (partículas L^{-1}). Esta métrica es muy útil para evaluar procesos de agregación o desagregación y para determinar la distribución de las partículas. Finalmente, la concentración en área superficial corresponde al área superficial por unidad de volumen ($\text{m}^2 \text{cm}^{-3}$ o $\text{m}^2 \text{L}^{-1}$). La misma es útil para evaluar las propiedades catalíticas de un nanomaterial, en el análisis del ligando unido a la MNP y para definir nanomateriales [123]. Por ejemplo, las recomendaciones de la Comunidad de la Unión Europea consideran que un material debe tener un valor mínimo de $60 \text{m}^2 \text{cm}^{-3}$ para ser clasificado como nanomaterial [9].

Actualmente, existen una variedad limitada de técnicas que permiten la detección y cuantificación de nanopartículas metálicas. La mayoría de ellas requiere de la separación inicial de las MNP en función de sus diferentes tamaños o formas [125], o incluso la digestión de la muestra como un paso necesario previo a la cuantificación en muestras de matrices complejas [126]. La técnica por excelencia para la cuantificación de MNP en solución es la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) debido a su rapidez y a que ha demostrado ser una técnica de confianza. La cuantificación y caracterización de MNP mediante el acoplamiento del fraccionamiento de flujo de campo con ICP-MS (FFF-ICP-MS) es uno de los métodos que más se emplean en la actualidad [127].

Además de la gran cantidad de tiempo que insume la preparación de la muestra, la cuantificación de las MNP, en la mayoría de los casos, requiere de equipamiento costoso y de personal altamente capacitado para su realización [11,127,128]. Es por ello que el desarrollo de métodos basados en sensores químicos ha ganado mayor importancia en estos años. En términos generales, un **sensor** es un dispositivo capaz de transformar la información química en una señal de utilidad analítica. Esta información química puede originarse a partir de una reacción química del analito o de una propiedad física que puede medirse en el sistema [129]. Debido a su gran potencial, el uso de sensores ha permitido el desarrollo de innumerables aplicaciones prácticas

que abarcan un amplio y diverso panorama como los análisis clínicos, las determinaciones forenses, el control de la calidad de fármacos y alimentos, y las determinaciones de contaminantes ambientales [130].

A su vez, se considera que los sensores químicos pueden ser muy apropiados en el monitoreo de MNP por su bajo costo, sensibilidad, portabilidad y simplicidad [122]. Recientemente, se han desarrollado estrategias para detectar MNP basadas en métodos ópticos, como la absorción UV-visible o la fluorescencia. Por ejemplo, Zuber *et al.* lograron detectar AuNP de 5, 20 y 50 nm de diámetro estabilizadas con citrato de sodio en el orden de las ppb por medio de la sonda fluorescente 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (I-BODIPY); donde se generaba un incremento de la fluorescencia de la sonda que respondía a la concentración de MNP en la muestra [131].

A su vez, también se han empleado otros nanomateriales para la detección y cuantificación de MNP. Cayuela *et al.* emplearon como sensor fluorescente *carbon dots* modificados con etilendiamina ($\lambda^{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$; $\lambda^{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) [132]. Al interactuar con AgNP estabilizadas con citrato (AgNP@citrato) de 10 y 20 nm, se produce la agregación y desplazamiento al rojo de la banda SPR de las MNP, que, como consecuencia, genera la desactivación de la señal fluorescente de los *carbon dots* debido al efecto del filtro interno (IFE). Este efecto es un fenómeno de transferencia de energía, donde la energía de excitación y/o de emisión de un fluoróforo se absorbe por una molécula denominada *quencher*, que genera la disminución de la intensidad de fluorescencia con el incremento en la concentración del *quencher* en la muestra [133]. De esta forma, la disminución en la señal fluorescente de los *carbon dots* resultó proporcional a la concentración de las AgNP, con un límite de detección de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (figura 1.26). El fenómeno IFE solo se observa cuando la emisión de fluorescencia del *carbon dot* se solapa con la absorción de la MNP, lo que hace que el método sea selectivo para AgNP@citrato. Empleando AgNP estabilizadas con polivinilpirrolidona (AgNP@PVP) se observó que en ellas no se induce la agregación, por lo tanto, su absorción y la fluorescencia de emisión de los *carbon dots* no se solapan y no se produce IFE. Este sensor también es específico para AgNP por sobre AuNP con el mismo ligando, debido a que la longitud de onda de absorción de AuNP dispersas y agregadas (500 y 600 nm respectivamente) se encuentra muy alejada de la longitud de onda de emisión de los *carbon dots* (400 nm), lo que impide que se produzca IFE. Este método analítico se empleó con éxito para cuantificar AgNP en cremas cosméticas en presencia de altas concentraciones de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂NP) [132].

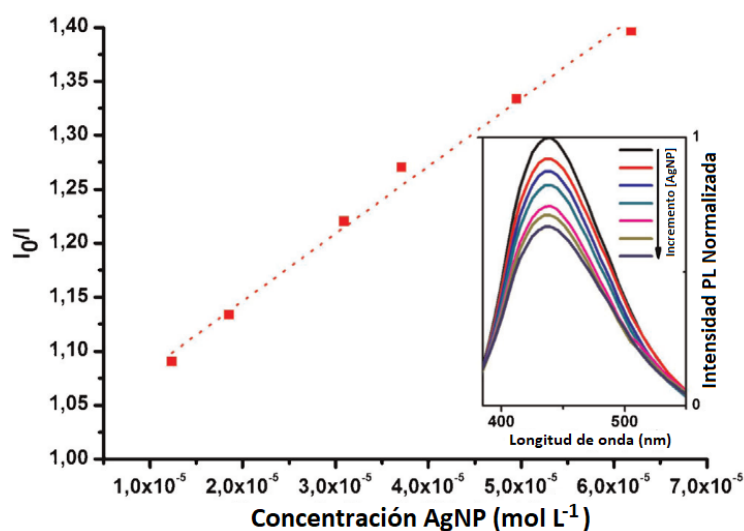


Figura 1.26. Curva de calibración de la desactivación de la fluorescencia de carbon dots en función de la concentración de AgNP@citrato. Inserto: respuesta fotoluminiscente (PL) de carbon dots al incremento de concentración de AgNP@citrato. Ref [132].

De esta manera, algunas de las ventajas del empleo de estos sensores químicos como medios para la detección y cuantificación de MNP consisten en su simplicidad, no requieren instrumentación costosa y es posible detectar concentraciones muy bajas de nanopartículas (10^{-9} – 10^{-12} mol L⁻¹) [123]. Si bien se ha avanzado en este ámbito, el empleo de estas estrategias aún es un campo en desarrollo con una enorme potencialidad para ser explotado.

Tabla 1.1. Resumen de técnicas de caracterización, fraccionamiento y cuantificación.

	Tipo	Técnicas	Información que proveen	Ref.	
Técnicas de Caracterización	Microscopía	TEM (Microscopia Electrónica de Transmisión)	Superficie, tamaño, morfología, composición cristalográfica, composición elemental.	[134–138]	
		HRTEM (Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución)			
		SEM (Microscopia Electrónica de Barrido)			
			AFM (Microscopia de Fuerza Atómica)	Tamaño, morfología, textura de superficie, propiedades eléctricas y térmicas.	[139–141]
			STM (Microscopia de Efecto Túnel)	Composición elemental y molecular.	[141,142]
	Técnicas basadas en Rayos X		XAS (Espectroscopia de Absorción de Rayos X)	Composición elemental, cristalográfica y de superficie.	[134–136,138,143]
			XRF (Fluorescencia de Rayos X)		
			XPS (Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X)		
			XRD (Difracción de Rayos X)		
			EDX, EDAX, EDS (Espectroscopia de Rayos -X de Energía Dispersiva)		
	Dispersión de luz	DLS (Dispersión Dinámica de Luz)	Tamaño de partícula, potencial Z.	[137,144,145]	
	Espectroscópicas		UV - Visible	Tamaño, agregación, morfología, química de superficie.	[135–137]
			FT-IR (Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier)	Composición superficial y estructural.	[134,145]
			Espectroscopia RAMAN	Composición superficial.	[134,146]
Térmico		TGA (Análisis Termogravimétrico)	Composición, pureza.	[110,140,145]	
		DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)	Composición superficial, pureza.	[147]	
Magnéticos		Relaxometría Magnética	Propiedades de la MNP, tamaño hidrodinámico.	[148]	
		SQUID/nano-SQUID (Dispositivos Superconductores de Interferencia Cuántica)	Saturación magnética, remanencia magnética, bloqueo de temperatura.	[148]	

		Principio de Separación	
Técnicas de Fraccionamiento	Extracción	CPE (Extracción de Punto Nube)	Extracción de MNP mediante surfactantes. [127]
	Filtración	CFF (Filtración de Flujo Cruzado)	Coefficientes de difusión a través de un canal abierto. [149]
		FFF (Fraccionamiento de Flujo de Campo)	Interacción con un campo externo y perpendicular. [125,150,151]
		UF (Ultrafiltración)	Difusión a través de una membrana. [152]
	Cromatografía	SEC (Cromatografía de Exclusión por Tamaños)	Grado de penetración, tamaño de partícula. [149,152,153]
		HDC (Cromatografía Hidrodinámica)	Rutas formadas por capilares abiertos empacados con materiales no porosos. [153]
		HGMS (Separación Magnética de Alto Gradiente)	Campo magnético separa las NP en una columna. [154]
		Performance analítica	
Técnicas de Cuantificación	Óptica atómica	ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)	Bajos límites de detección, análisis isotópico, análisis multi-elemental. [122,144,153]
		sp-ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente de una única partícula)	
		ICP-OES (Espectroscopía de emisión óptica inductivamente acoplada a plasma)	Análisis simultáneo de NP, límites de detección relativamente bajos. [134,155]
	LIBS (Espectroscopia de plasma inducido por láser)	Microanálisis multi-elemental, poca o ninguna preparación de la muestra. [156]	
	Sensores Químicos	GF-AAS (Espectroscopia de Absorción Atómica en Horno de Grafito)	Inyección directa de MNP, poca o ninguna preparación de la muestra. [157,158]
	Sensores químicos que interaccionan con las NP generando un cambio de señal que responde a la concentración de las mismas.	Bajos límites de detección, poca o ninguna preparación de la muestra. [131,132,159–161]	

1.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hornyak G.L., Dutta J., Tibbals H.F., Rao A., *Introduction to nanoscience*, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [2] International Organization for Standardization, *ISO/TS 27687: Nanotechnologies — Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*, Int. Organ. Stand. 1 (2009) 14.
- [3] Makhlof A.S.H., Barhoum A., *Emerging Applications of Nanoparticles and Architectural Nanostructures*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2018.
- [4] Murty B.S., Shankar P., Raj B., Rath B.B., Murday J., *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2013.
- [5] Binnig G., Quate C.F., Gerber C., *Atomic Force Microscope*, CRC Press. 56 (2010) 930–933.
- [6] Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N., *Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy*, Chem. Rev. 116 (2016) 2826–2885.
- [7] Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M.A., *Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes*, Chem. Rev. 105 (2005) 1025–1102.
- [8] *Nanotechnology - Project on Emerging Nanotechnologies*, (2005). <http://www.nanotechproject.org/> (accessed August 13, 2019).
- [9] Baalousha M., Lead J., *Characterization of nanomaterials in complex environmental and biological media*, Elsevier Ltd, Amsterdam, 2015.
- [10] Environmental Protection Agency (EPA), *Emerging Contaminants - Nanomaterials*, 2010.
- [11] López-Serrano A., Olivás R.M., Landaluze J.S., Cámara C., *Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact*, Anal. Methods. 6 (2014) 38–56.
- [12] You L., Zha D., Anslyn E. V., *Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing*, Chem. Rev. 115 (2015) 7840–7892.
- [13] Hussain C.M., Kharisov B., eds., *Advanced Environmental Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- [14] de Oliveira O.J., Ferreira M., Róz A.L. Da, Leite F. de L., *Nanostructures*, William Andrew, Oxford, 2016.
- [15] International Organization for Standardization (ISO), *ISO/TS 80004-1:2015, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms*, Int. Organ. Stand. (2015).

-
- [16] Nasrollahzadeh M., Issaabadi Z., Sajjadi M., Sajadi S.M., Atarod M., *Introduction to Green Nanotechnology*, Academic Press, London, 2019.
- [17] Han G., Ghosh P., Rotello V.M., *Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications*, *Nanomedicine*. 2 (2007) 113–123.
- [18] Liyanage P.Y., Hettiarachchi S.D., Zhou Y., Ouhtit A., Seven E.S., Oztan C.Y., Celik E., Leblanc R.M., *Nanoparticle-mediated targeted drug delivery for breast cancer treatment*, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 1871 (2019) 419–433.
- [19] Quadrado R.F.N., Gohlke G., Oliboni R.S., Smaniotto A., Fajardo A.R., *Hybrid hydrogels containing one-step biosynthesized silver nanoparticles: Preparation, characterization and catalytic application*, *J. Ind. Eng. Chem*. 79 (2019) 326–337.
- [20] Priece P., Salami H.A., Padilla R.H., Zhong Z., Lopez-Sanchez J.A., *Anisotropic gold nanoparticles: Preparation and applications in catalysis*, *Chinese J. Catal.* 37 (2016) 1619–1650.
- [21] Pandey S., Goswami G.K., Nanda K.K., *Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection*, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 583–589.
- [22] Wang Z., Ma L., *Gold nanoparticle probes*, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 1607–1618.
- [23] Cecchin I., Reddy K.R., Thomé A., Tessaro E.F., Schnaid F., *Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 119 (2017) 419–428.
- [24] El-Bashir S.M., Barakat F.M., Alsahhi M.S., *Metal-enhanced fluorescence of mixed coumarin dyes by silver and gold nanoparticles: Towards plasmonic thin-film luminescent solar concentrator*, *J. Lumin.* 143 (2013) 43–49.
- [25] Tansil N.C., Gao Z., *Nanoparticles in biomolecular detection*, *Nano Today*. 1 (2006) 28–37.
- [26] Lea M.C., *Allotropic Forms of Silver*, *Am. J. Sci.* 37 (1889) 476–491.
- [27] Liu J., Jiang G. Bin, *Silver nanoparticles in the environment*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2015.
- [28] Pal S., Tak Y.K., Song J.M., *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1712–1720.
- [29] Ameen K.B., Rajasekar K., Rajasekharan T., *Silver nanoparticles in mesoporous aerogel exhibiting selective catalytic oxidation of benzene in CO₂ free air*, *Catal. Letters*. 119 (2007)
-

289–295.

- [30] Veisi H., Moradi S.B., Saljooqi A., Safarimehr P., *Silver nanoparticle-decorated on tannic acid-modified magnetite nanoparticles (Fe₃O₄@TA/Ag) for highly active catalytic reduction of 4-nitrophenol, Rhodamine B and Methylene blue*, Mater. Sci. Eng. C. 100 (2019) 445–452.
- [31] Park J., Cha S.H., Cho S., Park Y., *Green synthesis of gold and silver nanoparticles using gallic acid: catalytic activity and conversion yield toward the 4-nitrophenol reduction reaction*, J. Nanoparticle Res. 18 (2016) 1–13.
- [32] Buccolieri A., Bettini S., Salvatore L., Baldassarre F., Ciccarella G., Giancane G., *Sub-nanomolar detection of biogenic amines by SERS effect induced by hairy Janus silver nanoparticles*, Sensors Actuators, B Chem. 267 (2018) 265–271.
- [33] Li Y., Li Q., Sun C., Jin S., Park Y., Zhou T., Wang X., Zhao B., Ruan W., Jung Y.M., *Fabrication of novel compound SERS substrates composed of silver nanoparticles and porous gold nanoclusters: A study on enrichment detection of urea*, Appl. Surf. Sci. 427 (2018) 328–333.
- [34] Ren W., Zhu C., Wang E., *Enhanced sensitivity of a direct SERS technique for Hg²⁺ detection based on the investigation of the interaction between silver nanoparticles and mercury ions*, Nanoscale. 4 (2012) 5902–5909.
- [35] Amendola V., Meneghetti M., *Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles*, Phys. Chem. Chem. Phys. 11 (2009) 3805–3821.
- [36] Daniel M.C., Astruc D., *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*, Chem. Rev. 104 (2004) 293–346.
- [37] Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A., *The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine*, Chem. Soc. Rev. 41 (2012) 2740–2779.
- [38] Nie L., Liu F., Ma P., Xiao X., *Applications of Gold Nanoparticles in Optical Biosensors*, 10 (2014) 2700–2721.
- [39] Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W., Sisco P.N., Alkilany A.M., Goldsmith E.C., Baxter S.C., *Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging*, Acc. Chem. Res. 41 (2008) 1721–1730.
- [40] Zeng S., Yong K.T., Roy I., Dinh X.Q., Yu X., Luan F., *A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications*, Plasmonics. 6 (2011) 491–506.
- [41] Ghosh P., Han G., De M., Kim C.K., Rotello V.M., *Gold nanoparticles in delivery applications*,
-

- Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (2008) 1307–1315.
- [42] Yang W., Liang H., Ma S., Wang D., Huang J., *Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment*, Sustain. Mater. Technol. 22 (2019) e00109.
- [43] Abadeer N.S., Murphy C.J., *Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles*, J. Phys. Chem. C. 120 (2016) 4691–4716.
- [44] Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Rivera B., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L., *Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 13549–13554.
- [45] Aminabad N.S., Farshbaf M., Akbarzadeh A., *Recent Advances of Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: State of the Art*, Cell Biochem. Biophys. 77 (2019) 123–137.
- [46] Navyatha B., Nara S., *Gold nanostructures as cancer theranostic probe: Promises and hurdles*, Nanomedicine. 14 (2019) 767–796.
- [47] Luo Z., Xu Y., Ye E., Li Z., Wu Y.L., *Recent Progress in Macromolecule-Anchored Hybrid Gold Nanomaterials for Biomedical Applications*, Macromol. Rapid Commun. 40 (2019) 1–23.
- [48] Sztandera K., Gorzkiewicz M., Klajnert-Maculewicz B., *Gold Nanoparticles in Cancer Treatment*, Mol. Pharm. 16 (2019) 1–23.
- [49] Chakraborty S., Ansar S.M., Stroud J.G., Kitchens C.L., *Comparison of Colloidal versus Supported Gold Nanoparticle Catalysis*, J. Phys. Chem. C. 122 (2018) 7749–7758.
- [50] Lee C., Kang Y., Lee K., Rim Kim S., Won D.J., Sung Noh J., Kyu Shin H., Keun Song C., Soo Kwon Y., So H.M., Kim J., *Molecular wires and gold nanoparticles as molewares for the molecular scale electronics*, Curr. Appl. Phys. 2 (2002) 39–45.
- [51] Wu Y., Li Y., Liu P., Gardner S., Ong B.S., *Studies of gold nanoparticles as precursors to printed conductive features for thin-film transistors*, Chem. Mater. 18 (2006) 4627–4632.
- [52] Maruyama O., Senda Y., Omi S., *Non-linear optical properties of titanium dioxide films containing dispersed gold particles*, J. Non. Cryst. Solids. 259 (1999) 100–106.
- [53] Sasai J., Hirao K., *Crystallization effect on non-linear optical response of silicate glass and glass-ceramics containing gold nanoparticles*, J. Non. Cryst. Solids. 290 (2001) 49–56.
- [54] Philip R., Chantharasupawong P., Qian H., Jin R., Thomas J., *Evolution of nonlinear optical properties: From gold atomic clusters to plasmonic nanocrystals*, Nano Lett. 12 (2012) 4661–4667.
- [55] Alex S., Tiwari A., *Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and applications-*
-

- A review*, J. Nanosci. Nanotechnol. 15 (2015) 1869–1894.
- [56] Saleh T.A., Gupta V.K., *Nanomaterial and Polymer Membranes: Synthesis, Characterization, and Applications*, Elsevier Inc., Cambridge, 2016.
- [57] Mansfield E., Kaiser D.L., Fujita D., Van de Voorde M., *Metrology and Standardization for Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations*, Wiley-VCH Verlag, Germany, 2017.
- [58] Shi D., Guo Z., Bedford N., *Nanomaterials and Devices*, William Andrew Publishing, 2014.
- [59] Zhong Z.J., *Optical Properties And Spectroscopy Of Nanomaterials*, World Scientific, 2009.
- [60] Zhang Q., *Carbon nanotubes and their applications*, Pan Stanford Publishing, 2012.
- [61] Ghosh S.K., Pal T., *Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications*, Chem. Rev. 107 (2007) 4797–4862.
- [62] Amendola V., Pilot R., Frasconi M., Maragò O.M., Iatì M.A., *Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review*, J. Phys. Condens. Matter. 29 (2017).
- [63] Valcárcel M., López-Lorente Á.I., *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*, Elsevier, 2014.
- [64] López-Muñoz G.A., Pescador-Rojas J.A., Ortega-Lopez J., Salazar J.S., Abraham Balderas-López J., *Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations*, Nanoscale Res. Lett. 7 (2012) 423–429.
- [65] Abadeer N.S., Brennan M.R., Wilson W.L., Murphy C.J., *Distance and plasmon wavelength dependent fluorescence of molecules bound to silica-coated gold nanorods*, ACS Nano. 8 (2014) 8392–8406.
- [66] Lee S.Y., Tsalu P.V., Kim G.W., Seo M.J., Hong J.W., Ha J.W., *Tuning Chemical Interface Damping: Interfacial Electronic Effects of Adsorbate Molecules and Sharp Tips of Single Gold Bipyramids*, Nano Lett. 19 (2019) 2568–2574.
- [67] Kinnan M.K., Chumanov G., *Plasmon coupling in two-dimensional arrays of silver nanoparticles: II. Effect of the particle size and interparticle distance*, J. Phys. Chem. C. 114 (2010) 7496–7501.
- [68] Louis C., Pluchery O., *Gold Nanoparticles for physics, chemistry and biology*, Imperial Collage Press, London, 2012.
- [69] Xia Y., Halas N.J., *Shape-Controlled Surface Plasmonic Nanostructures*, MRS Bull. 30 (2005) 338–348.
- [70] Jain P.K., Huang W., El-Sayed M.A., *On the universal scaling behavior of the distance decay of plasmon coupling in metal nanoparticle pairs: A plasmon ruler equation*, Nano Lett. 7 (2007) 2080–2088.
-

-
- [71] Zhang W., Li Q., Qiu M., *A plasmon ruler based on nanoscale photothermal effect*, *Opt. Express*. 21 (2013) 172–181.
- [72] Alarcon E.I., Griffith M., Udekwu K.I., *Silver Nanoparticle Applications in the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices*, Springer International Publishing, Switzerland, 2015.
- [73] Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J., *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55.
- [74] Kitching H., Kenyon A.J., Parkin I.P., *The interaction of gold and silver nanoparticles with a range of anionic and cationic dyes*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 6050–6059.
- [75] Rao F., Jia F., Lopez-Miranda A., Song S., Lopez-Valdivieso A., *Synthesis and Characterization of Silver Nanorods in Aqueous Sodium Dodecylsulfate Solutions*, *J. Dispers. Sci. Technol.* 33 (2012) 799–804.
- [76] Ferreira T.P.M., Nepomuceno N.C., Medeiros E.L.G., Medeiros E.S., Sampaio F.C., Oliveira J.E., Oliveira M.P., Galvão L.S., Bulhões E.O., Santos A.S.F., *Antimicrobial coatings based on poly(dimethyl siloxane) and silver nanoparticles by solution blow spraying*, *Prog. Org. Coatings*. 133 (2019) 19–26.
- [77] Polte J., Ahner T.T., Delissen F., Sokolov S., Emmerling F., Thünemann A.F., Kraehnert R., *Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation*, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1296–1301.
- [78] Pillai Z.S., Kamat P. V., *What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?*, *J. Phys. Chem. B.* (2003).
- [79] Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A., *Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited*, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 15700–15707.
- [80] Al Gharib S., Marignier J.-L., El Omar A.K., Naja A., Le Caer S., Mostafavi M., Belloni J., *Key Role of the Oxidized Citrate-Free Radical in the Nucleation Mechanism of the Metal Nanoparticle Turkevich Synthesis*, *J. Phys. Chem. C.* 123 (2019) 22624–22633.
- [81] Deepak F.L., *Metal nanoparticles and clusters: Advances in synthesis, properties and applications*, Springer International Publishing, Switzerland, 2017.
- [82] Polte J., Erler R., Thünemann A.F., Sokolov S., Ahner T.T., Rademann K., Emmerling F., Kraehnert R., *Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution*, *ACS Nano.* 4 (2010) 1076–1082.
-

-
- [83] Polte J., Tuaeov X., Wuithschick M., Fischer A., Thuenemann A.F., Rademann K., Kraehnert R., Emmerling F., *Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles*, ACS Nano. 6 (2012) 5791–5802.
- [84] Lide D.R., *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [85] Badhani B., Sharma N., Kakkar R., *Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications*, RSC Adv. 5 (2015) 27540–27557.
- [86] Yen G.-C., Duh P.-D., Tsai H.-L., *Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid*, Food Chem. 79 (2002) 307–313.
- [87] Kroes B.H., Van Den Berg A.J.J., Quarles Van Ufford H.C., Van Dijk H., Labadie R.P., *Anti-inflammatory activity of gallic acid*, Planta Med. 58 (1992) 499–504.
- [88] Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simões M., *Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria*, Microb. Drug Resist. 19 (2013) 256–265.
- [89] Yoosaf K., Itty Ipe B., Suresh C.H., George Thomas K., *In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media*, (2007).
- [90] Pacioni, N.L.; Borsarelli, C.D.; Rey, V.; Veglia A.V., *Silver Nanoparticle Synthesis methods*, Springer International Publishing, Cham, 2015.
- [91] Berti D., Palazzo G., *Colloidal foundations of nanoscience*, Elsevier B.V., Amsterdam, 2014.
- [92] Bakshi M.S., *How Surfactants Control Crystal Growth of Nanomaterials*, Cryst. Growth Des. 16 (2016) 1104–1133.
- [93] Ni C., Hassan P.A., Kaler E.W., *Structural characteristics and growth of pentagonal silver nanorods prepared by a surfactant method*, Langmuir. 21 (2005) 3334–3337.
- [94] Almora-Barrios N., Novell-Leruth G., Whiting P., Liz-Marzán L.M., López N., *Theoretical description of the role of halides, silver, and surfactants on the structure of gold nanorods*, Nano Lett. 14 (2014) 871–875.
- [95] Mourdikoudis S., Pallares R.M., Thanh N.T.K., *Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties*, Nanoscale. 10 (2018) 12871–12934.
- [96] Kumar N., Kumbhat S., *Essentials in Nanoscience & Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2016.
- [97] De Jonge N., Ross F.M., *Electron microscopy of specimens in liquid*, Nat. Nanotechnol. 6 (2011) 695–704.
-

-
- [98] Personick M.L., Langille M.R., Zhang J., Mirkin C.A., *Shape control of gold nanoparticles by silver underpotential deposition*, Nano Lett. 11 (2011) 3394–3398.
- [99] Stamplecoskie K.G., Scaiano J.C., *Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles*, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 1825–1827.
- [100] Bulavinets T., Varyshchuk V., Yaremchuk I., Bobitski Y., *Design and synthesis of silver nanoparticles with different shapes under the influence of photon flows*, Springer Proc. Phys. 210 (2018) 231–241.
- [101] Thomas S., Thomas R., Zachariah A.K., Mishra R.K., *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2017.
- [102] Philip D., *Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles*, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 75 (2010) 1078–1081.
- [103] Wei H., Hossein Abtahi S.M., Vikesland P.J., *Plasmonic colorimetric and SERS sensors for environmental analysis*, Environ. Sci. Nano. 2 (2015) 120–135.
- [104] Indrasekara A.S.D.S., Meyers S., Shubeita S., Feldman L.C., Gustafsson T., Fabris L., *Gold nanostar substrates for SERS-based chemical sensing in the femtomolar regime*, Nanoscale. 6 (2014) 8891–8899.
- [105] Du Y., Liu R., Liu B., Wang S., Han M.Y., Zhang Z., *Surface-enhanced raman scattering chip for femtomolar detection of mercuric ion (II) by ligand exchange*, Anal. Chem. 85 (2013) 3160–3165.
- [106] Lopez-Sanchez J.A., Dimitratos N., Hammond C., Brett G.L., Kesavan L., White S., Miedziak P., Tiruvalam R., Jenkins R.L., Carley A.F., Knight D., Kiely C.J., Hutchings G.J., *Facile removal of stabilizer-ligands from supported gold nanoparticles*, Nat. Chem. 3 (2011) 551–556.
- [107] Wagner J.M., *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011.
- [108] Bhagyaraj S.M., Oluwafemi O.S., Kalarikkal N., Thomas S., *Characterization of Nanomaterials - Advances and Key Technologies*, Elsevier Ltd, United Kingdom, 2018.
- [109] Kayal S., Ramanujan R. V., *Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery*, Mater. Sci. Eng. C. 30 (2010) 484–490.
- [110] Mansfield E., Tyner K.M., Poling C.M., Blacklock J.L., *Determination of nanoparticle surface coatings and nanoparticle purity using microscale thermogravimetric analysis*, Anal. Chem. 86 (2014) 1478–1484.
-

- [111] Mohanbaba S., Gurunathan S., *Differential biological activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria: A novel approach for antimicrobial therapy*, *Nanobiomaterials Antimicrob. Ther.* (2016) 193–227.
- [112] De Moura M.R., Mattoso L.H.C., Zucolotto V., *Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging*, *J. Food Eng.* 109 (2012) 520–524.
- [113] Gajbhiye S., Sakharwade S., *Silver Nanoparticles in Cosmetics*, *J. Cosmet. Dermatological Sci. Appl.* 6 (2016) 48–53.
- [114] Tulve N.S., Stefaniak A.B., Vance M.E., Rogers K., Mwilu S., LeBouf R.F., Schwegler-Berry D., Willis R., Thomas T.A., Marr L.C., *Characterization of silver nanoparticles in selected consumer products and its relevance for predicting children’s potential exposures*, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 218 (2015) 345–357.
- [115] De Matteis V., Cascione M., Toma C.C., Albanese G., De Giorgi M.L., Corsalini M., Rinaldi R., *Silver nanoparticles addition in poly(methyl methacrylate) dental matrix: Topographic and antimycotic studies*, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
- [116] Alarcon E.I., Ahumada M., *Nanoengineering Materials for Biomedical Uses*, Springer Nature, Switzerland, 2019.
- [117] Lima E., Guerra R., Lara V., Guzmán A., *Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for Escherichia coli and Salmonella typhi*, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 1–7.
- [118] Perrault S.D., Chan W.C.W., *In vivo assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 11194–11199.
- [119] Coutinho C., Somoza Á., *MicroRNA sensors based on gold nanoparticles*, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1807–1824.
- [120] Rivero P.J., Urrutia A., Goicoechea J., Arregui F.J., *Nanomaterials for Functional Textiles and Fibers*, *Nanoscale Res. Lett.* 10 (2015) 1–22.
- [121] IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, IUPAC, Research Triangle Park, NC, 2009.
- [122] Laborda F., Bolea E., Cepriá G., Gómez M.T., Jiménez M.S., Pérez-Arantegui J., Castillo J.R., *Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples*, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016) 10–32.
- [123] Torres-Martínez L.M., Kharissova O.V., Kharisov B.I., *Handbook of ecomaterials*, Springer Nature, Switzerland, 2019.
-

-
- [124] Ahumada M., Lissi E., Montagut A.M., Valenzuela-Henríquez F., Pacioni N.L., Alarcon E.I., *Association models for binding of molecules to nanostructures*, *Analyst*. 142 (2017) 2067–2089.
- [125] Amde M., Tan Z.-Q., Liu J., *Separation and size characterization of zinc oxide nanoparticles in environmental waters using asymmetrical flow field-flow fractionation*, *Talanta*. 200 (2019) 357–365.
- [126] Mudunkotuwa I.A., Anthony T.R., Grassian V.H., Peters T.M., *Accurate quantification of TiO_2 nanoparticles collected on air filters using a microwave-assisted acid digestion method*, *J. Occup. Environ. Hyg.* 13 (2016) 30–39.
- [127] Hagarová I., *Separation and quantification of metallic nanoparticles using cloud point extraction and spectrometric methods: a brief review of latest applications*, *Anal. Methods*. 9 (2017) 3594–3601.
- [128] Zänker H., Schierz A., *Engineered Nanoparticles and Their Identification Among Natural Nanoparticles*, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5 (2012) 107–132.
- [129] Hulanicki A., Geab S., Ingman F., *Chemical Sensors: definitions and classification*, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250.
- [130] Valcárcel M., *Principles of Analytical Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2000.
- [131] Zuber A., Purdey M., Schartner E., Forbes C., van der Hoek B., Giles D., Abell A., Monro T., Ebendorff-Heidepriem H., *Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method*, *Sensors Actuators B Chem.* 227 (2016) 117–127.
- [132] Cayuela A., Soriano M.L., Valcárcel M., *Reusable sensor based on functionalized carbon dots for the detection of silver nanoparticles in cosmetics via inner filter effect*, *Anal. Chim. Acta*. 872 (2015) 70–76.
- [133] Kumar Panigrahi S., Kumar Mishra A., *Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution*, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 41 (2019) 100318.
- [134] Belusso L.C.S., Lenz G.F., Fiorini E.E., Pereira A.J., Sequinel R., Bini R.A., Felix J.F., Schneider R., *Synthesis of silver nanoparticles from bottom up approach on borophosphate glass and their applications as SERS, antibacterial and glass-based catalyst*, *Appl. Surf. Sci.* 473 (2019) 303–312.
- [135] Kanwal Z., Raza M.A., Riaz S., Manzoor S., Tayyeb A., Sajid I., Naseem S., *Synthesis and*
-

- characterization of silver nanoparticle-decorated cobalt nanocomposites (Co@AgNPs) and their density-dependent antibacterial activity*, R. Soc. Open Sci. 6 (2019) 182135.
- [136] Shahzeydi A., Ghiaci M., Farrokhpour H., Shahvar A., Sun M., Saraji M., *Facile and green synthesis of copper nanoparticles loaded on the amorphous carbon nitride for the oxidation of cyclohexane*, Chem. Eng. J. 370 (2019) 1310–1321.
- [137] Husain S., Afreen S., Hemlata, Yasin D., Afzal B., Fatma T., *Cyanobacteria as a bioreactor for synthesis of silver nanoparticles-an effect of different reaction conditions on the size of nanoparticles and their dye decolorization ability*, J. Microbiol. Methods. 162 (2019) 77–82.
- [138] Philip A., Ankudze B., Pakkanen T.T., *A simple one-step fabrication of gold nanoparticles-based surface-enhanced Raman scattering substrates using rice grains*, Appl. Surf. Sci. 480 (2019) 229–234.
- [139] Acharya B., Chestnut M., Marek A., Smirnov A.I., Krim J., *A Combined QCM and AFM Study Exploring the Nanoscale Lubrication Mechanism of Silica Nanoparticles in Aqueous Suspension*, Tribol. Lett. 65 (2017) 115.
- [140] Koutsopoulos S., Barfod R., Eriksen K.M., Fehrmann R., *Synthesis and characterization of iron-cobalt (FeCo) alloy nanoparticles supported on carbon*, J. Alloys Compd. 725 (2017) 1210–1216.
- [141] Oh Y., Jeon I., Kwon H., Suh H., Yun D., Lee J., Song Y.J., Park S., *Selective growth of metal-free silicon nanowire mat by chemical vapor deposition on hexagonal boron nitride film*, Phys. B Condens. Matter. 561 (2019) 132–135.
- [142] Cheung K.Y., Gui S., Deng C., Liang H., Xia Z., Liu Z., Chi L., Miao Q., *Synthesis of Armchair and Chiral Carbon Nanobelts*, Chem. 5 (2019) 838–847.
- [143] Nindawat S., Agrawal V., *Fabrication of silver nanoparticles using Arnebia hispidissima (Lehm.) A. DC. root extract and unravelling their potential biomedical applications*, Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol. 47 (2019) 166–180.
- [144] Zhang H., Huang Y., Gu J., Keller A., Qin Y., Bian Y., Tang K., Qu X., Ji R., Zhao L., *Single particle ICP-MS and GC-MS provide a new insight into the formation mechanisms during the green synthesis of AgNPs*, New J. Chem. 43 (2019) 3946–3955.
- [145] Khan M.H., Unnikrishnan S., Ramalingam K., *Bactericidal potential of silver-tolerant bacteria derived silver nanoparticles against multi drug resistant ESKAPE pathogens*, Biocatal. Agric. Biotechnol. 18 (2019) 100939.
- [146] Molina Torres M.A., Pachón Gómez E.M., Fernández M.A., Veglia A.V., Pacioni N.L., *Role of*
-

- a cystine-based Gemini surfactant ligand in the synthesis of catalytic active silver nanoparticles*, *J. Mol. Liq.* 284 (2019) 110–116.
- [147] Ali S., Khan S.A., Eastoe J., Hussaini S.R., Morsy M.A., Yamani Z.H., *Synthesis, characterization, and relaxometry studies of hydrophilic and hydrophobic superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for oil reservoir applications*, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 543 (2018) 133–143.
- [148] Umut E., Coşkun M., Pineider F., Berti D., Güngüneş H., *Nickel ferrite nanoparticles for simultaneous use in magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia*, *J. Colloid Interface Sci.* 550 (2019) 199–209.
- [149] Robertson J.D., Rizzello L., Avila-Olias M., Gaitzsch J., Contini C., Magoń M.S., Renshaw S.A., Battaglia G., *Purification of Nanoparticles by Size and Shape*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27494.
- [150] Salafi T., Zeming K.K., Zhang Y., *Advancements in microfluidics for nanoparticle separation*, *Lab Chip.* 17 (2017) 11–33.
- [151] Mudalige T.K., Qu H., Sánchezsánchez-Pomales G., Sisco P.N., Linder S.W., *Simple Functionalization Strategies for Enhancing Nanoparticle Separation and Recovery with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1764–1772.
- [152] Krieg E., Weissman H., Shirman E., Shimoni E., Rybtchinski B., *A recyclable supramolecular membrane for size-selective separation of nanoparticles*, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 141–146.
- [153] Pitkänen L., Montoro Bustos A.R., Murphy K.E., Winchester M.R., Striegel A.M., *Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and quasi-elastic light scattering*, *J. Chromatogr. A.* 1511 (2017) 59–67.
- [154] Stephens J.R., Beveridge J.S., Williams M.E., *Analytical methods for separating and isolating magnetic nanoparticles*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 3280.
- [155] Anekthirakun P., Imyim A., *Separation of silver ions and silver nanoparticles by silica based-solid phase extraction prior to ICP-OES determination*, *Microchem. J.* 145 (2019) 470–475.
- [156] Diwakar P.K., Loper K.H., Matiaske A.-M., Hahn D.W., *Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of micro and nanoparticles*, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1110.
- [157] Brucker D., Leopold K., *Sizing silver nanoparticles in chicken meat using direct slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 4551–4558.
-

- [158] García-Figueroa A., Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., *Speciation of gold nanoparticles and total gold in natural waters: A novel approach based on naked magnetite nanoparticles in combination with ascorbic acid*, *Talanta*. 193 (2019) 176–183.
- [159] Pacioni N.L., Veglia A. V., *Analytical strategy to detect metal nanoparticles in mixtures without previous separation*, *Sensors Actuators B Chem.* 228 (2016) 557–564.
- [160] Mahmoudi M., Lohse S.E., Murphy C.J., Suslick K.S., *Identification of Nanoparticles with a Colorimetric Sensor Array*, *ACS Sensors*. 1 (2016) 17–21.
- [161] Cayuela A., Soriano M.L., Carrión M.C., Valcárcel M., *Functionalized carbon dots as sensors for gold nanoparticles in spiked samples: Formation of nanohybrids*, *Anal. Chim. Acta.* 820 (2014) 133–138.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 PROBLEMÁTICA

Como se presentó en el capítulo I, el progresivo interés en los nanomateriales, particularmente en las MNP, que se ha observado notoriamente en las últimas dos décadas, se debe principalmente a sus propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, en comparación con sus análogos de mayor tamaño, convirtiéndoles en excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas, electrónicas, ópticas y catalíticas, entre otras. Un efecto antagónico a los beneficios de la nanotecnología es el potencial daño en el medio ambiente que la misma puede causar. Por ejemplo, en una gran cantidad de organismos se ha observado el efecto tóxico *in vivo* e *in vitro* que generan nanopartículas basadas en carbono, de metales o de óxido de metales [1,2]. Los mecanismos celulares de toxicidad incluyen el daño físico, el estrés oxidativo, daño al ADN e interferencias con el plegamiento de las proteínas. En experimentos *in vivo* se ha podido observar inflamación, fibrosis y respuestas alérgicas [3,4]. Las nanopartículas poseen la habilidad de penetrar las barreras biológicas y pueden distribuirse en forma diferencial en el cuerpo de acuerdo a su tamaño [1,2]. A su vez, la biodisponibilidad y toxicidad de las partículas liberadas al medio ambiente al final de su vida útil dependen de [5,6]:

- ✓ Su identidad y estructura química.
- ✓ La interacción con las matrices de los productos de consumo.

- ✓ Las transformaciones de las nanopartículas durante la utilización del producto en que se encuentran.
- ✓ Las transformaciones e interacciones en ambientes biológicos y naturales luego de la liberación o desecho de las nanopartículas.

Existen varios caminos por medio de los cuales las MNP pueden llegar al medio ambiente: mediante emisiones intencionales o no intencionales en las corrientes de desechos sólidos y líquidos de los hogares, de sitios de manufactura, de plantas de tratamientos de desechos y emisiones al aire. Los derrames no deseados y la gestión de residuos de NM también deben considerarse como vías para la introducción de MNP en el medio ambiente, como así también los productos comerciales donde se adicionan nanomateriales. Estas MNP eventualmente, encontrarán la manera de ingresar al medio ambiente, pero aún existen muchos interrogantes respecto al destino e impacto de las mismas para hacer alguna predicción al respecto [7].

Las investigaciones más recientes reflejan que los nanomateriales atraviesan por transformaciones fisicoquímicas extensas cuando se encuentran en el medio ambiente y que estas nuevas especies resultantes son relevantes para evaluar los riesgos asociados [5]. Se observó que las nanopartículas son propensas a adherirse a superficies y que estos procesos pueden afectar su destino y toxicidad. Por ejemplo, uno de estos procesos incluye la **homoagregación** para formar agregados de nanopartículas, o la **heteroagregación** con componentes naturales como en el caso de arcillas, biosólidos o materia orgánica natural [7]. Existen algunos modelos matemáticos para estudiar la agregación de los nanomateriales, como el modelo DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) clásico o extendido. El modelo DLVO clásico tiene en cuenta las fuerzas de van der Waals y electrostáticas, mientras que el extendido incluye fuerzas adicionales, entre las que se encuentran las interacciones estéricas y equilibrios ácido base. En función de las propiedades de las nanopartículas, como la naturaleza, su potencial zeta y las propiedades de los ligandos que las estabilizan, los modelos DLVO permiten obtener una explicación cualitativa en la tendencia de agregación [7]. Por ejemplo, es posible predecir que el grado de homoagregación y de unión a superficies con carga similar aumentará a medida que el pH se acerque al punto isoeléctrico de la nanopartícula o cuando se produzca el apantallamiento de la carga en medios de fuerza iónica alta para nanopartículas metálicas cargadas [7]. Sin embargo, este modelo posee limitaciones, por ejemplo, no puede emplearse para partículas muy pequeñas (< 5 nm de diámetro). Por ello se requieren de modelos empíricos que sean capaces de predecir la agregación de las

MNP en la naturaleza, como así también incorporar la distribución de tamaños y la composición de los agregados en orden de generar modelos evaluadores de riesgo [7].

Además de la agregación, la dispersión, disolución, sedimentación, reacciones fotoquímicas producidas por la luz solar, reacciones de transformación, degradación por organismos vivos e interacción con coloides naturales u otros elementos son algunos de los procesos que son necesarios conocer para predecir el destino, biodisponibilidad y ecotoxicidad de las MNP en sistemas acuáticos (figura 2.1). A su vez, la fuerza iónica y el pH son factores claves que afectan el comportamiento de MNP en sistemas acuáticos [7]. Cuando nanopartículas cargadas se encuentran cercanas unas a otras, estas se repelen debido a la repulsión electrostática. Las fuerzas de repulsión superan a la unión débil producida por las fuerzas de van der Waals, responsables de la aglomeración de las mismas [8]. Sin embargo, la funcionalización electrostática ocasionada por contra iones presentes en las soluciones acuosas conduce a la reducción de la fuerza de repulsión y en consecuencia, disminuye la estabilidad de la nanopartícula hacia la agregación. El término estabilidad puede referirse a la **estabilidad coloidal**, que corresponde a la persistencia de especies individuales en un medio donde no se producen interacciones para generar estructuras secundarias; o la **estabilidad química**, que es la resistencia a los cambios químicos (ej: oxidación, disolución, cambios de fase, etc.) [9]. El anión citrato es uno de los agentes estabilizantes más empleados para nanopartículas metálicas, y varios estudios reportaron que AgNP funcionalizadas con citrato de sodio fueron desestabilizadas por iones presentes en ambientes acuosos llevando a agregación y formación de partículas más grandes [10].

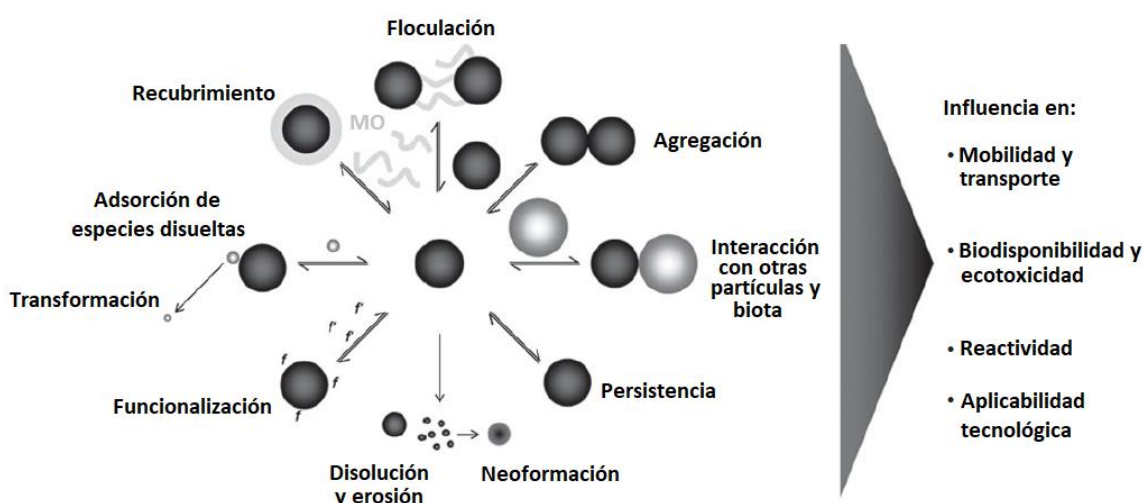


Figura 2.1. Interacciones, reacciones químicas y transformaciones posibles para las nanopartículas en el medio ambiente.

Debido a las transformaciones que sufren los nanomateriales, la detección y cuantificación de estos contaminantes emergentes en el medio ambiente se convierte en un gran desafío para la química analítica. Actualmente, se cuentan con diversas metodologías expuestas en el capítulo I para llevar a cabo esta tarea. Sin embargo, otro desafío consiste en el desarrollo de métodos más simples, de bajo costo y que no requieran de procesos complejos de separación y preconcentración de las muestras [11–13].

Las propiedades espectroscópicas únicas de las nanopartículas metálicas pueden ser explotadas para la resolución de los analitos en mezclas complejas y proveer los fundamentos para su cuantificación [11]. Algunas de estas propiedades corresponden a los fenómenos relacionados a la banda del plasmón superficial de las MNP [14–16] y los cambios fotofísicos que este experimenta al interactuar con moléculas orgánicas, como sondas moleculares fluorescentes [17]. Por ejemplo, se han observado fenómenos de desactivación o de incremento de la fluorescencia dependiendo de la ubicación, de la separación entre la molécula y la superficie de la NP, así como de la orientación del dipolo molecular respecto a la superficie metálica [18,19].

2.2 HIPÓTESIS

En base a la problemática expuesta, se propuso el desarrollo de diferentes estrategias analíticas para la diferenciación, detección y cuantificación de NM a partir de la evaluación de diferentes sistemas híbridos entre NP y sistemas moleculares, que presentaran cambios significativos en las propiedades físicas y químicas de los componentes involucrados de forma tal que faciliten la diferenciación y detección de NP, principalmente, en mezclas acuosas como había sido recientemente observado en nuestro laboratorio con el empleo de ácido rosólico y fucsina básica [20].

La hipótesis planteada fue, que producto de la interacción entre los interruptores o sondas moleculares seleccionados y las NP, se observarían diferencias en las propiedades físicas y químicas de los constituyentes del sistema. Este efecto podría ser evaluado mediante el empleo de diferentes técnicas, por ejemplo, espectroscópicas. Se estimó que la interacción de los sistemas moleculares con diferentes tipos de NP (variando tamaño, ligandos, morfología, etc.) dependería de las características del NM empleado, así como de estímulos externos y de

esta manera permitiría encontrar las condiciones para detectar y diferenciar entre NP presentes en mezclas acuosas.

Por otra parte, en búsqueda de evaluar otras formas de nanopartículas y diferentes ligandos sobre la superficie metálica, se propuso emplear un surfactante gémuni como estabilizante de nanopartículas de plata esperando obtener nanopartículas con propiedades diferentes y novedosas. Es conocido que algunos surfactantes son capaces de modular la morfología de los nanomateriales y actuar como ligandos de las nanopartículas metálicas [21]. Sin embargo, no existían demasiados ejemplos del empleo de surfactantes gémuni aniónicos y su rol en la síntesis de AgNP. Por ello, también nos planteamos evaluar las mejores condiciones para la síntesis de AgNP en presencia de un surfactante gémuni derivado de cistina, y sus potenciales aplicaciones.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general dentro del cual se enmarcó esta tesis doctoral fue desarrollar nuevas estrategias analíticas que permitan la diferenciación, detección y cuantificación de nanomateriales sintéticos (NM), como potenciales contaminantes ambientales, en la búsqueda de métodos estandarizados para el análisis de estos compuestos.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Examinar el rol de un surfactante gémuni en la síntesis de nuevas MNP.
- ✓ Caracterizar y evaluar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas y sus potenciales aplicaciones.
- ✓ Evaluar la interacción de sondas moleculares con MNP por técnicas espectroscópicas.
- ✓ Determinar diferentes parámetros analíticos que contribuyan a la validación de los métodos propuestos.

2.4 ORGANIZACIÓN DE RESULTADOS

En los siguientes capítulos se desarrolla la metodología y resultados obtenidos para lograr los objetivos propuestos en esta tesis doctoral.

En el Capítulo III se detalla la síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con el surfactante gémini aniónico ácido 3,3'-disulfanedil bis (2-decamido propanoico), denominado SDDC, las cuáles se designan como AgNP@SDDC. También, se presenta la caracterización realizada para evaluar cómo este surfactante está ligado a la superficie de las nanopartículas sintetizadas.

En el Capítulo IV, se describen las propiedades catalíticas de las AgNP@SDDC observadas en dos reacciones: la reducción de 4-nitrofenol por borohidruro de sodio y en la generación de nuevas nanopartículas de plata en soluciones de crecimiento que contienen el surfactante gémini.

En el Capítulo V, se profundiza en las interacciones de un compuesto azo (Para Red) y de dos sondas fluorescentes (Rodamina B y Rodamina 6G) con diferentes MNP de Au y Ag.

En el Capítulo VI, se presenta la determinación de los diferentes parámetros analíticos (límite de detección, límite de cuantificación, rango lineal, influencia de los interferentes, ensayos de recuperación) para los sistemas seleccionados en el capítulo V.

Finalmente, en el Capítulo VII, se exponen las conclusiones generales de este trabajo de Tesis Doctoral.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Liu Y., Zhao Y., Sun B., Chen C., *Understanding the toxicity of carbon nanotubes*, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 702–713.
- [2] Schrand A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F., *Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment*, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2 (2010) 544–568.
- [3] Hubbs A.F., Mercer R.R., Benkovic S.A., Harkema J., Sriram K., Schwegler-Berry D., Goravanahally M.P., Nurkiewicz T.R., Castranova V., Sargent L.M., *Nanotoxicology—A Pathologist's Perspective*, *Toxicol. Pathol.* 39 (2011) 301–324.
- [4] Nel A., Xia T., Meng H., Wang X., Lin S., Ji Z., Zhang H., *Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: Use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening*, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 607–621.
- [5] Louie S.M., Ma R., Lowry G. V., *Transformations of Nanomaterials in the Environment*, *Front. Nanosci.* 7 (2014) 55–87.

- [6] Nowack B., Ranville J.F., Diamond S., Gallego-Urrea J.A., Metcalfe C., Rose J., Horne N., Koelmans A.A., Klaine S.J., *Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment*, Environ. Toxicol. Chem. 31 (2012) 50–59.
- [7] Xing B., Vecitis C.D., Senesi N., *Engineered Nanoparticles and the Environment - Biophysicochemical Processes and Toxicity*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2016.
- [8] Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., *Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies*, J. Nanoparticle Res. 11 (2009) 77–89.
- [9] Baalousha M., Lead J., *Characterization of nanomaterials in complex environmental and biological media*, Elsevier Ltd, Amsterdam, 2015.
- [10] El Badawy A.M., Luxton T.P., Silva R.G., Scheckel K.G., Suidan M.T., Tolaymat T.M., *Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions*, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 1260–1266.
- [11] Howard A.G., *On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment*, J. Environ. Monit. 12 (2010) 135–142.
- [12] Mudalige T.K., Qu H., Sánchezsánchez-Pomales G., Sisco P.N., Linder S.W., *Simple Functionalization Strategies for Enhancing Nanoparticle Separation and Recovery with Asymmetric Flow Field Flow Fractionation*, Anal. Chem. 87 (2015) 1764–1772.
- [13] Pitkänen L., Montoro Bustos A.R., Murphy K.E., Winchester M.R., Striegel A.M., *Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and quasi-elastic light scattering*, J. Chromatogr. A. 1511 (2017) 59–67.
- [14] Stewart M.E., Anderton C.R., Thompson L.B., Maria J., Gray S.K., Rogers J.A., Nuzzo R.G., *Nanostructured plasmonic sensors*, Chem. Rev. 108 (2008) 494–521.
- [15] Cobley C.M., Chen J., Cho E.C., Wang L. V, Xia Y., *Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications*, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 44–56.
- [16] Klajn R., Stoddart J.F., Grzybowski B.A., *Nanoparticles functionalised with reversible molecular and supramolecular switches*, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 2203–2237.
- [17] Anger P., Bharadwaj P., Novotny L., *Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence*, Phys. Rev. Lett. 96 (2006) 113002.
- [18] Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business
-

Media, New York, 2006.

- [19] Amendola V., Meneghetti M., *Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 3805–3821.
- [20] Pacioni N.L., Veglia A. V., *Analytical strategy to detect metal nanoparticles in mixtures without previous separation*, *Sensors Actuators B Chem.* 228 (2016) 557–564.
- [21] Bakshi M.S., *How Surfactants Control Crystal Growth of Nanomaterials*, *Cryst. Growth Des.* 16 (2016) 1104–1133.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON UN SURFACTANTE GÉMINI



3.1 ANTECEDENTES

En los últimos años, ha crecido el interés por los surfactante gémini (SG) debido a sus propiedades superiores en comparación con los surfactantes convencionales de una sola cadena, entre las que se encuentran una concentración micelar crítica menor, mayor viscoelasticidad y una mayor eficiencia en disminuir la tensión superficial del agua en comparación al surfactante monomérico del que proviene [1]. En general, la estructura química de los SG se indica usando las siglas $C_m-C_s-C_m$; donde m se refiere al número de átomos de carbono de las cadenas que forman las colas y s corresponde al número de átomos de carbono del espaciador.

De los SG empleados como ligandos en la síntesis de AgNP, la mayoría de los ejemplos incluye a surfactantes catiónicos, principalmente (tabla 3.1). Por ejemplo, Xu *et al.* obtuvieron AgNP esféricas monodispersas y estables en condiciones de micelas inversas empleando un SG catiónico denominado 18 – 3 (OH) – 18 [2]. A su vez, empleando un surfactante

C_m-2-C_m con cadenas hidrocarbonadas de diferente largo, Bakshi observó que la cadena más corta ($m: 10$) favoreció la formación de nanocilindros a bajas concentraciones de semillas en el crecimiento de AgNP@citrato mediado por semillas [3]. Por otra parte, cuando se utilizó

un SG 12-2-12 como agente estabilizante, se obtuvieron AgNP esféricas con una buena actividad catalítica [4].

Existen pocos ejemplos donde surfactantes gémuni aniónicos se hayan utilizado como ligandos de AgNP. Por ejemplo, Negm *et al.* utilizaron SG con cabezas polares de grupos fosfatos y espaciador de polietilenglicol para realizar un intercambio de ligando por citrato y mejorar la estabilización de las MNP [5]. Recientemente, Srivastava *et al.* emplearon una mezcla de micelas como agentes estabilizantes de AgNP y observaron que a mayor proporción de SG aniónico en la micela se previene la agregación de las nanopartículas [6]; mientras que Cheng *et al.* obtuvieron micropartículas con buena actividad SERS usando un SG aniónico $C_m - Ar - C_m$ (Ar: arilo) y un agente reductor suave [7].

Dentro de los SG, los basados en aminoácidos presentan en muchos casos algunas ventajas adicionales al ser compatibles con el medio ambiente, biodegradables, no tóxicos y solubles en agua, características que permiten su aplicación en cosmética, farmacia y biomedicina [8,9]. De esta forma, el empleo de SG basados en aminoácidos naturales como agentes estabilizantes de NP es un campo que merece ser explorado, ya que estos compuestos podrían brindarles propiedades diferentes o mejoradas a las NP sintetizadas. Dentro de estos SG, los derivados de acil aminoácidos fueron los más investigados históricamente. La mayoría de ellos exhiben propiedades excelentes como una gran solubilidad en agua y biodegradabilidad [10]. Actualmente, el conocimiento es escaso en lo referido a la síntesis y las propiedades de surfactantes derivados de cistina, cisteína, cistamina y arginina [11]. Por ejemplo, didecámido cistina de sodio (SDDC) es un surfactante derivado de un aminoácido natural y está compuesto por cistina (cisteína dimérica, Cys) como cabeza polar y espaciador, y dos colas hidrofóbicas de 10 carbonos (10-Cys-Cys-10) (figura 3.1). Este surfactante puede complejarse con ciertos metales (Cu, Ag, Fe), originando vesículas con propiedades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas y negativas [12] y se observó que es altamente eficiente como emulsificante para brindar alta estabilidad térmica [13], lo que podría extender su aplicación a la síntesis de nuevos materiales.

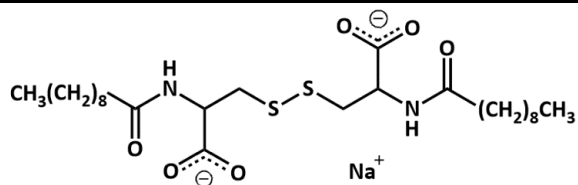


Figura 3.1. Estructura química del surfactante gémíni aniónico didecamido cistina de sodio (SDDC).

Debido a las interesantes características de los SG, en este capítulo se presentarán los estudios realizados empleando el surfactante gémíni SDDC como ligando y agente estabilizante en la síntesis de AgNP.

Tabla 3.1. Compilación de las síntesis de AgNP estabilizadas con surfactantes gémuni.

Surfactante gémuni	Condiciones experimentales	Tamaños/nm	Forma	λ^{SPR}/nm	ξ/mV	Ref.
18-3(OH)-18 (catiónico)	NaBH ₄ ; micelas inversas; 2 h. agitación	7,1	esferas	406	-	[2]
10-2-10; 12-2-12; 14-2-14 (catiónico)	Semillas de AgNP, ácido ascórbico, AgNO ₃ e NaHO	esferas: 37-48 nm; cilindros: 2,8 a 6,6 (RA)	esferas, cilindros, cintas	420	-	[3]
16-s-16 s: 2, 4, 5, 12 (catiónico)	Semillas de AgNP, ácido ascórbico, AgNO ₃ e NaHO	5,5 a 3,9 (RA)	cilindros	600 a 450 (longitudinal)	-	[14]
12-2-12 (catiónico)	NaBH ₄ , 10 h. agitación	11	esferas	401	-35	[4]
16-Im-s-Im-16; s: 2, 5, 6, 12 (catiónico); Im: imidazolío	NaBH ₄	3 a 6	esferas; elipsoides	410 a 480	-	[15]
16-2(O)2-16 (catiónico)	Semillas de AgNP, AgNO ₃ , ácido ascórbico, NaHO, 20 min agitación	2,3 (RA)	cilindros	417	-31,4	[16]
16-6-16 (catiónico)	NaBH ₄ , 30 min agitación	10	esferas	400	+49,2	[17]
16-6-16; 14-6-14; 12-6-12 (catiónico)	glucosa, NaHO, 60°C 1h agitación	16,2 a 19,6	esferas	400 a 420	+31 a +42	[18]
12-s-12; s: 2, 4, 6, 8, 10, 12 (catiónico)	NaBH ₄ , agitación	50 a 115 (hidrodinámico)	cercanas a esferas	400 a 417	+58	[19]
C _m -Amida derivada-C _m m: 12, 14, 16 (catiónico)	Intercambio de ligando para semillas AgNP@citrato, 24 h agitación	18 a 28	esféricas	420	+30 a +42	[20]
8-9-8; 12-9-12; 16-9-16; 18-9-18 (catiónico)	Intercambio de ligando para semillas AgNP@citrato, 24 h agitación	6,1 a 23,3	cercanas a esferas	410 a 435	-57 a -81	[5]
C _m -Ar-C _m ; m: 8, 10, 12, 14 (aniónico)	ácido ascórbico, 5 min agitación, 1 h sin perturbación	2000	micropartículas	-	-	[7]
Agregados mixtos CPM: Ace(m)-2-Ace(n); m= 10, 12; n= 12 (aniónico)	NaBH ₄ , 1 min agitación	177 a 380	agregados	410 a 435	-	[6]

RA = relación de aspecto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Examinar el rol de un surfactante gémuni derivado de aminoácido en la síntesis de nuevas MNP.
- ✓ Caracterizar y evaluar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se utilizaron como se recibieron: AgNO₃ grado analítico (BioPack), borohidruro de sodio (Tetrahedron), NaOH (95%, Cicarelli). El surfactante SDDC fue sintetizado de acuerdo a la literatura [21] y generosamente provisto por las Dras. Erica Pachón Gómez y Mariana Fernández, del Dpto de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Se empleó agua ultrapura obtenida de un instrumento Millipore-MilliQ (resistividad, 25°C: 18,2 MΩ cm).

3.3.2 Instrumentos

Todos los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 1800 en un rango de longitudes de onda de 200-800 nm utilizando una celda de cuarzo (1 cm de paso óptico).

Las imágenes de Microscopia Electrónica de Transmisión fueron obtenidas usando un microscopio electrónico TEM-Jeol 1120, de 80 kV de voltaje de aceleración en grillas de cobre cubiertas con carbono (300 *mesh*, Electron Microscopy).

El potencial Z se registró en un Analizador de Partículas Delsa™ Nano S (Beckman Coulter) a temperatura ambiente, tomando 5 mediciones promedio.

La centrifugación se realizó en una Centrífuga Eppendorf 5804, rotor 11,5 cm.

Los espectros infrarrojos (FT-IR) se tomaron de un Microscopio Nicolet iN10: 16 scans, resolución de 16 cm⁻¹, ganancia de la muestra 1,0; apertura 80.

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un analizador termogravimétrico modulado Hi-Res 145 TGA 2950 bajo atmósfera de nitrógeno en un rango de 50 °C – 600 °C a una rampa de temperatura de 10 °C / minuto.

El espectro Raman se registró en un microscopio confocal Horiba LabRaman con un objetivo 100x (NA = 0,12) en una geometría de retrodispersión. El tiempo de exposición fue de 10 s con una resolución de 4 cm^{-1} y 10 o 20 acumulaciones para SDDC y AgNP@SDDC, respectivamente. La longitud de onda de irradiación empleada fue de 514 nm para SDDC y 633 nm para AgNP@SDDC correspondientes a las líneas láser de Argon y He-Ne, respectivamente.

El espectro fotoelectrónico de rayos X se obtuvo usando un Espectrómetro Fotoelectrónico de Rayos X K-Alpha (Thermo Fisher Scientific) con una fuente monocromática de rayos X Al-K α , $h\nu = 1486,6$ eV. Los espectros “survey” y de alta resolución se recolectaron usando 150, 13 eV (para C) y 50 eV (para O, S, Ag y N) de energía de banda, respectivamente. Los espectros de alta resolución se resolvieron con el paquete de software XPST de Igor Pro 8.02[®] (WaveMetrics, Inc.) usando funciones Gaussian-Lorentziana (70%:30%). Debido a los efectos de sobrecarga en las mediciones, se empleó la energía de enlace de C1s para carbonos alifáticos (284,8 eV) como referencia y se corrigieron todos los espectros en función de la misma.

El espectrofotómetro UV-vis, el analizador de partículas, la centrífuga, el analizador termogravimétrico y el microscopio confocal forman parte del equipamiento disponible del Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC). El microscopio infrarrojo forma parte del equipamiento del Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA), mientras que el microscopio electrónico se encuentra en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Centro Regional Córdoba y el Espectrómetro Fotoelectrónico de Rayos X en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis por Rayos X (LAMARX).

3.3.3 Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC

Las nanopartículas de plata se sintetizaron agregando borohidruro de sodio (600 μL , 0,01 M) cada 30 segundos durante 3 minutos a una solución de nitrato de plata (5 mL, 1 mM) y surfactante SDDC (15 mL; 3,35 mM) en agua milliQ, bajo fuerte agitación. Con el agregado del borohidruro, la solución cambió de color transparente a marrón oscuro. Se dejó bajo agitación por 30 segundos más luego del agregado completo de NaBH_4 . Las nanopartículas se concentraron y separaron del resto del surfactante por centrifugación. Se tomaron alícuotas de 5-6 mL y se centrifugaron a 2688 rcf (4000 rpm) por 30 minutos. Se descartó el

sobrenadante y los “*pellets*” se redispersaron en 4 – 5 mL de agua milliQ en tubos Falcon™ de polipropileno.

3.3.4 Caracterización de las nanopartículas

El estudio de las distribuciones de tamaños de las partículas se realizó a partir de imágenes de TEM al depositar 20 μ L de soluciones coloidales de AgNP en grillas de cobre cubiertas de carbono de 300 *mesh*; previamente secadas. Todas las imágenes se analizaron usando el software ImageJ® y contando entre 200-1000 partículas.

Los espectros de absorbancia se registraron para identificar la máxima longitud de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de la banda de resonancia de plasmon superficial (SPR) y su ancho máximo a media altura. También, se calculó el coeficiente de absorción molar en agua y en mezclas agua – etanol; y se obtuvo el potencia zeta. El coeficiente de absorción molar a 25° C se determinó realizando soluciones de diferente concentración de AgNP@SDDC en agua (0,15 – 0,46 nM) y en mezclas etanol:agua 1:9 (0,1 – 0,25 nM) y se emplearon cubetas de 4 cm de paso óptico. Las aproximaciones matemáticas para estimar la concentración de las nanopartículas se especifican en el Anexo A. El potencial zeta se determinó usando la celda del Analizador de Partículas Delsa™ Nano S. El protocolo de medida involucró enjuagar con etanol y agua, en ese orden. Luego, se agregó aproximadamente 0,7 mL de AgNP@SDDC dispersadas en agua MilliQ a temperatura ambiente. El potencial Z reportado corresponde a un promedio de 5 mediciones independientes.

Se realizaron espectros FTIR de muestras sólidas de SDDC y AgNP@SDDC, en discos de KBr, para evaluar la presencia de SDDC como agente estabilizante de las nanopartículas y se estimó la cantidad de SDDC por nanopartícula mediante TGA de 1,555 mg de AgNP@SDDC liofilizadas bajo las condiciones mencionadas previamente. Como control, se registró el termograma del SDDC. También, se recolectaron los espectros Raman y XPS de estas AgNP@SDDC.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRESENCIA DE SDDC

Se realizó una novedosa síntesis de nanopartículas de plata empleando borohidruro de sodio como agente reductor y el surfactante gémuni aniónico SDDC como estabilizante de acuerdo al procedimiento experimental especificado en la sección anterior. El SDDC se empleó

a una concentración superior a su concentración micelar crítica (cmc: 0,28 mM a pH 7,00; 0,35 mM a pH 9,16) [21] y actuó como molde y estabilizante en la síntesis, manteniéndose una relación molar de Ag^+ : SDDC de 1:10. Esta relación se eligió en base a experimentos previos reportados en bibliografía, donde se determinó la relación óptima para el estudio de la interacción de cationes con surfactantes gémuni [12].

Al adicionar NaBH_4 a soluciones acuosas incoloras de Ag^+ y SDDC, las mismas viraban a dispersiones marrones transparentes. Este cambio en la coloración indicaría la formación de nanopartículas metálicas [22], que luego fueron caracterizadas por diferentes técnicas con el objetivo de evaluar su morfología, contenido de ligando y como este interacciona con la superficie de la nanopartícula.

3.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON SDDC

3.4.2.1 Morfología y caracterización espectroscópica de las nanopartículas

Los espectros de absorbancia de las nanopartículas sintetizadas se presentan en la figura 3.2. En ella, se observan bandas de absorbancia cuya posición de la longitud de onda máxima es atribuida a la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) para AgNP [23], a 454 nm. Luego de la centrifugación, esta banda se desplazó a 417 nm y se hizo más estrecha. Para confirmar que la centrifugación de la muestra permite separar AgNP con una distribución de tamaños más homogénea, se determinó el ancho máximo a media altura (FWHM) pre y post centrifugación. El FWHM de la banda SPR es un indicador de la dispersidad de las nanopartículas. Un valor de FWHM alto se atribuye a una distribución de tamaños amplia, lo que implica mayor polidispersidad; por el contrario, valores más bajos indican monodispersidad de las partículas [24]. Las AgNP@SDDC pre-centrifugadas presentaron un FWHM mayor (FWHM = 188 nm) que las AgNP@SDDC post-centrifugadas (FWHM = 169 nm), lo que indicaría que se obtuvieron nanopartículas más monodispersas luego del proceso de centrifugación.

En las imágenes de TEM de las partículas centrifugadas (figura 3.3) se observan AgNP esféricas de 12 nm de diámetro promedio (desviación estándar, $SD = 3$). Este pequeño tamaño puede atribuirse a las pequeñas vesículas que forma el surfactante al encontrarse a concentraciones mayores que su CMC [12], dirigiendo la síntesis a la formación de nanopartículas esféricas y controlando el tamaño final.

La magnitud del potencial zeta es un factor predictivo de la estabilidad coloidal de la solución. En general, valores mayores a +30 mV o menores a -30 mV indicarían alta estabilidad de la solución hacia la floculación. Por otra parte, dispersiones con valores más cercanos a cero, se agregarán eventualmente debido a interacciones entre las partículas (van der Waals, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, entre otros) [25]. Las dispersiones de AgNP@SDDC presentaron un valor de potencial zeta de -27 mV (SD = 6); lo que indicaría cierta estabilidad coloidal de las AgNP y resistencia a la agregación.

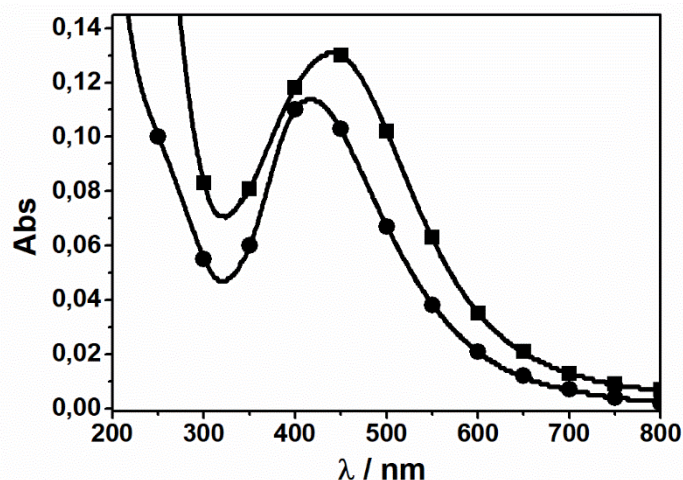


Figura 3.2. Espectro de absorción de una suspensión coloidal de AgNP@SDDC pre-centrifugadas (■) y post-centrifugadas (●) a 25,0 °C. Paso óptico = 1 cm.

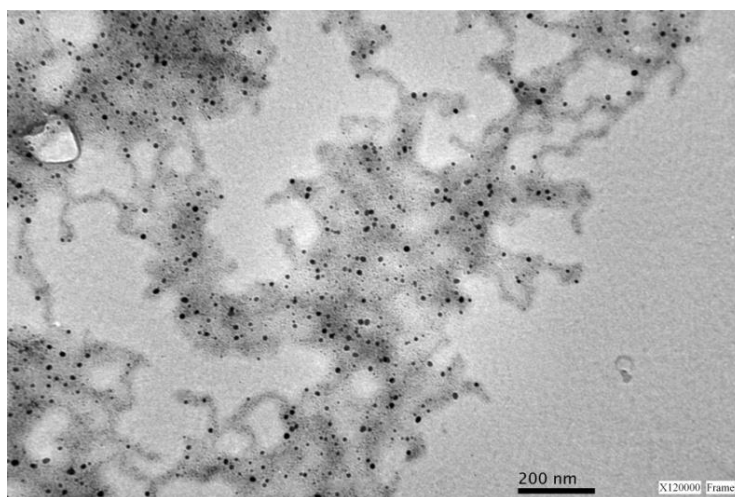


Figura 3.3. Imagen representativa de TEM de AgNP@SDDC a 25,0 °C. El “debris” (material no nanoparticulado) de fondo se atribuye principalmente al surfactante remanente.

También, monitoreamos la banda SPR en función del tiempo para muestras de AgNP@SDDC centrifugadas y almacenadas a temperatura ambiente (figura 3.4). Luego de 16 días, se observó un leve incremento de la absorción de las nanopartículas, la disminución del ancho de banda (FWHM menores) y el desplazamiento hipsocrómico de la banda SPR (417 a 411 nm). Aunque la longitud de onda máxima de absorción de la banda SPR haya disminuido, el tamaño promedio de las AgNP (a los 30 días) presentó un incremento significativo ($p < 0,05$) a 17 nm (SD = 4) sin observarse agregación (Figura 3.5). Este incremento del diámetro promedio se atribuye al efecto de maduración de Ostwald [26]. En comparación con otros surfactantes aniónicos gémíni, donde se obtienen partículas del orden de micrones [7] o agregados mayores a 100 nm [6], usando SDDC obtenemos nanopartículas esféricas dispersas de pequeño tamaño, lo que indicaría que la naturaleza del surfactante empleado en la síntesis de nanopartículas influye considerablemente en el tamaño de la NP resultante.

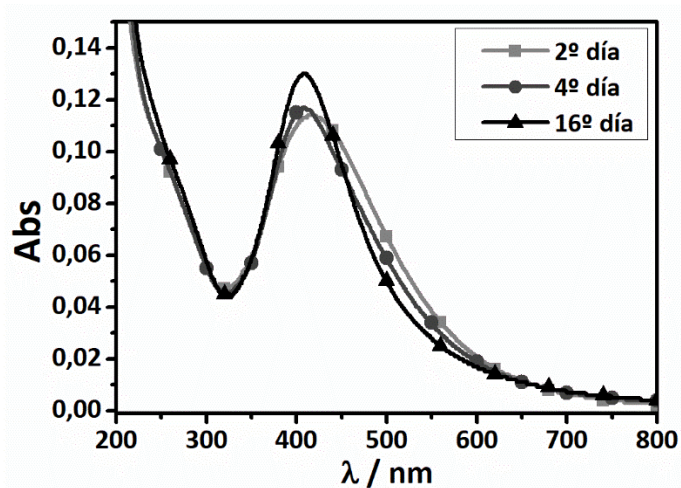


Figura 3.4. Espectro de absorción de AgNP@SDDC a diferentes tiempos luego de la síntesis a 25,0 °C.

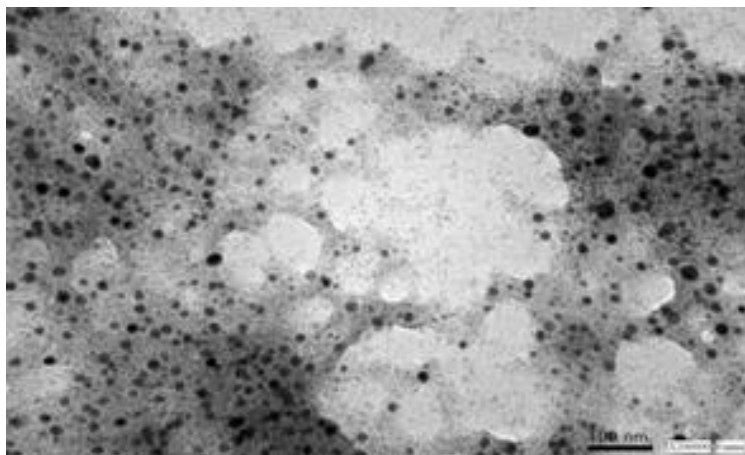


Figura 3.5. Imagen representativa de TEM de AgNP@SDDC luego de 30 días de la síntesis. El debris de fondo se atribuye al surfactante presente en la muestra.

Por otra parte, determinamos el coeficiente de absorción molar (ϵ) de las AgNP@SDDC en agua luego de transcurridos 15 días de su síntesis a 411 nm (figura 3.6). Se obtuvo un valor de $(4,2 \pm 0,7) 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ estimando la concentración de nanopartículas con el algoritmo NANOpoLC [27] con modificaciones menores. Este algoritmo considera la polidispersidad del nanomaterial al momento de estimar la concentración del mismo en solución, que es importante para disminuir la variabilidad de resultados entre lotes diferentes de nanopartículas sintetizadas. Si no se considera polidispersidad [28], se obtiene un valor de ϵ de $(3,6 \pm 0,7) 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. De la misma forma, este valor no se modifica significativamente con la adición de etanol 10 % v/v ($[4 \pm 1] 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 410 nm).

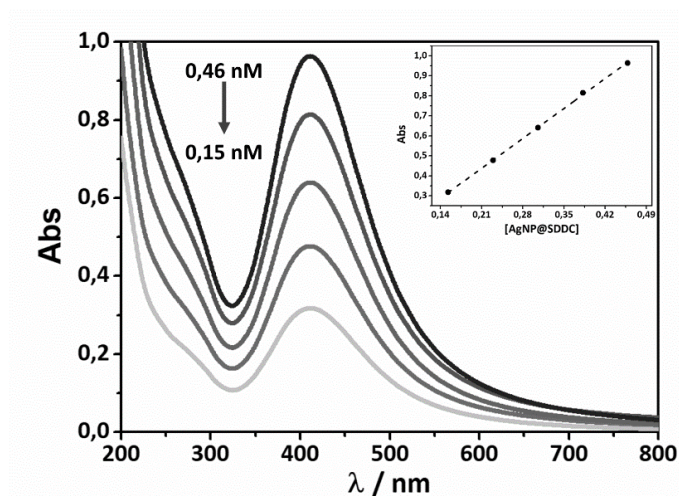


Figura 3.6. Espectros de absorción de AgNP@SDDC a diferentes concentraciones ($[AgNP@SDDC] = 0,15-0,46 \text{ nM}$) a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. Gráfico interno: curva de absorbancia vs la concentración molar de AgNP@SDDC a 411 nm.

3.4.2.2 Estudio de la funcionalización de nanopartículas de plata por SDDC

Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier

Para evaluar el rol del surfactante SDDC como ligando, se registró el espectro FT-IR de las AgNP@SDDC (figura 3.7), donde se observan las señales atribuidas a los grupos funcionales de SDDC. Por ejemplo, se visualiza la vibración de alargamiento N-H (amida secundaria) a 3177 cm^{-1} , la banda amida I correspondiente a la vibración de alargamiento del C=O a 1628 cm^{-1} y la banda amida II resultante de la interacción entre la flexión N-H y el alargamiento C-N del grupo C-N-H a 1530 cm^{-1} [29]. También, se observaron las señales producto del estiramiento asimétrico y simétrico del grupo carboxilato a 1584 cm^{-1} y 1397 cm^{-1} , respectivamente. Entre $3000\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$, se encontraron las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión del enlace C-H de las cadenas alquílicas del surfactante.

Al comparar los espectros de SDDC y AgNP@SDDC se observan diferencias en la intensidad de las señales de ambos debido a la diferencia en la concentración de los mismos al registrar los espectros. Por ello, se analizaron las relaciones entre la intensidad de las bandas de los espectros de SDDC comparadas con las obtenidas para AgNP@SDDC. Se observaron diferencias mayores al 40% en el caso de las señales que involucran a las vibraciones de los grupos carboxilatos y amida secundaria del surfactante (tabla 3.2). Esto sugiere que las diferencias observadas se deben a que la interacción del SDDC con la superficie metálica ocurre por medio de estos grupos funcionales.

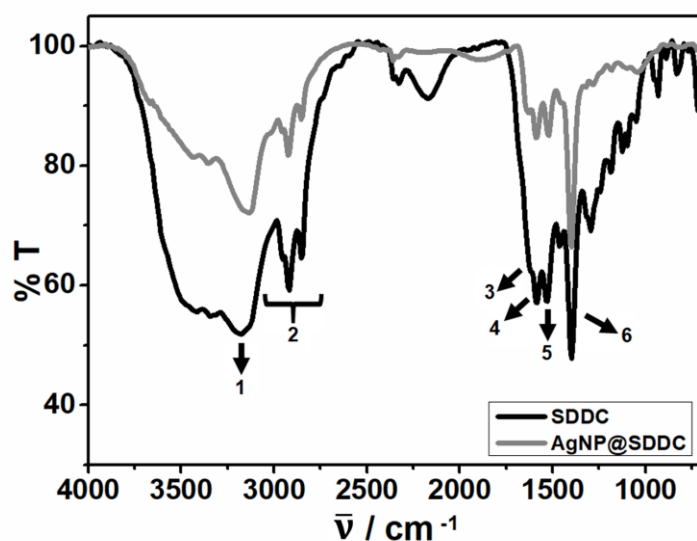


Figura 3.7. Espectro FT-IR de SDDC (negro) y AgNP@SDDC (gris). La numeración indica las frecuencias vibracionales principales que se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.2. Bandas de FT-IR (cm^{-1}) para SDDC y AgNP@SDDC.

Entrada	Posición de la banda (cm^{-1})	Asignación	Absorción Relativa ^{SDDC}	Absorción Relativa ^{AgNP@SDDC}	% Δ^a
1	3177	$\bar{\nu}_{\text{N-H}}$ de amida secundaria	-	-	-
2	3000-2750	$\bar{\nu}_{\text{C-H}}$ alquílica	-	-	-
3	1628	$\bar{\nu}_{\text{C=O}}$ (Amida I)	0,84 ^b	0,71 ^b	15
			0,85 ^c	0,74 ^c	13
			0,64 ^d	0,28 ^d	56
			0,71 ^e	0,35 ^e	51
4	1584	$\bar{\nu}_{\text{asC=O}}$ carboxilato	1,00 ^c	1,04 ^c	4
			0,76 ^d	0,40 ^d	53
			0,85 ^e	0,50 ^e	41
5	1530	$\delta_{\text{N-H}}$ y $\bar{\nu}_{\text{C-N}}$ (Amida II)	0,76 ^d	0,39 ^d	51
			0,84 ^e	0,45 ^e	53
6	1397	$\bar{\nu}_{\text{sC=O}}$ carboxilato	1,11 ^e	1,24 ^e	12

^a Diferencia entre la Absorción Relativa^{SDDC} y la Absorción Relativa^{AgNP@SDDC} expresada en porcentaje.

^b Absorción Relativa de esta banda con respecto a la banda 4.

^c Absorción Relativa de esta banda con respecto a la banda 5.

^d Absorción Relativa de esta banda con respecto a la banda 6.

^e Absorción Relativa de esta banda con respecto a la banda 1.

Análisis Termogravimétrico

La proporción de Ag y SDDC en la composición de las AgNP@SDDC se evaluó empleando la técnica de análisis termogravimétrico, cuyo termograma se observa en la figura 3.8A, y se comparó con la pérdida de masa de SDDC (figura 3.8B). En el termograma de las AgNP@SDDC se puede apreciar un cambio de masa notable (47%) entre 200 y 400°C atribuido a la pérdida de masa del surfactante gémuni, comparable con la pérdida de masa observada en el termograma de SDDC, y un 50% de residuo correspondiente al contenido metálico de la nanopartícula. Luego, se estimó la densidad del ligando para nanopartículas de 12 nm en función de la composición porcentual de Ag y SDDC en las nanopartículas.

Para realizar el termograma se emplearon 1,56 mg de AgNP@SDDC liofilizadas. De esta masa, 0,78 mg corresponden a las AgNP (50%), 0,73 mg al SDDC (47%) y 0,05 mg a posibles impurezas o al contenido de agua de la muestra (3%).

El peso molecular (PM) de una nanopartícula puede ser estimado empleando el peso atómico de la Ag (107,9 *uma*), el número de Avogadro (N_A) y el número de átomos por nanopartícula (N) (ecuación 3.1).

$$PM_{AgNP} = N \times 107,9 \times 1,66 \cdot 10^{-24} \times N_A \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde N puede ser previamente determinado empleando la ecuación 3.2,

$$N = \left(\frac{R_{NP}}{r_{Ag}} \right)^3 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde R_{NP} y r_{Ag} corresponden al radio promedio de la nanopartícula y al radio atómico, respectivamente. En este caso, R_{NP} es 5,9 nm y r_{Ag} es 0,144 nm; por lo tanto, reemplazando en la ecuación 3.2, se obtiene que cada partícula posee 68781 átomos. Empleando la ecuación 3.1, se calcula que el PM_{AgNP} es de $7,42 \times 10^6$ g/mol.

La cantidad de SDDC ($PM = 592,26$ g/mol) por mol de AgNP se calculó usando la ecuación 3.3, donde m_{SDDC} y m_{Ag} corresponden a la masa en gramos de SDDC y Ag (determinada por TGA) por nanopartícula, respectivamente.

$$\frac{\text{moles SDDC}}{\text{moles NP}} = \frac{PM_{AgNP} \times m_{SDDC}}{PM_{SDDC} \times m_{Ag}} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Empleando la ecuación 3.3, se obtiene un valor de 11800 moles de SDDC por mol de AgNP, lo que es equivalente a la cantidad de moléculas de SDDC por nanopartícula.

Finalmente, se calculó el valor de recubrimiento de superficie, normalizado respecto al área superficial, obteniéndose un valor de 26 moléculas nm^{-2} . En este caso, al asumir una forma esférica y un diámetro promedio de 12 nm; el área superficial de la nanopartícula puede ser determinada usando la ecuación 3.4; obteniéndose un valor de 452,4 nm^2 .

$$\text{área superficial} = 4\pi R^2 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

El cociente del número de moléculas de SDDC/nanopartícula dividido por el área superficial es el valor de recubrimiento de superficie normalizado.

Conocer el grado de recubrimiento de la superficie de nanopartículas funcionalizadas es información útil que en escasas ocasiones se informa en la bibliografía. Por ejemplo, se ha reportado que el grado de recubrimiento para AuNP (5-100 nm) funcionalizadas con ácido 3-mercaptopropiónico es de 7,8 nm^{-2} y analizadas por ICP-OES [30]. También, se informaron densidades de recubrimiento de 4,97 nm^{-2} , 4,58 nm^{-2} y 2,20 nm^{-2} de ácido

mercaptoundecanoico, ácido mercaptohexanoico y ácido tioctico, respectivamente, sobre AuNP y estudiadas por XPS [31]. Por otra parte, Lanterna *et al.* observaron que el grado de cubrimiento de AuNP funcionalizadas con compuestos heterocíclicos de azufre rondaba entre las 2 a 5 moléculas nm^{-2} [32]. También, postularon que el cambio en el grado de recubrimiento incrementaba a medida que aumenta el largo de la cadena lateral del ligando debido a interacciones de van der Waals en las cadenas más largas. A partir de esto y de la información obtenida mediante las aproximaciones matemáticas expuestas, es posible inferir que el surfactante posee un alto grado de empaquetamiento sobre la AgNP. Este empaquetamiento tan compacto se podría atribuir a que el SDDC interacciona con la superficie metálica a través de una configuración vertical monodentada (figura 3.9) en lugar de un enlace bidentado [33].

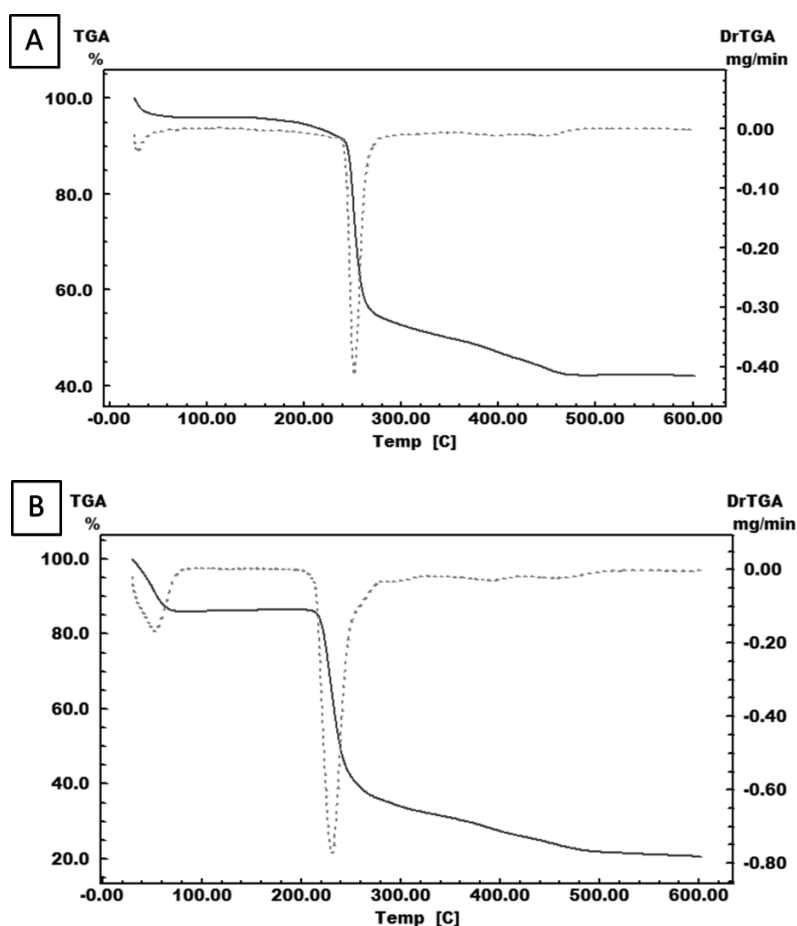


Figura 3.8. Curvas de TGA (—) y su correspondiente DTG (- - -) para AgNP@SDDC liofilizadas (A) y SDDC (B) bajo atmósfera de N_2 . La rampa de calentamiento fue de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

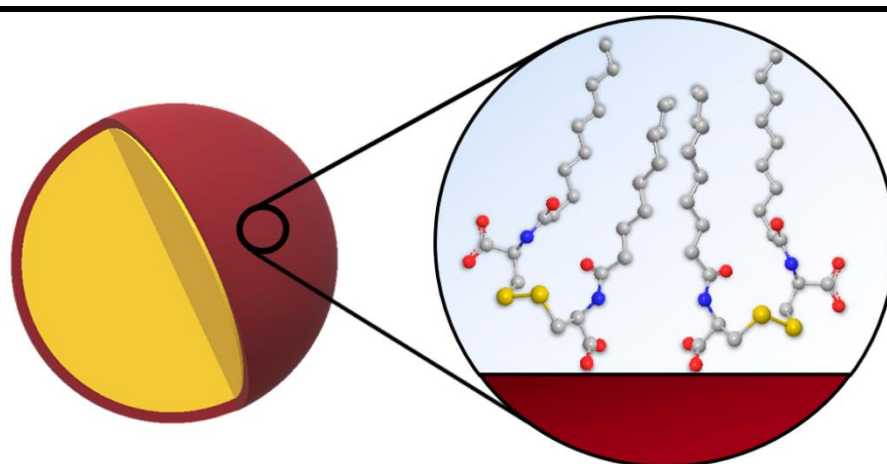


Figura 3.9. Representación gráfica del modelo propuesto para la absorción de SDDC en la superficie metálica sugerido en base a la información obtenida a partir de los datos de TGA y SERS. Los resultados permiten inferir la unión monodentada a través de un grupo carboxilato.

Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

Para obtener más información de la composición de las AgNP se obtuvieron los espectros XPS barriendo un amplio rango de energías de enlace para el surfactante y las AgNP@SDDC (figura 3.10). Se observaron las señales correspondientes a carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre en la muestra, lo que confirma la presencia de SDDC en la superficie de la nanopartícula metálica.

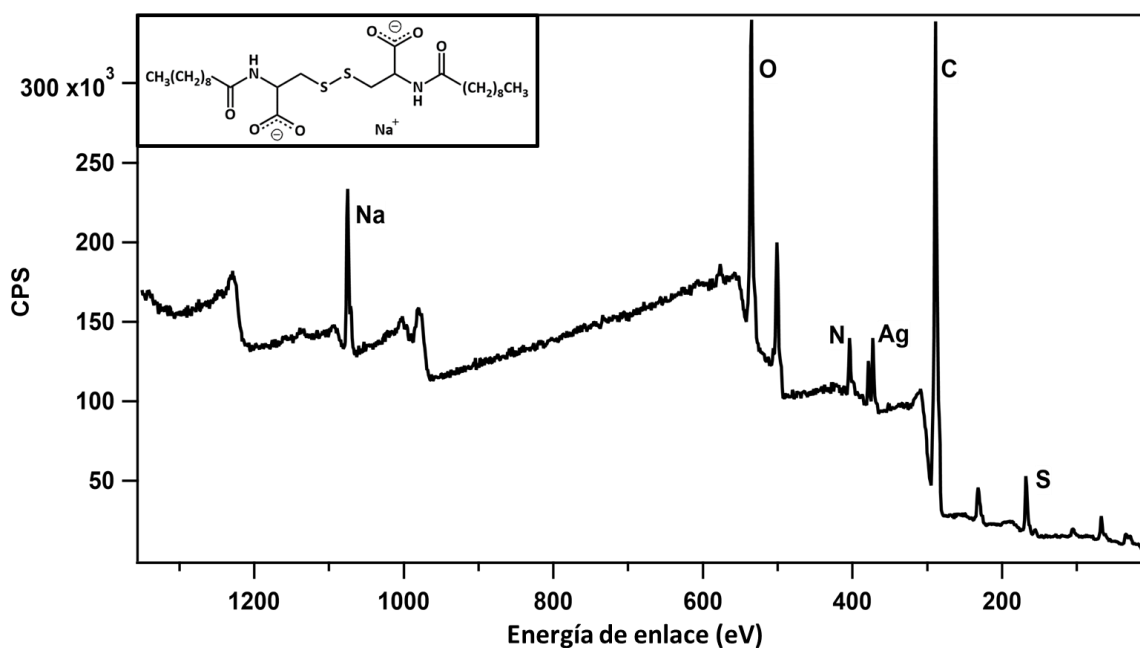


Figura 3.10. Espectro XPS de AgNP@SDDC. Se observan las señales que corresponden a los elementos que componen el surfactante (imagen interna). CPS: cuentas por segundo.

Se realizaron espectros de alta resolución de cada elemento encontrado en la muestra de MNP (figura 3.11). La sobrecarga de la muestra analizada generó deformaciones en los espectros de alta resolución y desplazamiento de la señal de cada especie a energías de enlace más altas. Si bien este efecto se corrigió empleando como referencia la señal de carbonos alifáticos a 284,8 eV, sólo fue posible realizar la identificación de las especies presentes en la superficie de las AgNP@SDDC. Debido a la deformación de las señales observadas, no fue posible realizar la cuantificación de los componentes de la muestra.

De esta manera, en la figura 3.11A se observan las señales de las especies -C-C-/-CH₂- y COO⁻ a 284,8 eV y 287,9 eV; respectivamente. Las señales correspondientes al grupo -NH a 400 eV se presentan en la figura 3.11B y al oxígeno del grupo -COO⁻ a 531,3 eV en la figura 3.11C. En la figura 3.11D, se observan señales a 368,3 eV y 374,3 eV que corresponden a Ag 3d_{5/2} y Ag 3d_{3/2}, respectivamente. Finalmente, el espectro de alta resolución del S 2p (figura 3.11E) presentó dos señales a 163,2 eV y 164,4 eV que se asignaron a S 2p_{3/2} y 2p_{1/2}, coincidentes con las señales observadas para el puente disulfuro de la cistina [34]. Este estudio nos permitió confirmar la presencia del surfactante en la superficie de la NP.

Debido a que, mediante esta técnica, no es posible distinguir entre la señal proveniente de puentes disulfuro o de enlaces tioles (poseen la misma energía de enlace); se requirió de experimentos adicionales para evaluar si el puente disulfuro del surfactante se conservaba o no. Para ello se realizó espectroscopia Raman y SERS, descriptas a continuación.

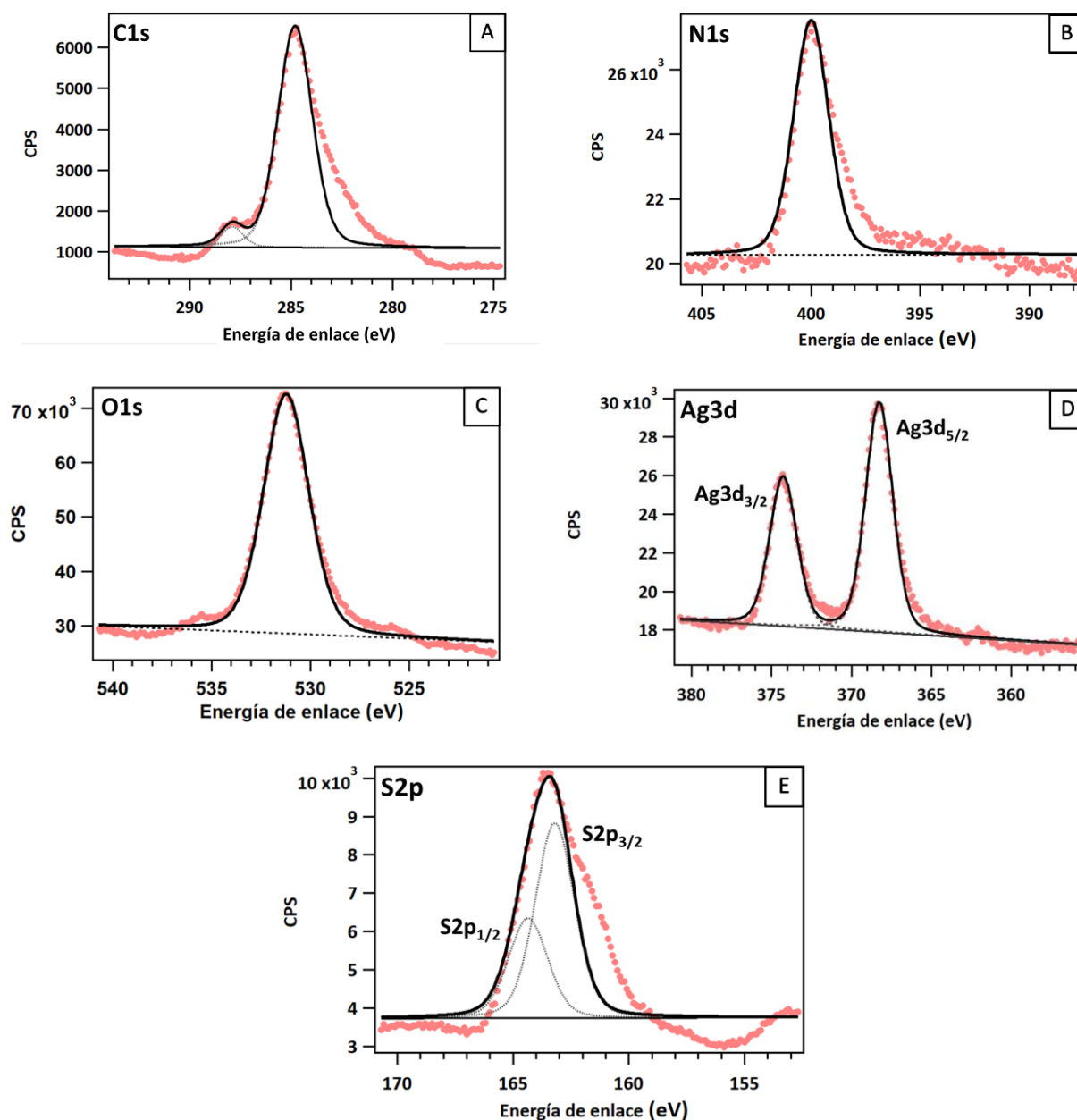


Figura 3.11. Espectros de XPS de alta resolución de C1s (A), N1s (B), O1s (C), Ag3d (D) y S2p (E). CPS: cuentas por segundo. En color (●●●) se observa el espectro experimental y en negro (—) el ajuste de los valores experimentales.

Espectroscopia Raman y Espectroscopia Raman intensificada por la superficie

Por otra parte, se realizó espectroscopia Raman con el objetivo de obtener información sobre la orientación del surfactante con respecto a la superficie de la NP y sobre el estado del puente disulfuro. En la figura 3.12 se observa el espectro Raman del SDDC (A) y el espectro SERS de las AgNP@SDDC (B). En el espectro de SDDC se puede observar la señal correspondiente al estiramiento del puente disulfuro del surfactante a 512 cm^{-1} , que está

presente en las AgNP@SDDC a 476 cm^{-1} . Entre otras, las señales del espectro Raman de SDDC correspondientes a 1371 cm^{-1} y 668 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento simétrico del grupo carbonilo del carboxilato y al estiramiento C-S, respectivamente.

En el caso de las AgNP@SDDC, se observa el incremento de la señal del grupo C=O del carboxilato del surfactante y la ausencia de la señal correspondiente al enlace C-S. Como se describió en el capítulo I, el incremento de las señales depende de la distancia del adsorbato a la superficie metálica y a menor distancia mayor es el incremento que se obtiene. Por lo tanto, se presume que el surfactante interactúa con la superficie de la nanopartícula por una interacción monodentada mediada por el grupo carboxilato del SDDC. Se propone este tipo de interacción debido a que se observa la conservación del enlace S-S en la nanopartícula metálica. Si se considera una interacción bidentada, el grupo S-S se encontraría muy cerca de la superficie metálica, lo que favorecería su clivaje y desaparecería la señal a 476 cm^{-1} [33]. La presencia de esta señal apoya la premisa de una interacción monodentada. Los valores de desplazamiento Raman, observados para la señal de estiramiento del enlace S-S en las AgNP@SDDC, podrían ser el resultado de una conformación rígida para este enlace, posiblemente como consecuencia del gran empaquetamiento de SDDC en la superficie de la NP [33].

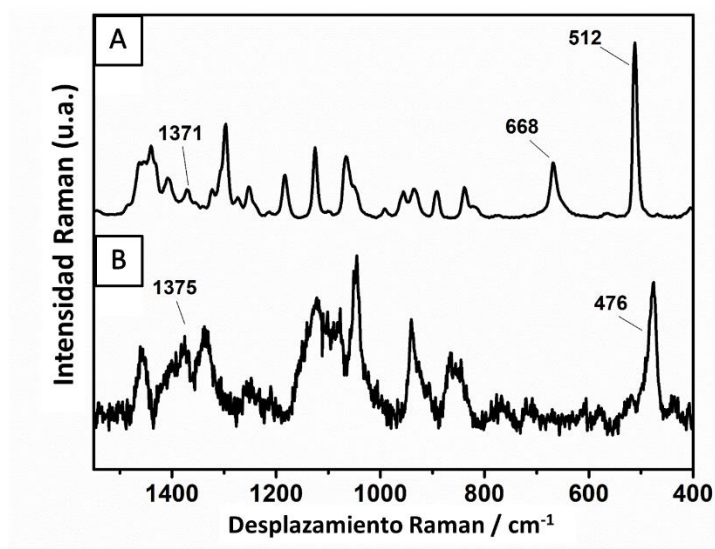


Figura 3.12. (A) Espectro Raman de SDDC sólido (excitación a 514 nm). (B) Espectro SERS de AgNP@SDDC liofilizadas (excitación a 633 nm).

3.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ En presencia de SDDC se obtienen AgNP esféricas de 12 nm que resultan estables a la agregación en dispersiones acuosas.
- ✓ El contenido de Ag y SDDC por partícula determinado corresponde a 50% Ag y 47% SDDC, equivalente a unas 11800 moléculas de SDDC por AgNP.
- ✓ La prevalencia de SDDC sobre la superficie metálica fue confirmada por FT-IR, XPS y SERS.
- ✓ En base a los resultados obtenidos por TGA, FTIR y SERS, se evidencia que SDDC interacciona mediante una unión monodentada vía el grupo carboxilato, conservando intacto el enlace disulfuro y con un alto grado de empaquetamiento.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fan H., Han F., Liu Z., Qin L., Li Z., Liang D., Ke F., Huang J., Fu H., *Active control of surface properties and aggregation behavior in amino acid-based Gemini surfactant systems*, J. Colloid Interface Sci. 321 (2008) 227–234.
 - [2] Xu J., Han X., Liu H., Hu Y., *Synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by gemini surfactant*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 273 (2006) 179–183.
 - [3] Bakshi M.S., *Room temperature surfactant assisted crystal growth of silver nanoparticles to nanoribbons*, J. Nanosci. Nanotechnol. 10 (2010) 1757–1765.
 - [4] He S., Chen H., Guo Z., Wang B., Tang C., Feng Y., *High-concentration silver colloid stabilized by a cationic gemini surfactant*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 429 (2013) 98–105.
 - [5] Negm N.A., Tawfik S.M., Abd-Elaal A.A., *Synthesis, characterization and biological activity of colloidal silver nanoparticles stabilized by gemini anionic surfactants*, J. Ind. Eng. Chem. 21 (2015) 1051–1057.
 - [6] Srivastava A., Liu C., Fang H., Lv J., Qiao W., *Interaction and binding efficiency of cationic drug chlorpheniramine maleate – anionic amino acid gemini surfactants mixture as media for the synthesis of silver nanoparticles*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 529 (2017) 686–695.
-

- [7] Cheng Y., Liu X., Lei Q., Li X., Dong J., *Development of novel anionic Gemini surfactants and application in fabricating hierarchical silver microparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy*, J. Colloid Interface Sci. 505 (2017) 1074–1081.
- [8] Pérez L., Pinazo A., Pons R., Infante M., *Gemini surfactants from natural amino acids*, Adv. Colloid Interface Sci. 205 (2014) 134–155.
- [9] Bordes R., Holmberg K., *Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention?*, Adv. Colloid Interface Sci. 222 (2015) 79–91.
- [10] Mhaskar S.Y., Prasad R.B.N., Lakshminarayana G., *Synthesis of N-acyl amino acids and correlation of structure with surfactant properties of their sodium salts*, J. Am. Oil Chem. Soc. 67 (1990) 1015–1019.
- [11] Yoshimura T., Sakato A., Tsuchiya K., Ohkubo T., Sakai H., Abe M., Esumi K., *Adsorption and aggregation properties of amino acid-based N-alkyl cysteine monomeric and N, N'-dialkyl cystine gemini surfactants*, J. Colloid Interface Sci. 308 (2007) 466–473.
- [12] Pachón Gómez E.M., *Sistemas autoensamblados de surfactantes Gemini. Síntesis, caracterización y aplicaciones*, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), 2018.
- [13] Fan H., Meng L., Wang Y., Wu X., Liu S., Li Y., Kang W., *Superior thermal stability gel emulsion produced by low concentration Gemini surfactant*, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 384 (2011) 194–199.
- [14] Bhattacharya S., Biswas J., *Role of spacer lengths of gemini surfactants in the synthesis of silver nanorods in micellar media*, Nanoscale. 3 (2011) 2924–2930.
- [15] Datta S., Biswas J., Bhattacharya S., *How does spacer length of imidazolium gemini surfactants control the fabrication of 2D-Langmuir films of silver-nanoparticles at the air-water interface?*, J. Colloid Interface Sci. 430 (2014) 85–92.
- [16] Tiwari A.K., Gangopadhyay S., Chang C.H., Pande S., Saha S.K., *Study on metal nanoparticles synthesis and orientation of gemini surfactant molecules used as stabilizer*, J. Colloid Interface Sci. 445 (2015) 76–83.
- [17] Siddiq A.M., Parandhaman T., Begam A.F., Das S.K., Alam M.S., *Effect of gemini surfactant (16-6-16) on the synthesis of silver nanoparticles: A facile approach for antibacterial application*, Enzyme Microb. Technol. 95 (2016) 118–127.
- [18] Li D., Fang W., Zhang Y., Wang X., Guo M., Qin X., *Stability and Thermal Conductivity Enhancement of Silver Nanofluids with Gemini Surfactants*, Ind. Eng. Chem. Res. 56 (2017) 12369–12375.
-

- [19] Pisárčik M., Jampílek J., Lukáč M., Horáková R., Devínsky F., Bukovský M., Kalina M., Tkacz J., Opravil T., *Silver nanoparticles stabilised by cationic gemini surfactants with variable spacer length*, *Molecules*. 22 (2017).
- [20] Shaban S.M., Abd-Elaal A.A., *Studying the silver nanoparticles influence on thermodynamic behavior and antimicrobial activities of novel amide Gemini cationic surfactants*, *Mater. Sci. Eng. C*. 76 (2017) 871–885.
- [21] Cabana Saavedra L.C., Pachón Gómez E.M., Oliveira R.G., Fernández M.A., *Aggregation behaviour and solubilization capability of mixed micellar systems formed by a gemini lipoamino acid and a non-ionic surfactant*, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 533 (2017) 41–47.
- [22] Kumar N., Kumbhat S., *Essentials in Nanoscience & Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2016.
- [23] Alarcon E.I., Griffith M., Udekwu K.I., *Silver Nanoparticle Applications in the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices*, Springer International Publishing, Switzerland, 2015.
- [24] Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S., *Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy*, *RSC Adv.* 4 (2014) 3974–3983.
- [25] Nimesh S., Chandra R., Gupta N., *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, Elsevier Ltd, Duxford, 2017.
- [26] Hornyak G.L., Dutta J., Tibbals H.F., Rao A., *Introduction to nanoscience*, CRC Press, Boca Raton, 2008.
- [27] Lazurko C., Ahumada M., Valenzuela-Henríquez F., Alarcon E.I., *NANoPoLC algorithm for correcting nanoparticle concentration by sample polydispersity*, *Nanoscale*. 10 (2018) 3166–3170.
- [28] Pacioni N.L., González-Béjar M., Alarcón E., McGilvray K.L., Scaiano J.C., *Surface Plasmons Control the Dynamics of Excited Triplet States in the Presence of Gold Nanoparticles*, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 6298–6299.
- [29] Nakanishi K., *Infrared absorption spectroscopy, practical*, Holden-Day, Tokyo, 1962.
- [30] Elzey S., Tsai D.H., Rabb S.A., Yu L.L., Winchester M.R., Hackley V.A., *Quantification of ligand packing density on gold nanoparticles using ICP-OES*, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 145–149.
-

- [31] Ivanov M.R., Haes A.J., *Anionic functionalized gold nanoparticle continuous full filling separations: Importance of sample concentration*, Anal. Chem. 84 (2012) 1320–1326.
- [32] Lanterna A.E., Coronado E.A., Granados A.M., *When nanoparticle size and molecular geometry matter: Analyzing the degree of surface functionalization of gold nanoparticles with sulfur heterocyclic compounds*, J. Phys. Chem. C. 116 (2012) 6520–6529.
- [33] López-Tobar E., Hernández B., Ghomi M., Sanchez-Cortes S., *Stability of the disulfide bond in cystine adsorbed on silver and gold nanoparticles as evidenced by SERS data*, J. Phys. Chem. C. 117 (2013) 1531–1537.
- [34] Salles R.C.M., Coutinho L.H., Da Veiga A.G., Sant’Anna M.M., De Souza G.G.B., *Surface damage in cystine, an amino acid dimer, induced by keV ions*, J. Chem. Phys. 148 (2018) 045107.

NANOPARTÍCULAS DE PLATA FUNCIONALIZADAS CON SDDC COMO CATALIZADORES

IV

4.1 NANOPARTÍCULAS COMO CATALIZADORES

El término “catálisis” fue introducido por Berzelius en 1893 para clasificar a ciertas reacciones químicas cuyo progreso estaba condicionado por sustancias adicionales que no formaban parte de los productos de reacción [1]. Actualmente, la **catálisis** se conoce como el proceso de introducir una especie química a una reacción para incrementar su velocidad. Esta especie, conocida como catalizador, provee una vía de reacción alternativa con una energía de activación menor y no se consume en el transcurso de la reacción. La catálisis posee una enorme significancia tecnológica, al reducir tiempos de reacción y costos en la producción de energía, la industria química y la tecnología ambiental [2].

En general, la catálisis se clasifica en homogénea, cuando todos los componentes de la reacción se encuentran en una sola fase; o heterogénea, cuando al menos existen dos fases en la reacción. En los últimos años, el progreso de la nanociencia y la nanotecnología llevó al surgimiento de la **nano-catálisis**, cuando esta es *mediada por nanopartículas*; la cual se encuentra de alguna manera entre las catálisis homogénea y heterogénea [3].

Con la nano-catálisis se cumplen dos condiciones importantes. Primero, los electrones de valencia del sitio activo del nanocatalizador están altamente confinados, condición que diferencia a los catalizadores en la escala nanométrica en relación a su material masivo.

Segundo, los nanocatalizadores están diseñados en condiciones controladas, donde la actividad, especificidad y selectividad de un catalizador puede ser modificada modulando el tamaño de la partícula, mediante la incorporación de átomos diferentes, cambiando la carga de la partícula o modificando sus propiedades magnéticas [1].

En los últimos años, una de las aplicaciones más importantes para las AgNP consiste en la catálisis de reacciones químicas. Últimamente, se ha incrementado el interés en la síntesis orgánica mediada por nanocatalizadores de plata debido a su reactividad y selectividad, estabilidad, reciclabilidad y por su economía atómica [4]. Las AgNP de diferentes formas y tamaños son capaces de catalizar muchas reacciones orgánicas: de ciclación, adiciones de Michael, alquilaciones, oxidación, de acoplamiento cruzado, reducciones, entre otras [4]. A su vez, las AgNP han logrado catalizar reacciones de baja selectividad. Por ejemplo, cinéticamente no es posible generar en un tiempo razonable la reducción de *p*-nitrofenol incluso en presencia de un agente reductor fuerte como el NaBH₄ [5]. Pero, con la adición de AgNP al medio de reacción, la reducción se lleva a cabo rápidamente con la consecuente formación de *p*-aminofenol [6–9].

4.1.1 CATÁLISIS EN LA REDUCCIÓN DE 4-NITROFENOL

El *p*-nitrofenol (4-NPh) es un contaminante orgánico que proviene de aguas residuales de origen industrial generando problemas en la vida humana y de otros organismos vivos. Este contaminante se origina durante la producción de insecticidas, colorantes sintéticos, diferentes herbicidas, productos farmacéuticos y de varias industrias químicas y sintéticas. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) clasificó a 4-NPh entre los 114 contaminantes orgánicos que generan efectos adversos en la salud humana y de otros organismos vivos. Por otra parte, la especie reducida del 4-NPh, el *p*-aminofenol (4-APh), es un precursor importante en la síntesis de varios fármacos (analgésicos y antipiréticos); como agente anti-corrosión y lubricante en combustibles [10].

La estrategia más empleada para la reducción catalítica de 4-NPh es la utilización de MNP como catalizadores, por ejemplo: nanopartículas de plata, de oro, paladio, platino, entre otras; y de NaBH₄ como agente reductor. Debido a la facilidad de monitoreo del transcurso de la reacción por espectroscopia UV-visible, la reducción de 4-NPh se emplea como reacción modelo para evaluar las propiedades catalíticas de las MNP, donde se observó que las AgNP son uno de los nanomateriales más efectivos [11–17].

El mecanismo de reacción propuesto en literatura para la reducción de 4-NPh por NaBH_4 mediado por AgNP se presenta en las figuras 4.1 y 4.2 [11,13]. Inicialmente, el NaBH_4 se hidroliza generando $\text{B}(\text{HO})_4^-$ y liberando hidrógeno. En consecuencia, el 4-NPh se transforma en el ion nitrofenolato (4-NPhO^-) debido al pH básico del medio de reacción, que absorbe a una longitud de onda de 400 nm. Luego, las especies activas de hidrógeno y el 4-NPhO^- se adsorben a la superficie de la nanopartícula para que se lleve a cabo la reducción. En una primera etapa (I), el 4-NPhO^- se reduce inicialmente a 4-nitrosofenol, que rápidamente se convierte en 4-hidroxilaminofenolato (4-HxPhO^-), que es el intermediario más estable de la reacción. En una segunda etapa (II), que en general es la etapa determinante de la velocidad, el 4-HxPhO^- se convierte en el producto final de la reacción [11]. La formación de 4-APhO^- se observa por el incremento en la absorbancia a 300 nm. El perfil cinético de la reacción se presenta en la figura 4.3.

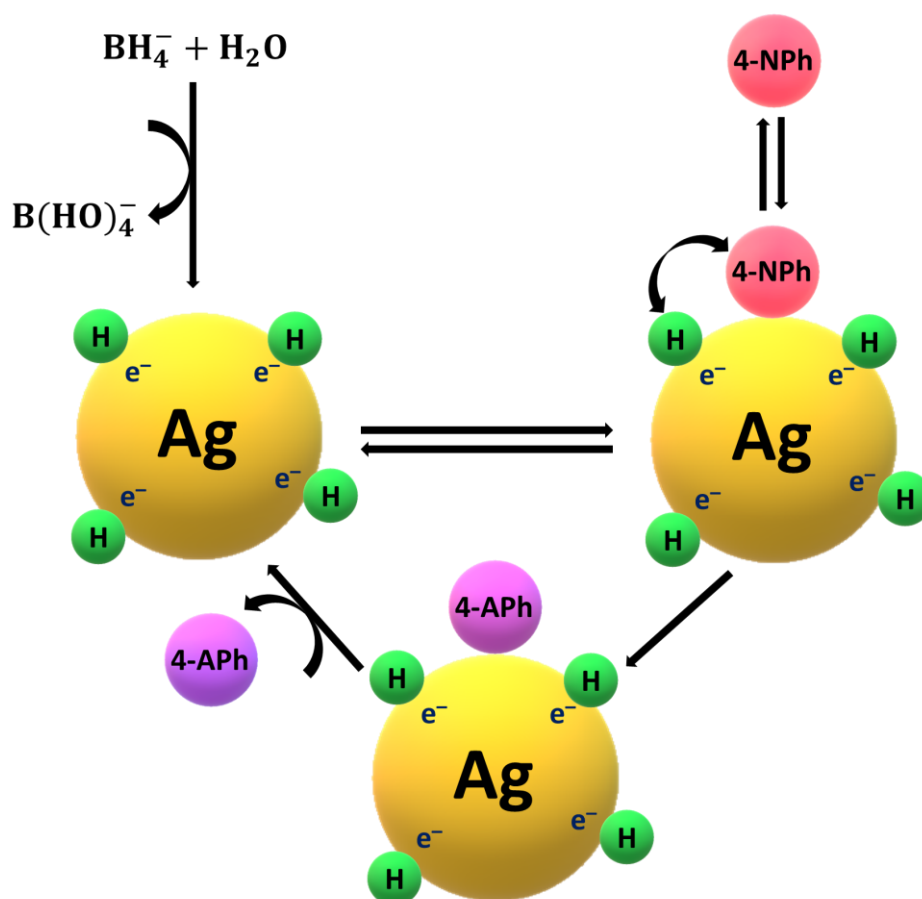


Figura 4.1. Representación del modelo Langmuir-Hinshelwood para la reducción de 4-NPh por NaBH_4 mediado por AgNP. Ref. [11].

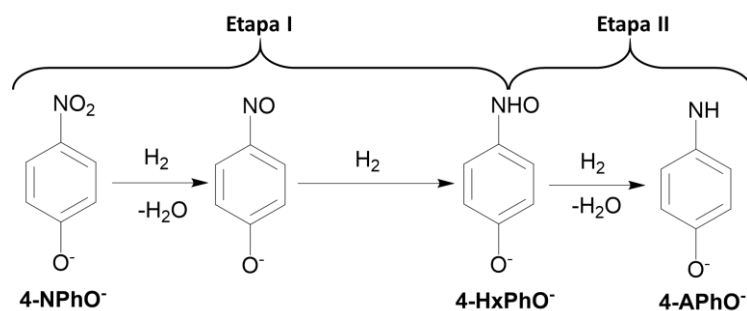


Figura 4.2. Mecanismo propuesto para la reducción de 4-NPh por NaBH₄ a pH básico. Ref. [13].

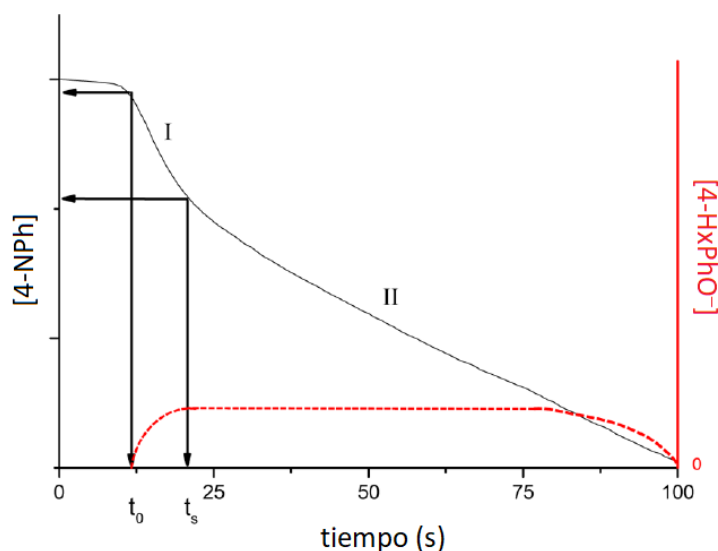


Figura 4.3. Perfil cinético para la reducción de 4-NPh (negro) por NaBH₄ propuesto por Gu et al., donde se distinguen las diferentes etapas de la reacción. También, se observa la variación en la concentración de 4-HxPhO⁻ en función del tiempo (rojo). t₀: tiempo de inducción; t_s: tiempo de inicio de la etapa II. Ref. [13].

4.1.2 AUTOCATÁLISIS EN EL CRECIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS MEDIADO POR SEMILLAS

En la última década, se han desarrollado diferentes estrategias para producir nanopartículas de oro y plata con diferentes propiedades plasmónicas [18]. Una de las estrategias más empleadas se denomina “*crecimiento mediado por semillas*”, que es una metodología fácil, sencilla y de bajo costo. Esta metodología consiste en adicionar nanopartículas pequeñas de una determinada composición (semillas) a una solución que contiene iones metálicos y un agente reductor suave para el crecimiento de estas partículas [19].

La morfología del nanomaterial resultante puede ser dirigida empleando diversos surfactantes, como se mencionó en el capítulo I. Por ejemplo, es posible sintetizar

nanocilindros de plata al adicionar semillas de plata (AgNP) a una solución de crecimiento compuesta por CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), AgNO_3 , ácido ascórbico e NaOH [20]. Los nanocristales de plata se preparan por reducción química con NaBH_4 empleando citrato de sodio como agente estabilizante, se dejan envejecer por un cierto periodo de tiempo y luego se adicionan a la solución de crecimiento como semillas [21]. El surfactante CTAB actúa como agente que dirige la síntesis al formar una bicapa catiónica unida firmemente a las nanopartículas de plata, adsorbiéndose en planos específicos de la misma y permitiendo el crecimiento en una sola dimensión [22]. El AgNO_3 aporta los iones precursores para la formación de las nanoestructuras de plata. El ácido ascórbico actúa como agente reductor y el NaOH se agrega en un etapa final para ajustar el pH de la solución y favorecer el crecimiento y formación de nanocilindros [22].

Las estrategias que emplean semillas tienen la ventaja de aprovechar la catálisis de superficie para generar partículas más grandes. Las semillas que se agregan a la solución de crecimiento catalizan la reducción del ion metálico precursor sobre la superficie de la nanopartícula por el agente reductor [19]. Este fenómeno de **autocatálisis** ha sido reportado por varios autores [23–26]. Por ejemplo, McGilvray *et al.* desarrollaron un nuevo método para sintetizar AuNP mediante la fotólisis de AuCl_4^- en presencia de donores de hidrógeno [26]. Inicialmente, el Au^{3+} se reduce por H_2O_2 para formar AuNP y *clusters*, cuya superficie reactiva cataliza la reducción adicional de Au^{3+} en la solución. Harada *et al.* también evidenciaron autocatálisis en la síntesis de AgNP por fotorreducción de AgClO_4 en una solución acuosa de PVP (polivinilpirrolidona) [27]. Por mediciones de SAXS (Dispersión de Rayos X de ángulo pequeño), observaron que, en procesos de rápida reducción-nucleación, pequeños núcleos o partículas (radio promedio $\sim 2,5$ nm) se generan por reducción autocatalítica. Luego, los núcleos formados generan AgNP más grandes por maduración de Ostwald y coalescencia [27].

El crecimiento por semillas permite separar efectivamente los periodos de nucleación y crecimiento en la formación de la nanopartícula, generando el incremento de la monodispersidad en relación a otros métodos sintéticos donde la concentración de los reactivos y estabilizantes debe ajustarse estrictamente para obtener los tamaños deseados [28]. La elección del agente reductor también es esencial para un crecimiento efectivo: los agentes reductores fuertes pueden favorecer la generación de nuevos núcleos en la solución, proceso denominado **nucleación secundaria**, lo que produce nanopartículas con una gran

distribución de tamaños [19]. Debido a que la barrera energética de la nucleación homogénea espontánea es extremadamente alta, la nucleación es difícil en comparación con el crecimiento mediado por semillas. Pero, algunos núcleos nuevos pueden generarse en este proceso en una condición crítica de sobresaturación que disminuye la barrera de activación de la nucleación homogénea espontánea debido a la catálisis generada por las semillas [29]. Para suprimir la nucleación secundaria, el requisito básico para el crecimiento mediado por semillas es emplear un agente reductor suave. Por esta razón, el citrato de sodio, el NH_4OH y el ácido ascórbico se han utilizado para fabricar nanopartículas de oro monodispersas utilizando el proceso mediado por semillas [20,30,31]. Sin embargo, es difícil evitar la nucleación secundaria utilizando estos agentes reductores debido a que su capacidad reductora es relativamente fuerte en ciertas condiciones. La incorporación de los surfactantes en parte resolvería este problema al formarse complejos metal-surfactante para mejorar la estabilidad del ion metálico, pero se hace difícil controlar la forma de las partículas y remover el surfactante [29]. Por ello, la elección de agentes reductores y las condiciones de reacción son parámetros a tener en cuenta para favorecer el crecimiento por sobre la formación de nuevos centros de nucleación [32].

Como se ha expuesto, las propiedades catalíticas de las nanopartículas, específicamente de AgNP, pueden emplearse para obtener ciertos productos de interés, valiéndonos de las ventajas de los sistemas catalíticos. Debido a esto, resultó interesante explorar las potenciales aplicaciones de las AgNP@SDDC, obtenidas en esta tesis, en la catálisis de una reacción orgánica modelo y en condiciones de crecimiento mediado por semillas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar si las AgNP@SDDC poseen propiedades catalíticas al evaluar su rol en la reducción de 4-nitrofenol por borohidruro de sodio en agua a temperatura ambiente, y en la síntesis de nuevas nanopartículas.

4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se utilizaron sin tratamiento adicional: p-nitrofenol (Aldrich), citrato de sodio dihidratado (Anedra), ácido L-ascórbico (Anedra) y KBr (Merk).

4.3.2 Síntesis de semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con citrato

En un Erlenmeyer que contenía AgNO_3 0,25 mM y citrato de sodio 0,25 mM, se agregaron alícuotas de 0,1 mL de NaBH_4 (10 mM) cada 30 segundos bajo agitación magnética vigorosa y a temperatura ambiente. Luego de la adición de NaBH_4 , el color de la solución viró a amarillo. La agitación se mantuvo 30 segundos más luego del agregado del NaBH_4 .

Estas semillas se almacenaron por 2 horas antes de su uso.

4.3.3 Actividad catalítica de las nanopartículas

Para evaluar la actividad catalítica de las AgNP@SDDC se seleccionó la reducción de *p*-nitrofenol como reacción modelo. Primero, se agregó 4-nitrofenol (4-NPh) 59,2 μM y NaBH_4 181 o 195 mM a una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En estas condiciones se considera que la velocidad de la reacción es de orden cero respecto al NaBH_4 [11]. Luego, se agregaron AgNP@SDDC (106; 211 o 314 μM) y se registraron los espectros de absorción de la muestra en el tiempo hasta que la banda de 400 nm desaparecía completamente. Una vez confirmada la ocurrencia de la reacción, se registró la absorbancia a 400 nm y 25,0 °C, con intervalos de 2 segundos, usando el modo cinético del software del instrumento. Cada experimento se realizó por duplicado. Como experimento control, se realizó la reacción en ausencia de AgNP@SDDC , en ausencia de NaBH_4 y en presencia de SDDC únicamente.

A su vez, la actividad catalítica también se evaluó mediante la incubación de las semillas sintetizadas en soluciones de crecimiento. Para ello, se preparó la solución de crecimiento formada por SDDC (3 mM), AgNO_3 (0,23 mM) y ácido ascórbico (7,2 mM), agregados en ese orden. Luego, se adicionaron 125 μL de semillas envejecidas por 2 horas o por 24 horas (AgNP@citrato o AgNP@SDDC) seguido de la adición de NaOH (9,1 mM). En ciertos casos, no se adicionó el ácido ascórbico o se agregó KBr . Todas las muestras se incubaron por 48 h antes de la centrifugación y posterior análisis.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 REDUCCIÓN DE 4-NITROFENOLATO

El potencial catalítico de las AgNP@SDDC se evaluó utilizando la reducción de *p*-nitrofenolato (4-NPhO^-) para producir 4-aminofenolato (4-AphO^-) en presencia de borohidruro de sodio como reacción modelo.

En ausencia de AgNP@SDDC la reducción no se observó dentro de las 6 horas (figura 4.4) en las condiciones experimentales empleadas en esta tesis. Sin embargo, cuando al medio de reacción se agregan AgNP@SDDC de 11 nm (211 pM), disminuye la absorbancia a 400 nm correspondiente al 4-NPhO⁻ con una conversión completa a los 30 minutos de iniciada la reacción (figura 4.5). La ausencia de un punto isosbético claro indica que la reacción involucra más de una etapa para obtener el producto final; lo cual también fue observado por Souza *et al.* con nanopartículas de Pt cubiertas de un surfactante zwitteriónico [17]. Cabe destacar que al adicionar AgNP@SDDC a la solución en ausencia de NaBH₄, no se observó reducción del 4-NPhO⁻. Lo mismo ocurrió al añadir SDDC en lugar de las AgNP@SDDC.

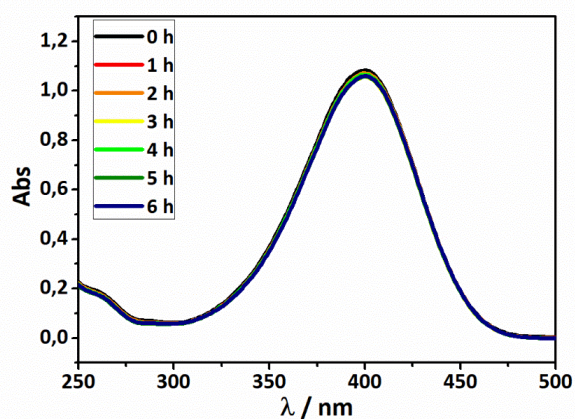


Figura 4.4. Espectros de absorción de 4-NPhO⁻ (59,2 μM) con NaBH₄ (195 mM), seguido por 6 horas a 25,0 °C.

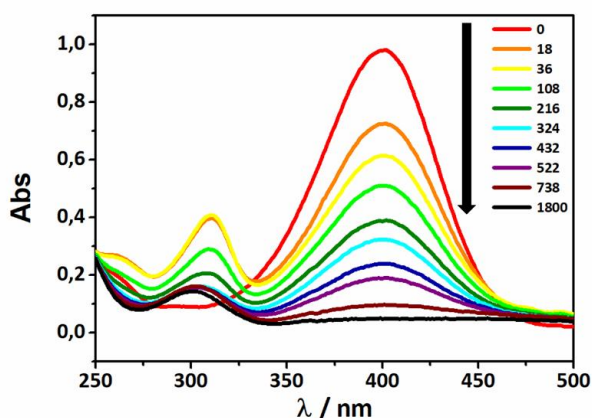


Figura 4.5. Espectros de absorción a diferentes tiempos para la reducción de 4-NPhO⁻ (59,2 μM) por NaBH₄ (195 mM) en presencia de AgNP@SDDC (211 pM), a 25,0 °C. Las leyendas muestran el tiempo transcurrido en segundos y la flecha indica el sentido en que evoluciona la reacción.

4.4.1.1 Análisis del perfil cinético de la reducción de 4-nitrofenolato

El perfil cinético de esta reacción se observa en la figura 4.6, donde se pueden evidenciar tres regiones: (i) un periodo de inducción delimitado por el tiempo de inducción, t_0 ; (ii) y (iii) dos regímenes cinéticos caracterizados por poseer diferentes pendientes, lo que indicaría que se produce un cambio en el paso limitante de la velocidad. El perfil cinético observado para la reacción es consistente con el descrito por Gu *et al.* (figura 4.3) [13]. De acuerdo con este trabajo, la constante de velocidad de la reacción para la etapa (ii) está asociada con un paso limitante de la velocidad dominado por la formación de 4-HxPhO⁻ a partir de 4-NPhO⁻. En este caso, no se espera observar un punto isobéptico debido a la superposición de los espectros de tres compuestos cuya concentración varía con el tiempo (4-NPhO⁻, 4-nitrosfenol, 4-HxPhO⁻). En el caso del régimen (iii), se asume un estado estacionario para 4-HxPhO⁻ y la formación de 4-APhO⁻ se convierte en la etapa limitante de la velocidad [13].

Por otra parte, en diferentes experimentos se observó variación del tiempo de inducción de la reacción (tabla 4.1). Esto puede estar asociado a variaciones en la concentración de O₂, un factor crítico determinado, recientemente, por Menumorov *et al.* [33]. Su trabajo consistió en monitorear simultáneamente la disminución de la señal espectroscópica de 4-NPh y el contenido de oxígeno disuelto en la solución acuosa. Observaron que el periodo de inducción correspondía al intervalo de tiempo requerido para que los niveles de oxígeno disueltos en la solución disminuyeran por debajo de un valor crítico, que depende de la naturaleza del catalizador empleado (Au, Ag o Pd). A partir de esto, fue posible controlar, completamente, el periodo de inducción: se logró eliminar, extenderlo indefinidamente o incluso obtener múltiples periodos de inducción en el transcurso de una única reacción. A su vez, fueron capaces de determinar que el producto obtenido, 4-APhO⁻, puede reaccionar con el oxígeno disuelto para generar 4-NPhO⁻ nuevamente. Estos hallazgos indican que t_0 corresponde a un periodo donde el producto de la reacción se convierte en el reactivo de partida por una reacción secundaria.

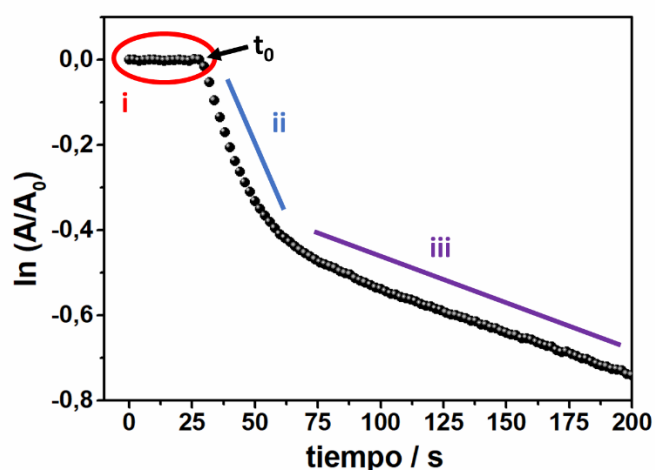


Figura 4.6. Perfil cinético registrado a una longitud de onda de 400 nm para la reducción de 4-NPhO⁻ (59,2 μ M) en presencia de AgNP@SDDC (211 μ M). La elipse roja indica el periodo de inducción (i) y la flecha señala el tiempo de inducción t_0 . Las líneas azul y violeta indican los diferentes regímenes cinéticos observados (ii e iii).

Tabla 4.1. Tiempos de inducción de la reacción catalizada por AgNP@SDDC.

AgNP@SDDC ^a / μ M	Tiempo de inducción ^b /s
106	44-220
211	20-82
314	54-76

^a Calculada usando el algoritmo NANoPoLC.

^b n = 3.

4.4.1.2 Determinación de la constante de velocidad aparente

La reacción de reducción de 4-NPhO⁻ se realizó en condiciones de pseudoprimer orden. En general, el NaBH₄ se utiliza en concentraciones elevadas en relación con la concentración del catalizador y del 4-NPhO⁻, de modo que se asume que la velocidad de la reacción sólo depende de la concentración de 4-NPhO⁻. En estas condiciones, la constante de velocidad de la reacción (k_{app}) puede ser determinada directamente a partir del ajuste lineal de la función $\ln(A/A_0)$ con respecto al tiempo, de acuerdo con condiciones de pseudo primer orden, siendo A y A₀ las absorbancias a tiempo t y t₀, respectivamente (Ecuación 4.1). La constante k_{app} se relaciona con el área superficial total (S) disponible en las nanopartículas, acorde a la ecuación 4.1 [11],

$$\frac{-dc_t}{dt} = \ln \frac{A}{A_0} = k_{app}c_t = k_1Sc_t \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde c_t es la concentración de 4-NPhO⁻ a un tiempo t , k_1 es la constante de velocidad normalizada respecto del área superficial total de la NP, S . La k_{app} es un parámetro que permite evaluar la actividad catalítica de una determinada especie química. Generalmente, un valor mayor de k_{app} indicaría una actividad catalítica mayor [11].

Finalmente, se procedió a sustraer el tiempo de inducción de cada experimento y se determinó la k_{app} a partir de la regresión lineal del $\ln(A/A_0)$ a 400 nm versus el tiempo. Cada régimen se ajustó en función de los siguientes intervalos de tiempo: 0-14 segundos para el régimen (ii) y 60-180 segundos para el régimen (iii) (figura 4.7 es representativa). Los valores de k_{app} fueron calculados para cada una de las concentraciones de catalizador empleadas y se resumen en la tabla 4.2.

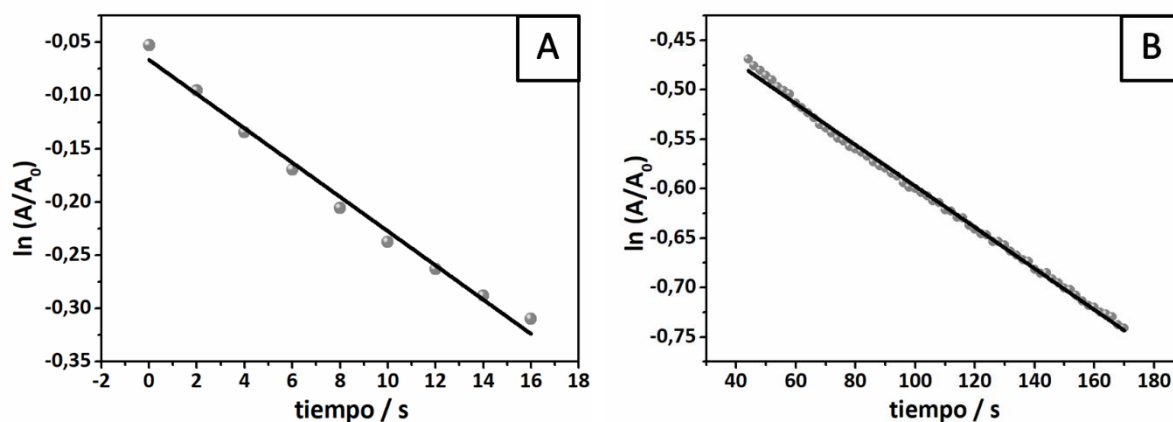


Figura 4.7. Dependencia de $\ln(A/A_0)$ vs tiempo para la reacción de 4-NPhO⁻ (59,2 μ M) con NaBH₄ (195 mM) empleando AgNP@SDDC (211 pM) como catalizador, en las etapas ii (A) y iii (B).

Tabla 4.2. Constantes de velocidad aparentes determinadas para la etapa (ii) y (iii) a diferentes concentraciones de AgNP@SDDC, a 25,0 °C.

AgNP@SDDC ^a /pM	Área superficial total ^b /m ² L ⁻¹	k_{app} promedio ^c /10 ⁻³ s ⁻¹	
		ii	iii
106	0,0259	1,70 (0,03)	1,30 (0,01)
211	0,0515	12 (6)	2,1 ^d (0,5)
314	0,0767	14 (3)	1,8 (0,1)

^a Calculada usando el algoritmo NANoPoLC.

^b Estimada usando el diámetro promedio.

^c n = 3, entre paréntesis se expresa la SD.

^d n = 4.

Para todos los niveles de concentración de catalizador estudiados se observó que, cuando la velocidad de aparición de 4-APhO⁻ está limitada por la etapa I (figura 4.2), la reacción es más rápida que cuando la limitante es la etapa II (figura 4.2) ($k_{app(ii)} > k_{app(iii)}$). Esto implica que, a tiempos cortos, el intermediario 4-HxPhO⁻ se genera rápidamente, pero su reducción a tiempos más largos es lenta [13]. Cuando la concentración de 4-HxPhO⁻ aumenta rápidamente al inicio de la etapa I, comienza a competir con el nitrofenol en la superficie de la nanopartícula y esto ralentiza la velocidad de la reacción [13]. A su vez, el 4-HxPhO⁻ se adsorbe fuertemente a la superficie de las nanopartículas, lo que podría explicar que, luego de su formación, disminuya la velocidad de la reacción sin observarse que el mismo se acumule en solución [13].

Por otra parte, al duplicarse la concentración de catalizador se evidencia un incremento de la constante de velocidad; pero el subsiguiente incremento en la concentración de AgNP@SDDC no genera variaciones significativas en el valor de k_{app} . De acuerdo a la ecuación 4.1, se espera que el valor de k_{app} sea linealmente proporcional al área superficial de las nanopartículas en el sistema [12,34,35]. Sin embargo, con las AgNP@SDDC se observa una “saturación” del sistema a las concentraciones de catalizador analizado.

4.4.1.3 Comparación de la actividad catalítica de las nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC con otras nanopartículas de plata similares

Como se describió en la sección anterior, los valores de k_{app} están relacionados con la cantidad de catalizador empleado en la reacción. Si bien la reducción de 4-NPhO⁻ es una

reacción modelo empleada para evaluar las propiedades catalíticas de muchos nanomateriales, la comparación directa de los datos con la literatura es complicada debido a la gran variedad de parámetros catalíticos que se han reportado [35]. Para independizarse de estos parámetros y comparar la actividad catalítica de diferentes nanopartículas, se emplea la constante de velocidad normalizada por la superficie (k_1). Esta constante se determina como la pendiente de la curva de k_{app} versus la concentración de catalizador.

En este caso, se realizó una estimación de k_1 realizando el cociente entre la k_{app} y el área superficial total de las AgNP@SDDC. Los valores obtenidos indicarían que la actividad catalítica es mayor para la etapa ii ($\sim 0,4 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ L}$) comparada con la etapa iii ($\sim 0,04 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ L}$) y en ambos casos son similares o mejores que para otros valores informados en literatura (tabla 4.3) [12,16]. Por ejemplo, AgNP estabilizadas con polímeros (PEI ramificada, figura 4.8) presentan una actividad catalítica de $0,0081 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ L}$ o $0,57 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ L}$ dependiendo del polímero empleado como estabilizante [16].

Tabla 4.3. Comparación de la velocidad normalizada por la superficie (k_1) de AgNP con diferentes estabilizantes.

Estabilizante	Tamaño de las AgNP	k_1 ($\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ L}$)
PEI ^a derivatizado (E11) ^c	$24,5 \pm 4,1$	0,57
PEI ^a derivatizado (E5) ^c	$19,5 \pm 9,2$	0,0081
SDDC ^d	11 (SD = 4)	i = 0,4 ^b ii = 0,04 ^b

^a polietilenimina ramificada.

^b $k_1 = k_{app}/\text{área superficial total}$.

^c Ref. [16]. E1 = cloroetanol/bromobutano.

^d Esta tesis.

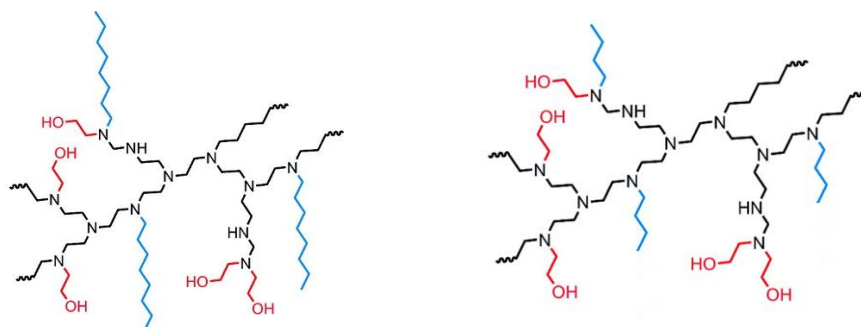


Figura 4.8. PEI derivatizado empleando 2-cloroetanol y 1-bromoetano (izquierda, E11) o 1-bromobutano (derecha, E5).

4.4.1.4 Evaluación de la *performance* del catalizador en reacciones consecutivas

Dado que este proceso corresponde a una catálisis mixta y que no fue posible aislar el catalizador post-reacción (dada la mínima concentración utilizada), se evaluó la reutilización de las AgNP@SDDC en reacciones consecutivas. Para ello, luego de un ciclo de reacción, se adicionó más cantidad de 4-NPhO⁻ al medio (65 μM). Es importante destacar que al inicio de la segunda reacción aún se encontraban presentes en la solución los productos obtenidos de la primera reacción. Luego de transcurridos 60 minutos desde el inicio del primer ciclo y al adicionar más 4-NPhO⁻, éste se redujo pero a una velocidad menor (figura 4.9). A su vez, también se observa la presencia de un punto isobéptico, lo que indica que la reducción del 4-NPh se produce en una sola etapa y que la cantidad de 4-APhO⁻ generado por unidad de tiempo es exactamente igual a la disminución de la concentración de 4-NPhO⁻ [13].

Para la segunda reacción, se determinó un valor de k_{app} de $0,54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ cuando la concentración del catalizador fue de 211 pM, con un tiempo de inducción de aproximadamente 900 segundos (15 minutos). Se produjo una disminución del 70% y del 95% en el valor de k_{app} en comparación a las k_{app} de los regímenes (ii) y (iii) para la misma concentración de catalizador, respectivamente. Esta disminución se puede atribuir a la disminución en la concentración de NaBH₄ (ya que este no se repuso) y a cambios en la superficie del catalizador luego del primer ciclo de reacción. Esto último puede analizarse mediante la comparación de imágenes de TEM del catalizador antes y después de la reacción (figura 4.10). En este caso, se incrementó el tamaño y la polidispersidad de las AgNP@SDDC post-catálisis.

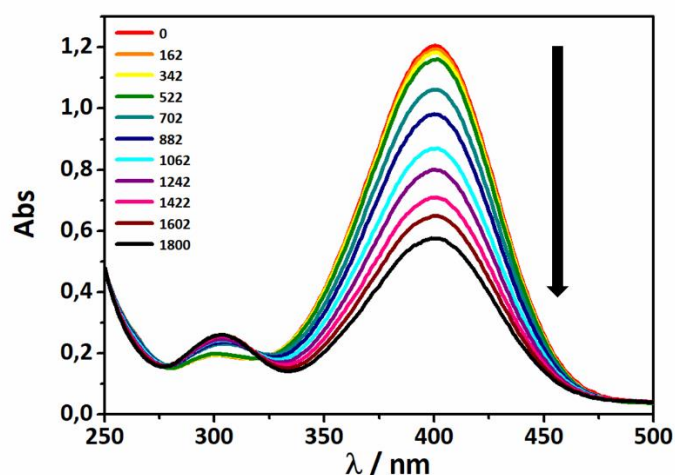


Figura 4.9. Espectros de absorbanza a diferentes tiempos para la reducción consecutiva de 4-NPhO⁻ por NaBH₄ (~195 mM) y AgNP@SDDC (211 pM), transcurridos 60 minutos del primer ciclo de reacción y con la adición de 4-NPhO⁻ (65 μM). La leyenda representa el tiempo transcurrido en segundos y la flecha indica el sentido en que evoluciona la reacción.

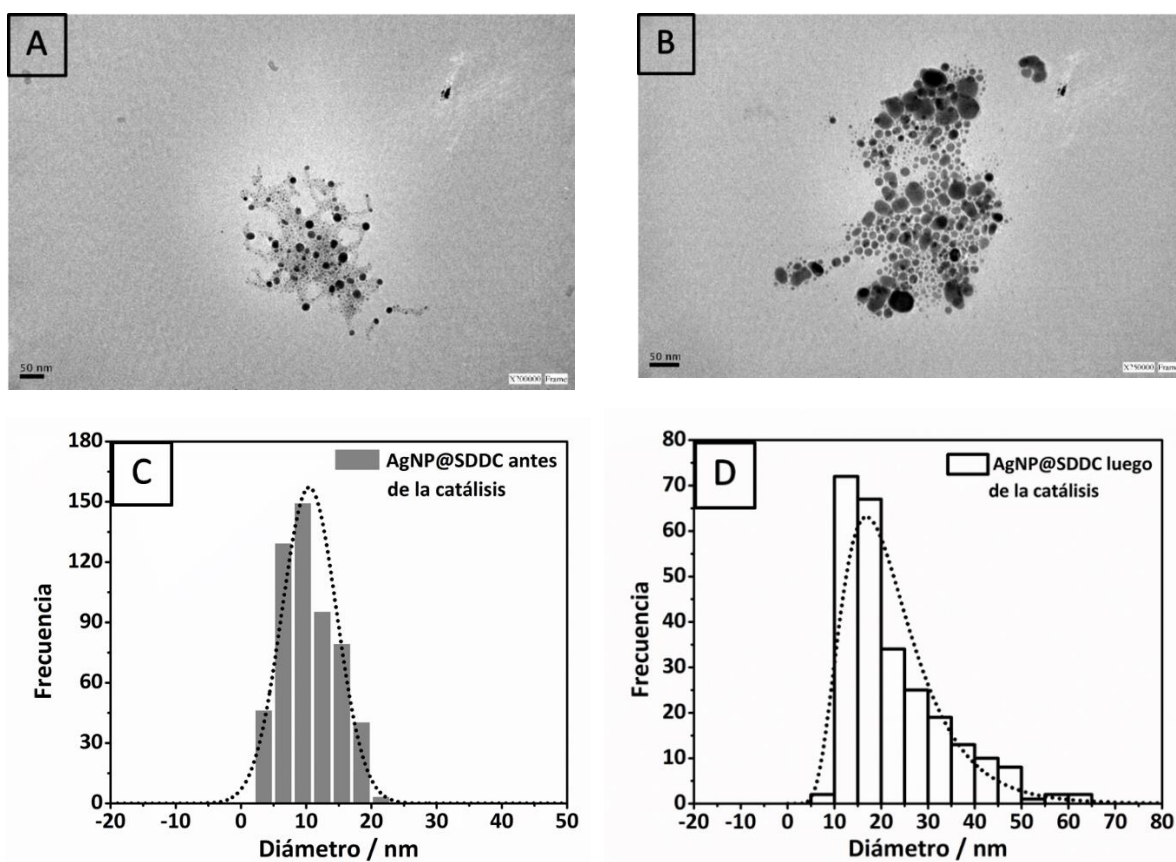
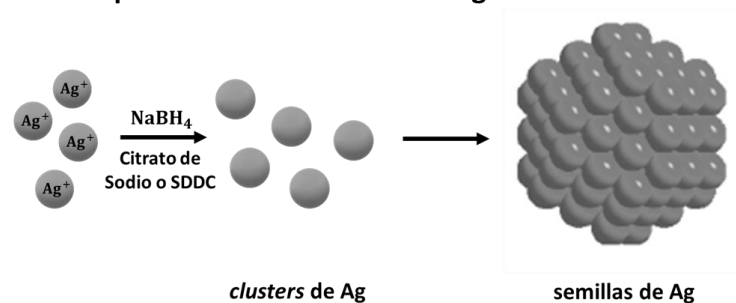


Figura 4.10. Imágenes de TEM representativas de AgNP@SDDC pre (A) y post (B) catálisis. Se observa incremento del tamaño y polidispersidad de las mismas en los histogramas de distribución de tamaño pre (C) y post (D) catálisis.

4.4.2 CRECIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EMPLEANDO SEMILLAS

Como se mencionó anteriormente, los surfactantes, en general, son capaces de dirigir la síntesis de las nanopartículas [36]. En ese sentido, se evaluó si el surfactante SDDC es capaz de dirigir el crecimiento de semillas de AgNP en una solución de crecimiento. Para ello se empleó el método de síntesis de nanocilindros de Ag reportado en literatura [20], pero reemplazando CTAB por SDDC. Se empleó AgNO_3 como fuente de iones Ag^+ , ácido ascórbico como agente reductor suave e NaOH para ajustar el pH y permitir la acción del reductor. Debido a que se observó que el anión Br^- interviene en la formación de nanocilindros [36], en algunos casos, se agregó KBr a la solución de crecimiento para evaluar si su adición permite el crecimiento anisotrópico de las semillas. En la figura 4.11 se esquematiza el proceso de síntesis mediado por semillas.

Primera etapa: síntesis de semillas de Ag



Segunda etapa: crecimiento de semillas

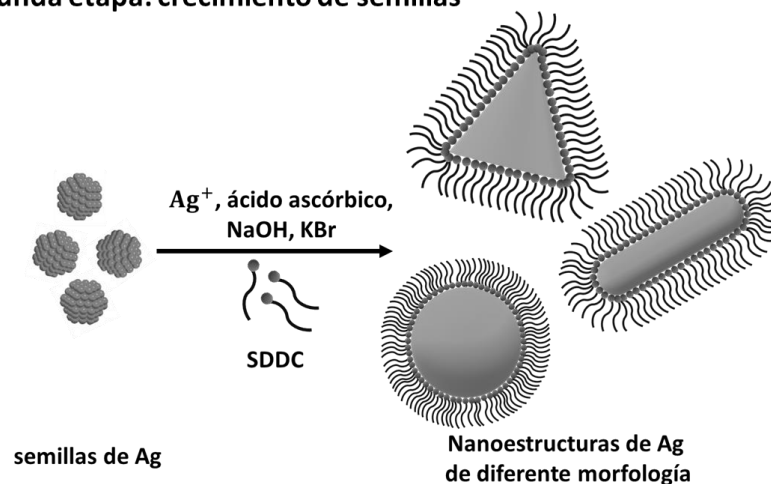


Figura 4.11. Representación esquemática de las etapas de síntesis mediadas por semillas de nanoestructuras de Ag. En la primera etapa se sintetizan las semillas de Ag por reducción química con NaBH_4 en presencia de un estabilizante (citrate de sodio o SDDC). En la segunda etapa se incuban las semillas en la solución de crecimiento formada por SDDC, Ag^+ , ácido ascórbico, NaOH y en algunos casos, KBr.

4.4.2.1 Semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con citrato

Se sintetizaron semillas de Ag estabilizadas por citrato (AgNP@citrato) por el método de reducción química empleando NaBH_4 como agente reductor y citrato de sodio como agente estabilizante [20]. Las mismas presentaron una banda SPR a 394 nm y un FWHM de 55,5 nm (figura 4.12). Debido a su pequeño tamaño, no se logró observarlas por TEM con la resolución del instrumento disponible.

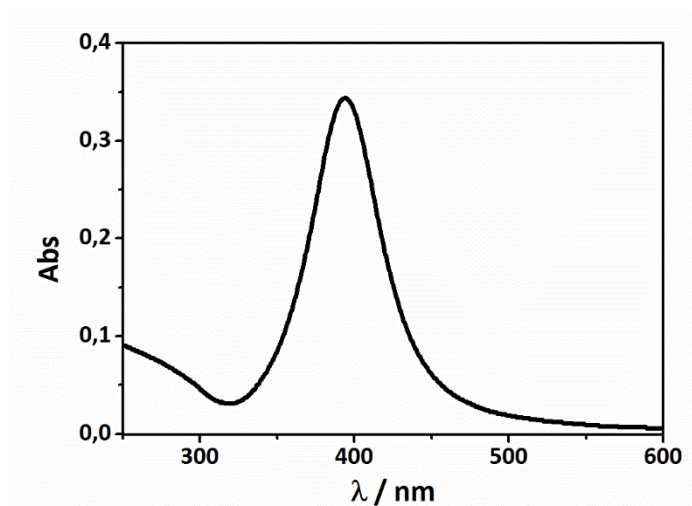


Figura 4.12. Espectro de absorción de semillas de AgNP@citrato en agua y a 25,0°C. Se observa la banda SPR a 394 nm.

En una segunda etapa, se incubó las semillas en la solución de crecimiento, en ausencia y en presencia de iones Br^- . Se observó que las AgNP@citrato adicionadas crecían anisotrópicamente alcanzando tamaños de aproximadamente 90 nm (SD = 13) (figuras 4.13A y 4.14A). Sin embargo, al adicionar KBr (50, 75 y 100 mM) a las soluciones de crecimiento, se observaron nanoestructuras de Ag de morfologías diferentes en distintas proporciones; aun así, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de las partículas entre muestras.

Cuando se utilizaron concentraciones de KBr de 50 mM, se obtuvieron 94% de partículas esféricas (62 nm, SD = 13) y un 6% de triángulos (altura de 62 nm, lado de 57 nm, SD = 9), con una banda SPR centrada a 424 nm (figuras 4.13B y 4.14B). A 75 mM de KBr, sólo se observaron partículas esféricas (75 nm, SD = 17), con una banda SPR a 413 nm y FWHM de 106 nm (figuras 4.13 y 4.14B). Finalmente, con la adición de KBr 100 mM se obtuvieron nanopartículas esféricas de hasta 72 nm de diámetro con una banda SPR a 412 nm (figuras 4.13D y 4.14B). En general, la adición de KBr generó la formación de AgNP esféricas grandes y, a bajas

concentraciones, puede dirigir la síntesis hacia la formación de triángulos, pero en pequeñas proporciones.

En el capítulo I, se explicó como algunos surfactantes modulan la morfología de las nanopartículas en la síntesis mediada por semillas. Por ejemplo, al emplear CTAB, el complejo que forma el ion bromuro y Ag^+ se adsorbe, preferencialmente, en un plano de la superficie de la semilla y por su interacción electrostática con CTA^+ , bloquean el crecimiento en ciertos planos y favorece el crecimiento en una sola dimensión [37]. Como CTAB es un surfactante catiónico, el proceso anterior se encuentra favorecido. En el caso de SDDC, al ser un surfactante gémuni aniónico, la repulsión electrostática entre el ion bromuro y SDDC puede ser una de las razones que influye en la modulación de hacia otras forma (no esféricas) de las nanopartículas resultantes [36,37]. De esta manera, se observa el crecimiento indiscriminado en todas las dimensiones del material, con la formación de nanopartículas de gran tamaño. Por otra parte, se ha reportado que las micelas que forma CTAB poseen una morfología cilíndrica [36], lo que favorecería la formación de nanocilindros. A diferencia de CTAB, SDDC forma vesículas esféricas [38], por lo que, la modulación de la morfología de este surfactante Gémuni tendería a la síntesis de nanoesferas.

A partir de estos resultados podemos resaltar que SDDC influye en el crecimiento y morfología de las nanopartículas sintetizadas a partir de estas semillas, generándose nanopartículas grandes de entre 60 y 90 nm. A su vez, el KBr es capaz de modular mínimamente la morfología obtenida a bajas concentraciones.

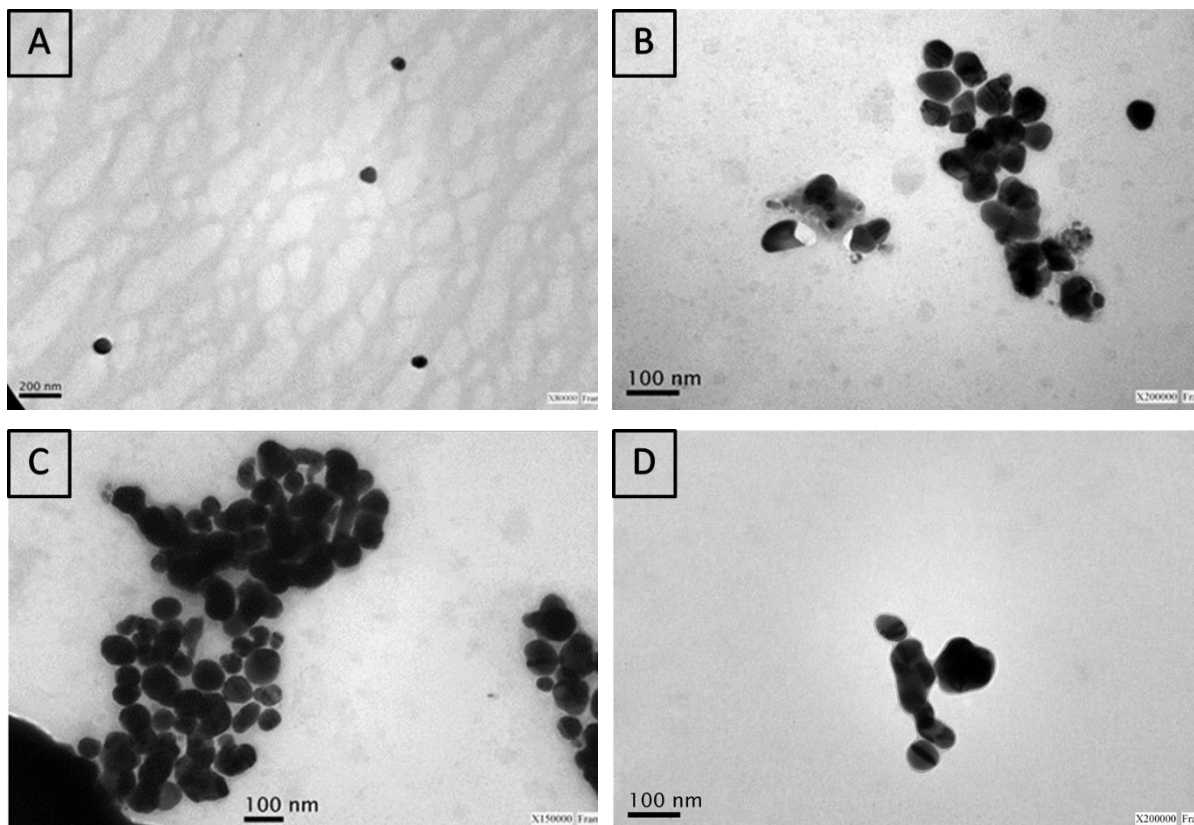


Figura 4.13. Imágenes representativas de TEM de las nanopartículas sintetizadas en ausencia de KBr (A), y con la adición de 50 mM (B), 75 mM (C), 100 mM (D).

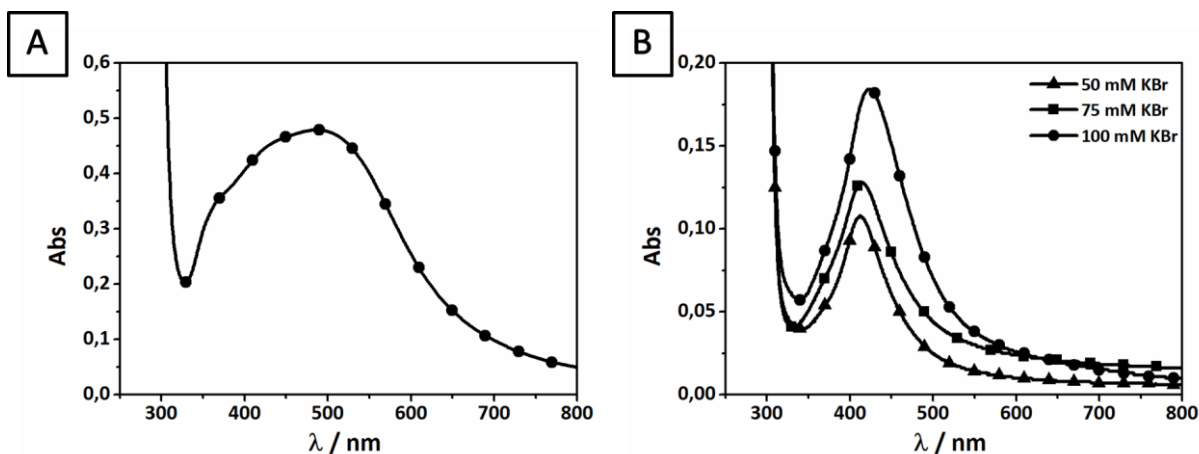


Figura 4.14. Espectros UV-Visible de las nanopartículas en ausencia de KBr (A) y con la adición de KBr (B).

4.4.2.2 Semillas de nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC

Las AgNP@SDDC utilizadas se sintetizaron mediante el procedimiento descrito en el capítulo III, sección 3.6.3. Estas semillas se utilizaron sin centrifugar luego de 2 hs (S2h) y 24 hs (S24h) de ser sintetizadas, para evaluar si el grado de envejecimiento de las mismas podría

influir en el crecimiento. Las AgNP@SDDC presentaron un tamaño promedio de 8 nm (SD = 2,6) (figura 4.15) y una banda SPR a una longitud de onda máxima de 436,5 nm (figura 4.16).

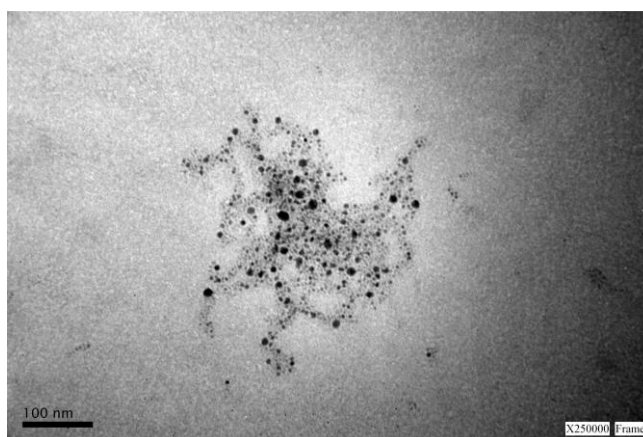


Figura 4.15. Imagen representativa de TEM de semillas de AgNP@SDDC.

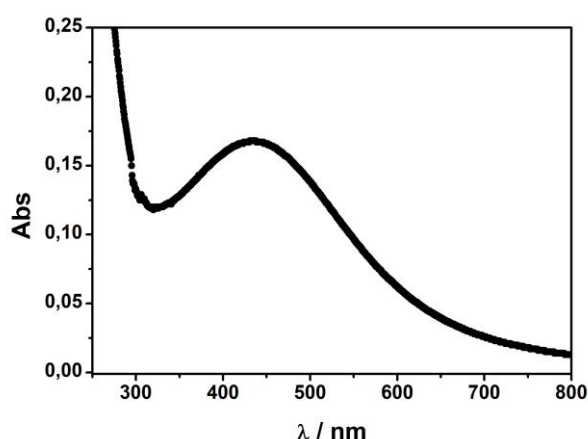


Figura 4.16. Espectro de absorción de semillas de AgNP@SDDC en agua y a 25,0 °C. Se observa la banda SPR a 436,5 nm.

Al incubar las semillas S2h y S24h se generó el crecimiento de nanopartículas esféricas de tamaños similares: 7,0 nm (SD = 2) y 10 nm (SD = 4), respectivamente (figura 4.17 A, B); con un máximo del plasmón superficial a 415 nm (figura 4.18A). Se realizó un test t para evaluar si la diferencia en los tamaños promedio de las nanopartículas sintetizadas con semillas de diferente grado de envejecimiento eran significativas. Dado que el valor $t_{\text{exp}} > t_{n-1;\alpha}$, los tamaños promedio de las partículas obtenidas resultaron significativamente diferentes entre sí con un 95% de confianza.

A partir de esto, se observó una leve influencia del envejecimiento en el crecimiento de las nanopartículas. Sin embargo, el tamaño final de las mismas resultó del orden de las semillas adicionadas, a diferencia de lo observado para AgNP@citrato, donde se obtuvieron

nanopartículas de 60-90 nm de diámetro. De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la autocatálisis que producen las semillas adicionadas puede incrementar el tamaño de las partículas (la reducción ocurre sobre la superficie de la nanopartícula y se observa crecimiento e incremento de tamaño de las semillas) o generar nucleación secundaria (aumento de la cantidad de nanopartículas en la solución por la formación de nuevos núcleos favorecidos por las propiedades catalíticas de las semillas) [19,26,27,29]. En este caso, al no evidenciarse crecimiento de las semillas (como sucedió para AgNP@cittrato), se presume que la síntesis está favorecida hacia la formación de nuevas nanopartículas por nucleación secundaria catalizada por las AgNP@SDDC adicionadas a la solución de crecimiento. En general, se observa que la nucleación secundaria es un evento que se intenta evitar en el crecimiento mediado por semillas debido a que puede incrementar la distribución de tamaños de la población de nanopartículas sintetizadas [19]. Sin embargo, se observó que empleando el surfactante SDDC, la síntesis sólo es dirigida a la nucleación secundaria y no se observa crecimiento sobre la superficie de las semillas. Para evidenciar si efectivamente se produce la formación de nuevas nanopartículas se registró la absorbancia de las AgNP@SDDC antes y después de incubarse en la solución de crecimiento (figura 4.18B), donde se observó el incremento del plasmón de las AgNP@SDDC luego de la incubación. El incremento en la señal SPR de las nanopartículas puede deberse al aumento de su tamaño por efectos intrínsecos o al incremento de la concentración de las mismas, como se expuso en el capítulo I. Debido a que el tamaño permanece relativamente constante luego de la incubación (semillas = 8 nm, post-incubación = 7 y 10 nm), el aumento en la banda del plasmón se atribuye al aumento en la concentración de las AgNP@SDDC generado por la formación de nuevas nanopartículas por nucleación secundaria, proceso catalizado por las semillas adicionadas.

A su vez, en el capítulo III se estimó el grado de recubrimiento de la superficie por SDDC (26 moléculas por nm²). Este alto grado de recubrimiento, en comparación con el de otras nanopartículas, podría ser un factor importante que impida el crecimiento de la semilla, debido al impedimento de los iones Ag⁺ para acceder a la superficie, reducirse e incrementar el tamaño de la semilla. De esta manera, el recubrimiento compacto de SDDC favorecería la formación de nuevas partículas, impidiendo el crecimiento sobre las semillas.

Por otra parte, se adicionó KBr a la solución de crecimiento para evaluar si el mismo influía en el crecimiento de las nanopartículas incubadas. La presencia de ion bromuro generó la síntesis de nanocilindros de Ag en una proporción muy baja (9 %), predominando la forma

esférica (91 %). El diámetro promedio de las esferas fue de 33 nm (SD = 9), un tamaño significativamente mayor en relación a las observadas en las semillas de S2h y S24h. Los nanocilindros presentaron un largo de 168 nm (SD = 80), ancho de 18 nm (SD = 6 nm) y relación de aspecto 9,4 (figura 4.17 C, D); con una banda SPR a 411,5 nm y FWHM de 103,5 nm (figura 4.18A). Resulta interesante observar que, si bien en ausencia de KBr no se observa variación del tamaño de las AgNP@SDDC, la adición del mismo generó un incremento del tamaño. Esto puede indicar que el ion Br^- interacciona de alguna manera con la superficie de la nanopartícula y debido a repulsión electrostática con el SDDC aniónico, genera un reordenamiento del surfactante que permite que la superficie esté más disponible para la reducción de Ag^+ , con el consecuente incremento de tamaño de las partículas.

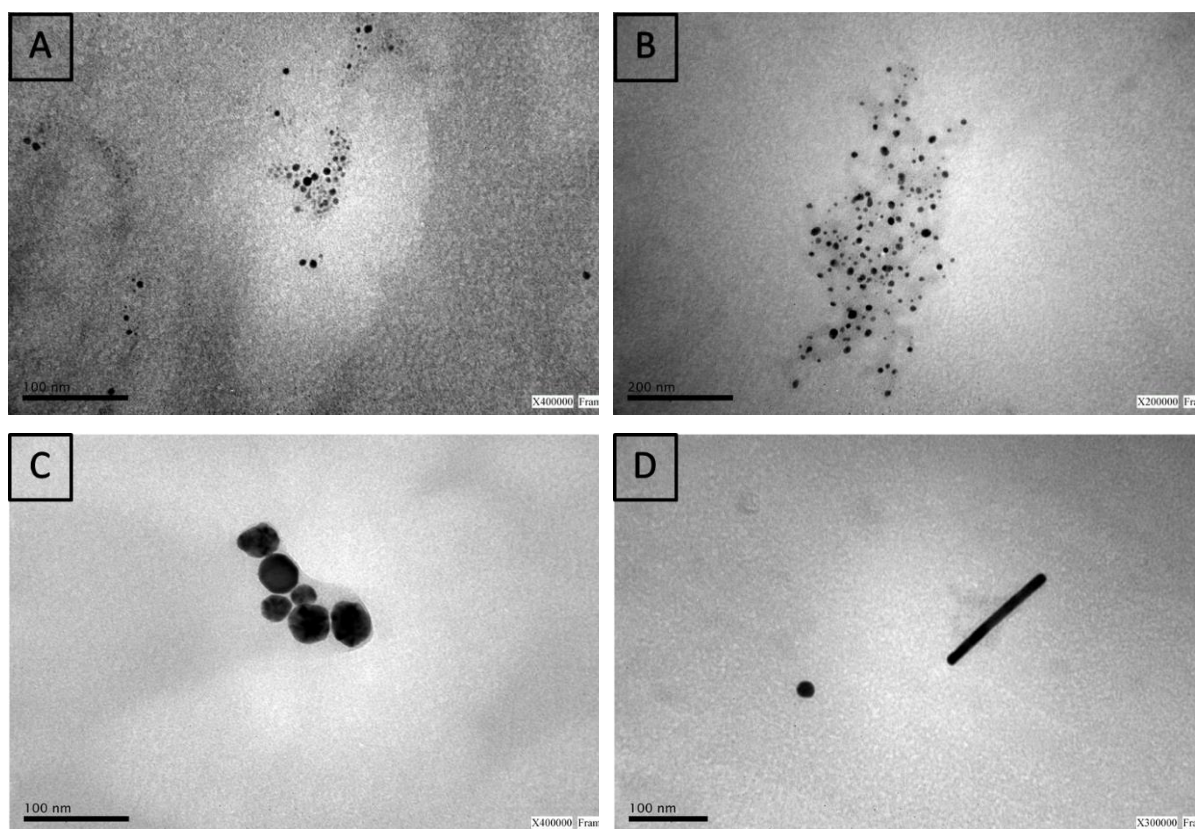


Figura 4.17. Imágenes representativas de TEM de las nanopartículas sintetizadas cuando se partió de semillas de 2h (A), de 24h (B) y con la adición de KBr (C y D).

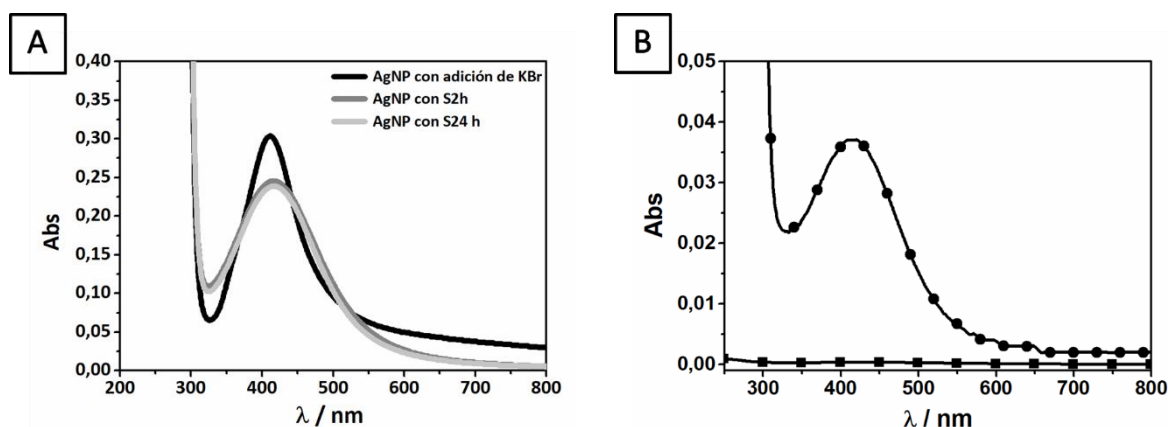


Figura 4.18. Espectros de absorbanza de las nanopartículas sintetizadas. En el espectro A se observa la banda SPR de las AgNP obtenidas a partir de semillas de 2h, 24h y con adición de KBr. En el espectro B observamos la absorción de las AgNP@SDDC antes (■) y después (●) de 48 h de incubación en el medio de reacción a 25,0°C.

A partir de los resultados presentados, se observó que las AgNP@SDDC catalizan la reducción de Ag^+ en presencia de un reductor suave. En ausencia del agente reductor, no se evidencia crecimiento o formación de nanopartículas en la solución de crecimiento. En función de la naturaleza de las semillas empleadas, es posible obtener nanopartículas con tamaños diversos, principalmente esféricas. Por otra parte, el surfactante SDDC influye, efectivamente, en la morfología (aunque no tan marcadamente como lo hace CTAB) y el tamaño de las nanopartículas resultantes dirigiendo el crecimiento mientras que el ion bromuro podría estar actuando como un co-director en el proceso de crecimiento [39].

4.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Las AgNP@SDDC son capaces de catalizar la reducción de 4-NPh mediada por borohidruro de sodio, siendo su actividad catalítica en el orden de otras AgNP reportadas.
- ✓ La ausencia de un punto isobéptico indica que la reacción tiene más de una especie absorbente a diferentes tiempos. Esto concuerda con el mecanismo involucrando intermediarios.
- ✓ Los valores de k_{app} disminuyen entre 70-95 % al reutilizar el catalizador, lo que se atribuye al aumento moderado del tamaño y la polidispersidad de las AgNP@SDDC.
- ✓ La variación en la concentración de AgNP@SDDC influye en el valor de k_{app} y, por ende, en la velocidad de la reacción.

- ✓ El surfactante SDDC es un interesante agente estabilizante capaz de modular la síntesis de nanoestructuras de plata de diferentes tamaños en función de las condiciones de incubación de las semillas.
- ✓ La naturaleza de las semillas adicionadas a la solución de crecimiento influye en el tamaño y la morfología de las nanopartículas sintetizadas. El empleo de AgNP@SDDC generó la formación de nanopartículas esféricas de 10 nm de diámetro; mientras que la adición de AgNP@citrato generó la síntesis de nanopartículas de diferente morfología de 60-90 nm de diámetro.
- ✓ Las propiedades catalíticas de las AgNP@SDDC y el alto grado de recubrimiento de SDDC favorecen exclusivamente la nucleación secundaria, con la formación de nuevas nanopartículas.
- ✓ La adición de KBr favorece el crecimiento controlado de AgNP@SDDC y AgNP@citrato dirigiendo la síntesis a la formación de nanopartículas de mayor tamaño.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rao C.N.R. (Chintamani N.R., Müller A., Cheetham A.K., *The chemistry of nanomaterials : synthesis, properties and applications*, Wiley-VCH, Germany, 2004.
- [2] Tao F., Spivey J.J., *Metal nanoparticles for catalysis : advances and applications*, Royal Society of Chemistry (RSC), Cambridge, 2014.
- [3] Zibareva I. V., Ilina L.Y., Vedyagin A.A., *Catalysis by nanoparticles: the main features and trends*, React. Kinet. Mech. Catal. 127 (2019) 19–24.
- [4] Dong X.-Y., Gao Z.-W., Yang K.-F., Zhang W.-Q., Xu L.-W., *Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals*, Catal. Sci. Technol. 5 (2015) 2554–2574.
- [5] Maaz K., *Silver nanoparticles : fabrication, characterization and applications*, 2018.
- [6] Zhang J., Yan Z., Fu L., Zhang Y., Yang H., Ouyang J., Chen D., *Silver nanoparticles assembled on modified sepiolite nanofibers for enhanced catalytic reduction of 4-nitrophenol*, Appl. Clay Sci. 166 (2018) 166–173.
- [7] Yan Z., Fu L., Zuo X., Yang H., *Green assembly of stable and uniform silver nanoparticles on 2D silica nanosheets for catalytic reduction of 4-nitrophenol*, Appl. Catal. B Environ. 226 (2018) 23–30.

- [8] Singh J., Kukkar P., Sammi H., Rawat M., Singh G., Kukkar D., *Enhanced catalytic reduction of 4-nitrophenol and congo red dye By silver nanoparticles prepared from Azadirachta indica leaf extract under direct sunlight exposure*, Part. Sci. Technol. 37 (2019) 430–439.
- [9] Ismail M., Khan M.I., Khan M.A., Akhtar K., Asiri A.M., Khan S.B., *Plant-supported silver nanoparticles: Efficient, economically viable and easily recoverable catalyst for the reduction of organic pollutants*, Appl. Organomet. Chem. 33 (2019) 1–19.
- [10] Karki H.P., Ojha D.P., Joshi M.K., Kim H.J., *Effective reduction of p-nitrophenol by silver nanoparticle loaded on magnetic Fe₃O₄ /ATO nano-composite*, Appl. Surf. Sci. 435 (2018) 599–608.
- [11] Liao G., Gong Y., Zhong L., Fang J., Zhang L., Xu Z., Gao H., Fang B., *Unlocking the door to highly efficient Ag-based nanoparticles catalysts for NaBH₄-assisted nitrophenol reduction*, Nano Res. 12 (2019) 2407–2436.
- [12] Eising R., Signori A.M., Fort S., Domingos J.B., *Development of catalytically active silver colloid nanoparticles stabilized by dextran*, Langmuir. 27 (2011) 11860–11866.
- [13] Gu S., Wunder S., Lu Y., Ballauff M., Fenger R., Rademann K., Jaquet B., Zacccone A., *Kinetic analysis of the catalytic reduction of 4-nitrophenol by metallic nanoparticles*, J. Phys. Chem. C. 118 (2014) 18618–18625.
- [14] Hallett-Tapley G.L., Crites C.-O.L., González-Béjar M., McGilvray K.L., Netto-Ferreira J.C., Scaiano J.C., *Dry photochemical synthesis of hydrotalcite, γ -Al₂O₃ and TiO₂ supported gold nanoparticle catalysts*, J. Photochem. Photobiol. A Chem. 224 (2011) 8–15.
- [15] Wunder S., Polzer F., Lu Y., Mei Y., Ballauff M., *Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes*, J. Phys. Chem. C. 114 (2010) 8814–8820.
- [16] Signori A.M., Santos K. de O., Eising R., Albuquerque B.L., Giacomelli F.C., Domingos J.B., *Formation of Catalytic Silver Nanoparticles Supported on Branched Polyethyleneimine Derivatives*, Langmuir. 26 (2010) 17772–17779.
- [17] Souza F.D., Fiedler H., Nome F., *Zwitterionic Surfactant Stabilized Palladium Nanoparticles as Catalysts in Aromatic Nitro Compound Reductions*, J. Braz. Chem. Soc. (2015).
- [18] Compagnini G., Condorelli M., Fragalà M.E., Scardaci V., Tinnirello I., Puglisi O., Neri F., Fazio E., *Growth kinetics and sensing features of colloidal silver nanoplates*, J.
-

- Nanomater. 2019 (2019).
- [19] McGilvray K.L., Fasciani C., Bueno-Alejo C.J., Schwartz-Narbonne R., Scaiano J.C., *Photochemical strategies for the seed-mediated growth of gold and gold-silver nanoparticles*, Langmuir. 28 (2012) 16148–16155.
- [20] Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J., *Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio*, Chem. Commun. (2001) 617–618.
- [21] Zhang W., Hu G., Zhang W., Qiao X., Wu K., Chen Q., Cai Y., *Surfactant-directed synthesis of silver nanorods and characteristic spectral changes occurred by their morphology evolution*, Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures. 64 (2014) 211–217.
- [22] Rekha C.R., Nayar V.U., Gopchandran K.G., *Synthesis of highly stable silver nanorods and their application as SERS substrates*, J. Sci. Adv. Mater. Devices. 3 (2018) 196–205.
- [23] Harada M., Saijo K., Sakamoto N., Ito K., *Characterization of water/AOT/benzene microemulsions during photoreduction to produce silver particles*, J. Colloid Interface Sci. 343 (2010) 423–432.
- [24] Watzky M.A., Finke R.G., *Transition metal nanocluster formation kinetic and mechanistic studies. A new mechanism when hydrogen is the reductant: Slow, continuous nucleation and fast autocatalytic surface growth*, J. Am. Chem. Soc. 119 (1997) 10382–10400.
- [25] Finney E.E., Finke R.G., *Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: A review emphasizing transition-metal nanoclusters*, J. Colloid Interface Sci. 317 (2008) 351–374.
- [26] McGilvray K.L., Granger J., Correia M., Banks J.T., Scaiano J.C., *Opportunistic use of tetrachloroaurate photolysis in the generation of reductive species for the production of gold nanostructures*, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 11914–11918.
- [27] Harada M., Katagiri E., *Mechanism of silver particle formation during photoreduction using in situ time-resolved saxs analysis*, Langmuir. 26 (2010) 17896–17905.
- [28] Sau T.K., Pal A., Jana N.R., Wang Z.L., Pal T., *Size controlled synthesis of gold nanoparticles using photochemically prepared seed particles*, J. Nanoparticle Res. 3 (2001) 257–261.
- [29] Zong R., Wang X., Shi S., Zhu Y., *Kinetically controlled seed-mediated growth of narrow dispersed silver nanoparticles up to 120 nm: Secondary nucleation, size focusing, and Ostwald ripening*, Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 4236–4241.
-

- [30] Park J., Joo J., Soon G.K., Jang Y., Hyeon T., *Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals*, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 4630–4660.
- [31] Zhang W., Qiao X., Chen Q., Cai Y., Chen H., *The influence of synthesis condition and aging process of silver nanocrystals on the formation of silver nanorods*, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 5909–5913.
- [32] Tao A.R., Habas S., Yang P., *Shape control of colloidal metal nanocrystals*, *Small.* 4 (2008) 310–325.
- [33] Menumerov E., Hughes R.A., Neretina S., *Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol: A Quantitative Assessment of the Role of Dissolved Oxygen in Determining the Induction Time*, *Nano Lett.* 16 (2016) 7791–7797.
- [34] Lara L.R.S., Zottis A.D., Elias W.C., Faggion D., Maduro De Campos C.E., Acuña J.J.S., Domingos J.B., *The catalytic evaluation of in situ grown Pd nanoparticles on the surface of Fe₃O₄@dextran particles in the p-nitrophenol reduction reaction*, *RSC Adv.* 5 (2015) 8289–8296.
- [35] Kästner C., Thünemann A.F., *Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol Using Silver Nanoparticles with Adjustable Activity*, *Langmuir.* 32 (2016) 7383–7391.
- [36] Bakshi M.S., *How Surfactants Control Crystal Growth of Nanomaterials*, *Cryst. Growth Des.* 16 (2016) 1104–1133.
- [37] Almora-Barrios N., Novell-Leruth G., Whiting P., Liz-Marzán L.M., López N., *Theoretical description of the role of halides, silver, and surfactants on the structure of gold nanorods*, *Nano Lett.* 14 (2014) 871–875.
- [38] Pachón Gómez E.M., *Sistemas autoensamblados de surfactantes Gemini. Síntesis, caracterización y aplicaciones*, Universidad Nacional de Córdoba (UNC), 2018.
- [39] Bakshi M.S., *Room temperature surfactant assisted crystal growth of silver nanoparticles to nanoribbons*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 1757–1765.

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE SONDAS MOLECULARES CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS



5.1 INTERRUPTORES MOLECULARES

Los *interruptores moleculares reversibles* son entidades capaces de cambiar sus propiedades en presencia de estímulos externos. Debido a que los cambios son reversibles, en ausencia del estímulo externo o la aplicación de otro estímulo, permite que el interruptor regrese a su estado inicial [1]. Estos interruptores se emplean en el transporte de fármacos [2], como biosensores [3], biocatalizadores [4], entre otros. El funcionamiento de los mismos se basa, por ejemplo, en la isomerización de moléculas individuales. En este caso, se han investigado en detalle aquellos interruptores que responden a la luz debido a que pueden ser controlados en forma “remota” y tienen una respuesta rápida (milisegundos, en general). Dentro de estos interruptores se pueden mencionar aquellos que existen sólo cuando son irradiados por una fuente de luz constante, como los azobencenos, espiropiranos, etc (figura 5.1).

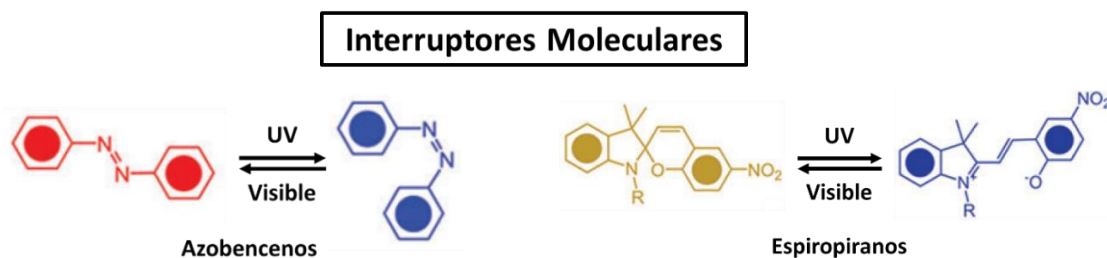


Figura 5.1. Ejemplos de interruptores reversibles moleculares. Ref. [1].

5.1.1 COMPUESTOS AZO

Los compuestos azo conforman la mayor parte de los colorantes comerciales empleados en una gran variedad de procesos en la industria textil, del papel, cosmética, alimenticia y farmacéutica [5]. Estas moléculas se caracterizan por presentar en su estructura un grupo azo ($-N=N-$) unido a dos sustituyentes, principalmente bencenos o naftalenos, que contienen grupos donores o aceptores de electrones.

Los compuestos azo poseen dos conformaciones, *cis* y *trans*, de las cuales, el isómero *trans* es el más estable. La isomerización puede favorecerse por la irradiación de luz a una cierta longitud de onda o al suministrar calor. Por ejemplo, azobenceno puede realizar la conversión *trans* \rightarrow *cis* al ser irradiado con luz UV (320-380 nm) (figura 5.2). Al suministrar calor o luz visible (380- 450 nm), es posible la reconversión al isómero *trans* [6]. En principio, la isomerización puede tener lugar por dos vías diferentes (figura 5.3), una que involucra el movimiento torsional alrededor del doble enlace $N=N$ (rotación) o una inversión en el plano de uno de los enlaces de los nitrógenos centrales (inversión). Con el pasar de los años, se han realizado trabajos experimentales y teóricos extensivos para dilucidar la contribución de estas vías a la dinámica de la fotoisomerización. Recientemente, Tan *et al.* estudiaron la isomerización de azobenceno por técnicas de espectroscopia láser de ionización multifotónica de alta resolución [7]. A partir de esto propusieron que, inicialmente, se produce la excitación de la molécula acompañada de cambios en los ángulos de hibridación de los átomos de nitrógeno, y la fotoisomerización tiene lugar mediante un mecanismo de inversión asistido por la torsión sobre doble enlace $N = N$.

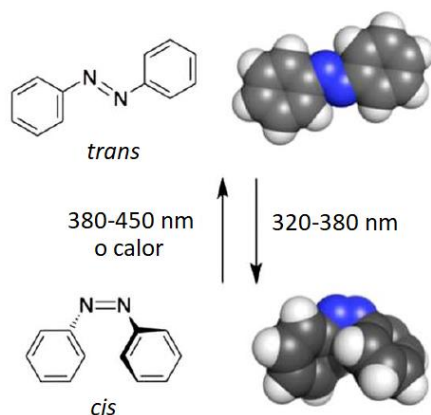


Figura 5.2. Representación de la isomerización *trans-cis* de azobenceno foto y térmicamente inducida. Se observa que el isómero *trans* es, principalmente, plano y no polar; mientras que el isómero *cis* adopta una conformación torcida con momento dipolar. Ref. [6].

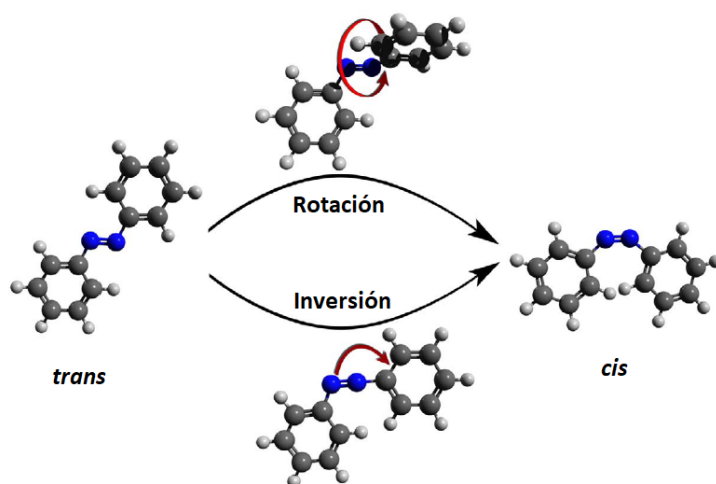


Figura 5.3. Representación de las vías de isomerización de azobenceno *trans*: rotación (torsión alrededor del enlace N=N) e inversión (movimiento de los anillos aromático en el plano). Ref. [7].

Debido a su fotoisomerización, simplicidad y robustez; los compuestos azo comenzaron a emplearse como interruptores reversibles y sus aplicaciones han sido investigadas extensamente en el último siglo. Por ejemplo, se observó que el desempeño de estos interruptores se veía alterado en presencia de nanopartículas metálicas, ya que las mismas eran capaces de desactivar los estados electrónicos excitados de moléculas orgánicas quimi o fisorbidas en su superficie [8]. En general, este fenómeno ocurre debido al solapamiento de la absorción del cromóforo y de la banda de plasmón superficial (SPR) de la MNP. Sin embargo, el desempeño óptimo de estos interruptores depende de la distancia a la que se encuentran con respecto a la superficie metálica [9]. De esta manera, los interruptores moleculares que

se adsorben en la superficie de nanopartículas pueden modificar sus propiedades ópticas de dos maneras. Primero, la isomerización del interruptor implica cambios en sus propiedades electrónicas y modificaciones en la constante dieléctrica en proximidad a la superficie de la MNP. Segundo, los interruptores moleculares pueden controlar las propiedades ópticas de las MNP indirectamente al cambiar las distancias entre las MNP y/o mediando la agregación de las mismas [1].

En algunos casos, la fotoisomerización está completamente inhibida. Esto puede atribuirse al tautomerismo azo-hidrazona que experimentan algunos compuestos azo. El tautomerismo en este tipo de compuestos se produce por el reordenamiento en la molécula de un átomo de hidrógeno hacia o desde el grupo azo (figura 5.4). Esto es común para los compuestos que poseen un grupo $-OH$ en las posiciones *orto* o *para* respecto al grupo azo [10].



Figura 5.4. Tautomerismo azo-hidrazona en los compuestos azo

Debido que los colores y las propiedades de los tautómeros pueden ser muy diferentes entre ellos [11], es posible emplear los mismos como sensores de algunos compuestos. Por ejemplo, Satheshkumar *et al.* sintetizaron un compuesto azo que puede detectar selectivamente iones fluoruro [12]. El tautómero hidrazona de este compuesto es amarillo y, al interactuar con el ion F^- , se produce un desplazamiento del equilibrio hacia la formación del tautómero azo, de coloración roja; que no se evidencia en presencia de otros aniones. A su vez, Adegoke *et al.* también desarrollaron un sensor empleando compuestos azo para la detección selectiva del ion cianuro, por medio del cambio de color de la solución de amarillo a marrón rojizo [13]. Sin embargo, la utilización de los compuestos azo como sensores basados en su tautomerismo azo-hidrazona, no es un área de gran desarrollo en la actualidad. Si bien el tautomerismo de ciertos compuestos azo ha sido estudiado desde hace mucho tiempo [14], no se han reportado aplicaciones al respecto. En estas condiciones se encuentra el compuesto azo Para Red.

Para Red (PR) es un compuesto azo que no exhibe fotoisomerización debido a que existe casi completamente en su forma hidrazona (figura 5.5) [15]. Este compuesto se ha empleado como colorante en la industria textil y se han desarrollado varias metodologías para su detección debido a que es agregado ilegalmente a ciertas especias para mejorar o mantener la coloración de las mismas (chili, curry, cúrcuma, entre otras) [16]. Debido a que sus propiedades tautoméricas aún no han sido exploradas, resulta interesante estudiar cómo este colorante se comporta en presencia de nanopartículas metálicas y evaluar si es posible emplearlo como sensor de las mismas.

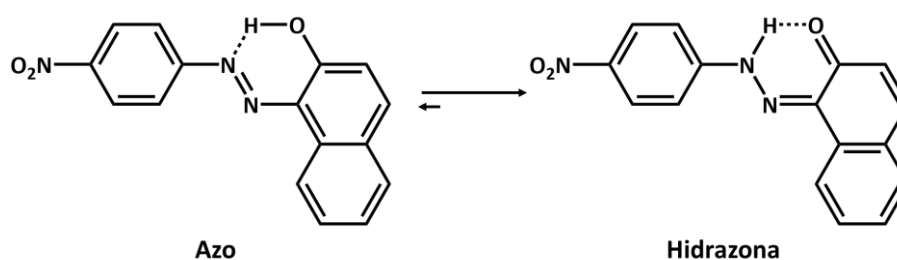


Figura 5.5. Representación del tautomerismo azo-hidrazona de PR.

5.2 SONDAS FLUORESCENTES

La mayoría de los compuestos que presentan fluorescencia son aromáticos o algunos son compuestos alifáticos con un gran número de insaturaciones. En general, un incremento en la extensión del sistema (mayor grado de conjugación) producirá un corrimiento batocrómico en los espectros de absorción y fluorescencia y un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia [17]. En los últimos años, se han empleado diversos compuestos fluorescentes como sondas que interaccionan selectivamente con ciertos compuestos y permiten su detección [18–21] o que actúan como marcadores de biomoléculas para permitir su seguimiento [22,23]. Por ejemplo, Dickinson *et al.* sintetizaron una sonda fluorescente a la que denominaron MitoPY1 para detectar los niveles de peróxido de hidrógeno en la mitocondria de células vivas [23]. Mediante microscopía confocal y citometría de flujo fue capaz de visualizar cambios mitocondriales por la localización de la sonda fluorescente en una gran variedad de tipos de células de mamíferos, generadas por situaciones de estrés oxidativo que aumentaban la concentración de peróxido de hidrógeno. Sahana *et al.* diseñaron una sonda fluorescente derivada de naftaleno a base de indol selectiva para iones azida en soluciones etanol-agua [20]. Al interaccionar los iones azida con la sonda fluorescente se

produce el incremento de la fluorescencia de la sonda, efecto que permite detectar el ion azida en células de granos de polen y en *Candida albicans*.

5.2.1 RODAMINAS

De las sondas fluorescentes orgánicas disponibles en la actualidad, la familia de las rodaminas es una de las más empleadas. Las rodaminas son colorantes que pertenecen a la familia de los xantenos, que, junto a la familia de fluoresceínas, son fluoróforos importantes debido a sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas. Presentan absorción y emisión dentro del espectro visible (450-700 nm), coeficiente de absorptividad molar elevado, y altos rendimientos cuánticos [24]. Debido a esto, las rodaminas poseen una amplia variedad de aplicaciones en biotecnología, para la detección y seguimiento de ciertas moléculas [25,26], o en medicina para generación de imágenes en células vivas o en animales en estudios clínicos [27].

En los últimos años se han sintetizado y comercializado una gran variedad de rodaminas, como la Rodamina B (RhB) y la Rodamina 6G (figura 5.6), y sus derivados. Por ejemplo, un derivado de RhB ha sido empleado como sensor de Fe^{3+} o Cu^{2+} [28]. Al interactuar con Fe^{3+} se produce un incremento de la fluorescencia del sensor, mientras que, al interactuar con Cu^{2+} se produce el incremento de la absorbancia de la misma; efectos que se modulan por los valores de pH de la mezcla. A pH 6, el derivado forma un complejo con Fe^{3+} , mientras que a pH 8,5 lo hace con Cu^{2+} . De esta manera, esta sonda fluorescente puede detectar dos iones selectivamente al variar el pH del medio. También se ha empleado R6G y AuNP como un sensor fluorescente que detecta iones mercurio en soluciones acuosas [29]. Al adicionar albumina sérica bovina (BSA) a una solución de R6G y AuNP, modificadas con ácido mercaptopropiónico (MPA-AuNP), la sonda BSA@R6G/MPA-AuNP puede emplearse para detectar iones mercurio en medios altamente salinos. Inicialmente, la fluorescencia que presenta esta sonda es muy baja; sin embargo, las especies de mercurio que se adicionan se depositan en la superficie de las AuNP y liberan a la solución las moléculas de R6G, lo que incrementa la intensidad de fluorescencia de la solución.

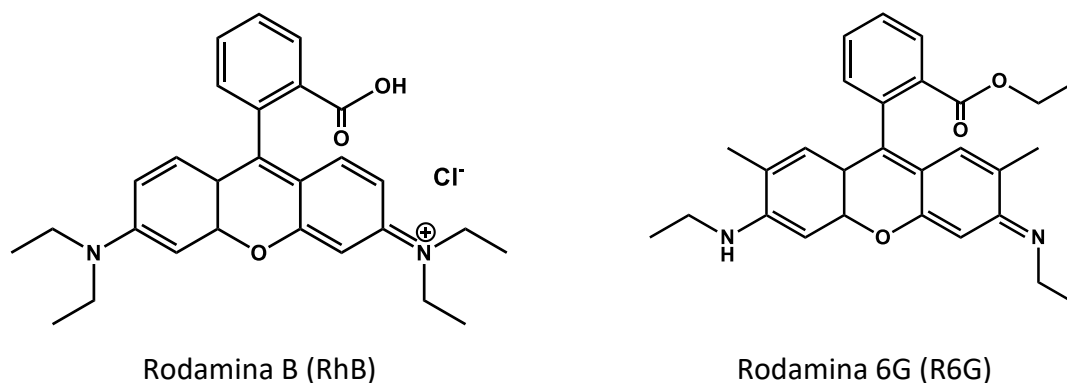
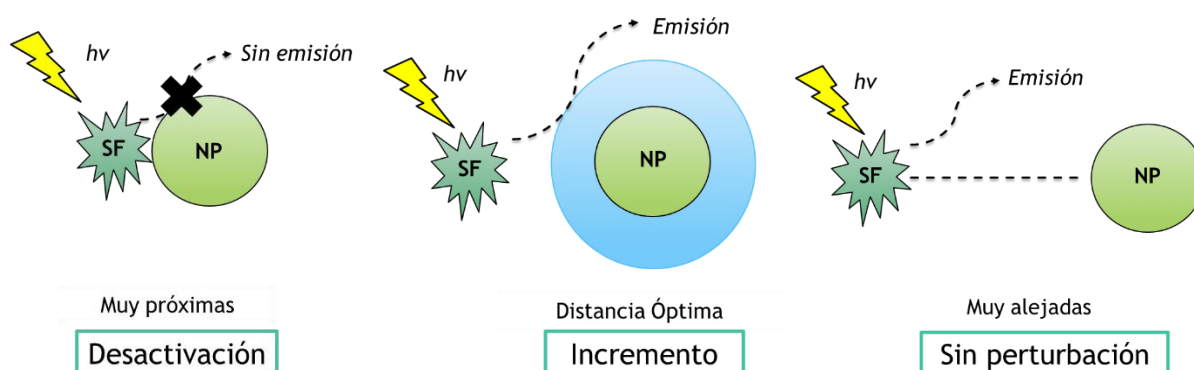


Figura 5.6. Estructura química de rodamina B y rodamina 6G.

Los efectos que se producen en la fluorescencia de las rodaminas, debido a su interacción con nanopartículas metálicas, han sido estudiados ampliamente. Se ha observado que las propiedades de las sondas fluorescentes están influenciadas por las distancias a las que se encuentran de la superficie de MNP y son ocasionadas por la resonancia de plasmón superficial (SPR) de las mismas (figura 5.7) [30]. Por ejemplo, cuando una sonda fluorescente se encuentra a una distancia apropiada de la MNP, la influencia del campo cercano de la NP provoca un incremento de la fluorescencia por efecto plasmónico. Si el fluoróforo se encuentra muy cerca de la MNP, la partícula extrae todos los electrones del estado excitado del fluoróforo generando la desactivación de la fluorescencia del mismo. Si la distancia entre la sonda fluorescente y la MNP es grande, el campo de la MNP no alcanza al fluoróforo y no habrá un efecto en la intensidad de fluorescencia resultante [31].



SF = sonda fluorescente.
NP = nanopartícula metálica.

Figura 5.7. Efecto de las MNP en sondas fluorescentes. En función de la distancia del fluoróforo a la superficie de la MNP se pueden observar fenómenos de desactivación, incremento o no perturbación de la fluorescencia de la sonda. Ref. [31].

La modulación de la fluorescencia en función de la distancia del fluoróforo es una propiedad que ha sido aprovechada para la detección de ciertos analitos [29,32]. Sin embargo, aún no hay trabajos en la literatura que exploren estas propiedades para la detección de nanopartículas metálicas. Este es un nuevo campo que debería ser explorado para evaluar cómo la naturaleza de las nanopartículas, su tamaño y los ligandos que las estabilizan, influyen en la interacción que tienen con estas sondas fluorescentes.

5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar el coeficiente de absorptividad molar de Para Red (PR) y evaluar el efecto del solvente y del pH del medio en la absorción de PR por técnicas espectroscópicas.
- ✓ Evaluar la interacción de PR con las nanopartículas metálicas sintetizadas empleando espectroscopia UV-visible.
- ✓ Estudiar la interacción de las sondas fluorescentes Rodamina 6G y Rodamina B con nanopartículas metálicas.
- ✓ Evaluar la influencia de las interacciones de MNP con las sondas moleculares y si estas dependen del tamaño de las MNP y el ligando que las estabiliza.

5.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.4.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se utilizaron como se recibieron: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), ácido gálico (Merck), RhB (Aldrich), R6G (Aldrich), Para Red (Aldrich), NaCl (Taurus), KCl (Merck), fosfato dihidrógeno de sodio (J.T.Baker) y fosfato monohidrógeno de disodio (AppliChem).

5.4.2 Instrumentos

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent) con un *peltier* para controlar la temperatura a 25,0 °C.

Las mediciones de pH se realizaron en un pHmetro Orion (Boston, MA, USA) modelo 720 A empleando un electrodo Ross combinado. El mismo se calibró usando buffers estándar a pH = 4,008 y 6,994.

5.4.3 Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido gálico

La obtención de AgNP@gálico se llevó a cabo acorde a una modificación del método de Yoosaf reportada en literatura [33]. En un Erlenmeyer se adicionó ácido gálico 27,3 μM a una solución acuosa que contenía AgNO_3 200 μM e NaOH 740 μM , bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente y por 5 minutos protegida de la luz. Inmediatamente, el color de la solución cambió a amarillo brillante. Luego, las nanopartículas obtenidas se centrifugaron a 8243 RCF (8000 rpm) por 30 minutos y el *pellet* se resuspendió en 6,0 mL de agua MilliQ.

5.4.4 Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con citrato

La síntesis de estas NP se realizó calentando a reflujo una solución acuosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1,32 mM) bajo agitación vigorosa. Luego se le adiciona $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (3,2 mM), manteniendo el reflujo por 20 minutos. El color de la solución viró de amarillo a rojo intenso. A temperatura ambiente se centrifugaron las AuNP 2608 RCF (4500 rpm) por 30 minutos; se descartó el sobrenadante y los *pellets* se resuspendieron en 6 mL de agua MilliQ en tubos Falcon™ de polipropileno.

5.4.5 Soluciones de Para Red empleadas en espectroscopia UV-visible.

La determinación del coeficiente de absortividad molar de PR se realizó preparando soluciones individuales de PR (5-30 μM) a partir de una solución madre de PR en EtOH y registrando su espectro de absorción UV-visible entre 200-800 nm.

Para evaluar la influencia de la proporción de agua en el espectro de absorción de PR se realizaron soluciones de PR (14,5 μM) incrementando la proporción de agua en relación al etanol.

La variación de pH de las soluciones de PR se realizó agregando alícuotas de HCl o NaOH a soluciones de PR de concentración final 6,8 μM con diferentes proporciones de solvente EtOH/ H_2O (1:1 y 1:9).

En el caso de la interacción de PR y MNP, se emplearon AgNP@SDDC de 12 nm (DE = 3) y AgNP@gálico de 18 nm (DE = 4). A diferentes soluciones de AgNP@gálico (5-24 pM) y AgNP@SDDC (100-250 pM) se les adicionó PR (1,2 μM para AgNP@SDDC y 1,2 o 12 μM para AgNP@gálico) en EtOH/ H_2O 1:9 y se registraron sus espectros de absorbancia entre 200-800 nm a 25,0 °C, con un paso óptico de 1 cm.

5.4.6 Fluorescencia de rodamina 6G y rodamina B con nanopartículas metálicas

Se prepararon soluciones de R6G (0,40 μM) y RhB (0,55 μM) en buffer fosfato 0,01 M pH 6,94, o sólo en agua MilliQ y fueron excitadas a 526,5 y 575,0 nm respectivamente, en ausencia y presencia de AgNP@SDDC (4,2 – 260 pM), AgNP@gálico (2,5 – 300 pM) y AuNP@citrato (2,5 – 95 pM). La concentración de las MNP se estimó considerando la polidispersidad de la distribución de tamaño de las mismas, de acuerdo a aproximaciones reportadas en literatura [34]. Se emplearon anchos de rendija de 2,5 nm y una ganancia del detector de 740 V (RhB, PBS), 770 V (RhB, agua) y 650 V (R6G, PBS y agua). Los espectros se registraron en un rango de 555 – 700 nm y 530 – 700 nm para RhB y R6G, respectivamente, en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico a 25,0 °C.

Los espectros registrados se corrigieron por efecto de filtro interno usando la ecuación 5.1 [35,36]:

$$F_{corr} = F_{obs} \times \left(\frac{2,3 \times S_2 \times A_{ex}}{1 - 10^{-S_2 A_{ex}}} \times 10^{-S_3 A_{em}} \times \frac{2,3 \times S_1 \times A_{em}}{1 - 10^{-S_1 A_{em}}} \right) \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde F_{corr} y F_{obs} corresponden a la intensidad de emisión de fluorescencia corregida y observada respectivamente; S_1 (0,8 cm), S_2 (1,0 cm) y S_3 (0,5 cm) son dimensiones de las cubetas descritas en las referencias [36,37]; A_{ex} y A_{em} son las absorbancias/cm a la longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. Para AgNP@gálico, la corrección se realizó para concentraciones mayores a 160,0 pM y 270,0 pM cuando se empleó R6G o RhB, respectivamente. Para AuNP@citrato, las correcciones por filtro interno se realizaron a niveles mayores a 30,0 pM. Finalmente, no se realizó ninguna corrección para AgNP@SDDC.

5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Se sintetizaron AuNP@citrato de tamaños diferentes, AgNP@SDDC y AgNP@gálico por reducción química de acuerdo a la metodología descrita en la sección anterior. Se caracterizaron por espectroscopia UV-visible (figura 5.9) y microscopia electrónica de transmisión (TEM) (figura 5.8 A-D). En todos los casos se obtuvieron nanopartículas esféricas. Con respecto a las AuNP@citrato, se sintetizaron nanopartículas de 22 nm (SD = 5) con una absorbancia máxima a 523 nm (AuNP²²@citrato) y FWHM de 104 nm; y nanopartículas de 26

nm (SD = 5) con una absorbancia máxima de resonancia del plasmón a 528 nm (AuNP²⁶@citrato) y FWHM de 226 nm. Por su parte, las AgNP@gálico presentaron una señal de plasmón superficial a 401 nm, FWHM de 63,5 nm y 18 nm (SD = 4) de diámetro. Finalmente, se obtuvieron AgNP@SDDC de 12 nm (SD = 3) con la señal del plasmón superficial centrada en 410 nm. Estas MNP se emplearon para evaluar su interacción con tres sondas moleculares, previa caracterización de las mismas.

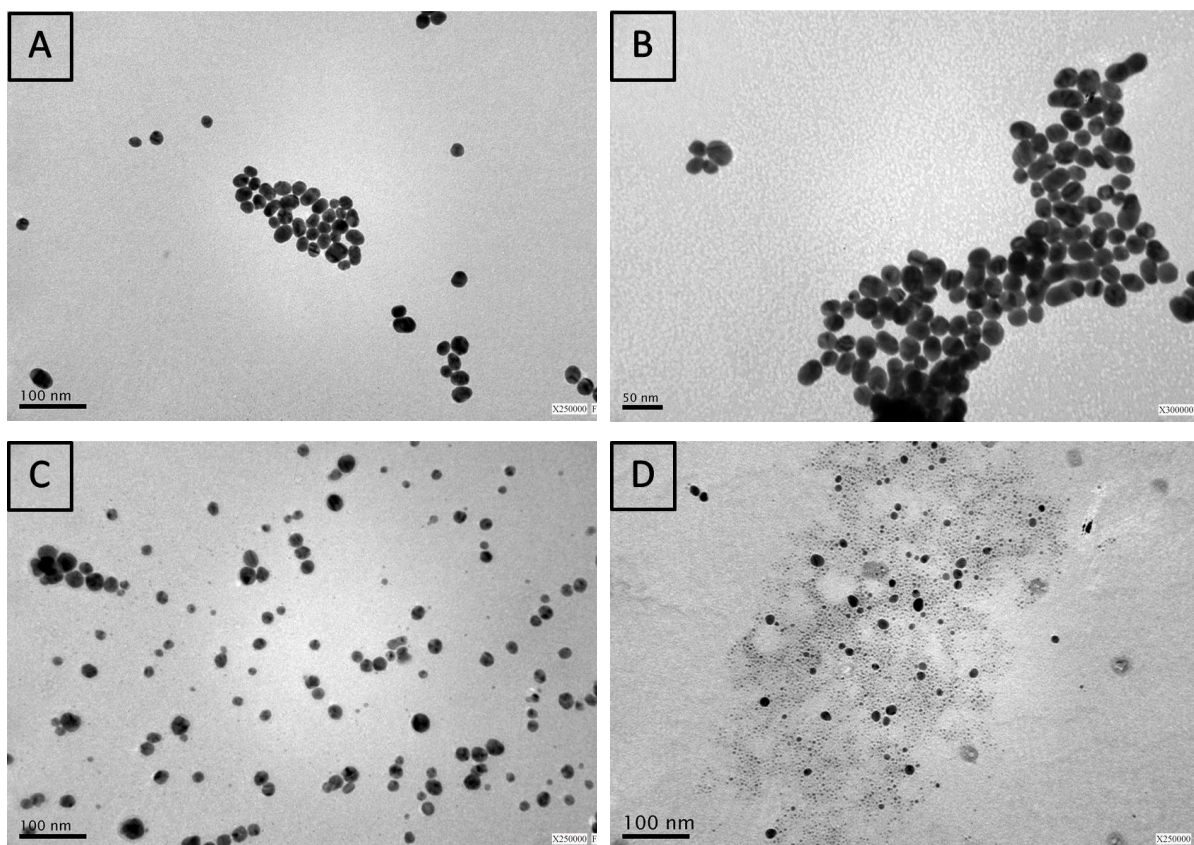


Figura 5.8. Imágenes representativas de TEM de AuNP²²@cittrato (A), AuNP²⁶@cittrato (B), AgNP@gálico (C) y AgNP@SDDC (D), observándose nanopartículas esféricas en todos los casos.

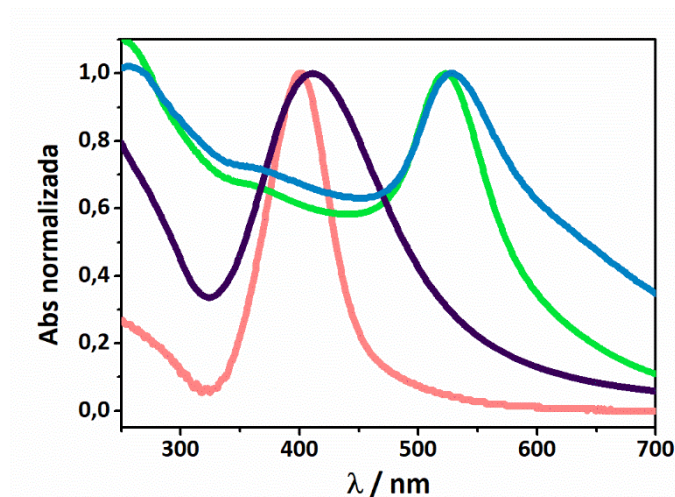


Figura 5.9. Espectros de absorción de AgNP@gálico (—), AgNP@SDDC (—), AuNP²²@cittrato (—) y AuNP²⁶@cittrato (—), donde se observa la absorción máxima de cada MNP a 401, 410, 523 y 528 nm, respectivamente.

5.5.2. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PARA RED

Inicialmente, se prepararon soluciones madre de PR en etanol debido a su baja solubilidad en agua. A partir de esta solución, se determinó su coeficiente de absorción molar (ϵ) en etanol y se evaluó la influencia del solvente y del pH en el espectro de absorción de PR.

5.5.2.1 Espectros de absorción UV-visible de Para Red y determinación de su absorción molar

En la figura 5.10 se observan las señales características del espectro de absorción UV-visible de PR en etanol. El mismo se caracteriza por presentar máximos de absorción a 484 y 326 nm, con un hombro a 292 nm. Debido a que los compuestos azo poseen tautomerismo azo-hidrazona (figura 5.6), se observó que, en el caso de PR, el equilibrio está desplazado hacia la formación del tautómero hidrazona en solventes orgánicos polares [38,39]. De esta manera, a 484 nm se observa la señal correspondiente a la forma hidrazona, mientras que entre 400-450 nm se encuentra un hombro que corresponde a la forma azo de PR [40].

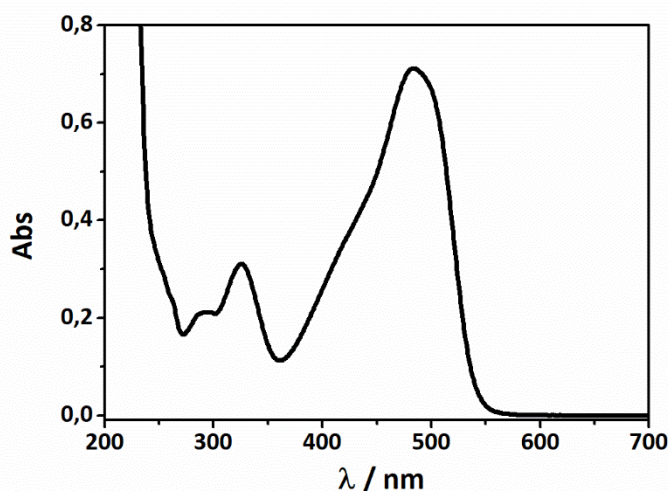


Figura 5.10. Espectro de absorción UV-visible de PR (12 μM) en etanol a 25,0 $^{\circ}\text{C}$ empleando celdas de 1 cm de paso óptico.

La absorptividad molar (ϵ) se determinó a partir de la variación de absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima en función de la concentración de PR. La regresión de los datos graficados, según la ley de Lambert-Beer ($\text{Abs} = \epsilon b [c]$), fue lineal con un coeficiente de correlación $>0,998$. A partir de esta pendiente se determinó el valor de ϵ de PR, siendo de $(237,3 \pm 0,3)10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 484 nm en etanol.

5.5.2.2 Efectos de la relación etanol/agua en el espectro de absorción de Para Red

A partir de la solución madre de PR en etanol, se evaluó la influencia de la proporción de agua en el espectro de absorción de PR. Se observó que el incremento de la proporción de agua, en relación al etanol, generaba una disminución de la banda a 484 nm de PR (figura 5.11), que podría indicar el desplazamiento del equilibrio al tautómero azo de PR sobre la especie hidrazona. Sin embargo, en la literatura se ha reportado que el incremento en la polaridad del medio desplaza el equilibrio a la formación del tautómero hidrazona para compuestos azo similares [10,41]. Si el efecto fuese producido por la precipitación de PR, dada su menor solubilidad en agua, se debería observar un marcado aumento en la dispersión de luz a mayores longitudes de onda, lo que no se evidencia en este caso.

Para explicar este fenómeno, se postula que el incremento en la proporción de agua del medio podría promover la formación de puentes hidrógeno más efectivos entre el agua y el OH de PR, favoreciendo la ruptura del enlace de hidrógeno intramolecular y desplazando el equilibrio hacia la formación del tautómero azo.

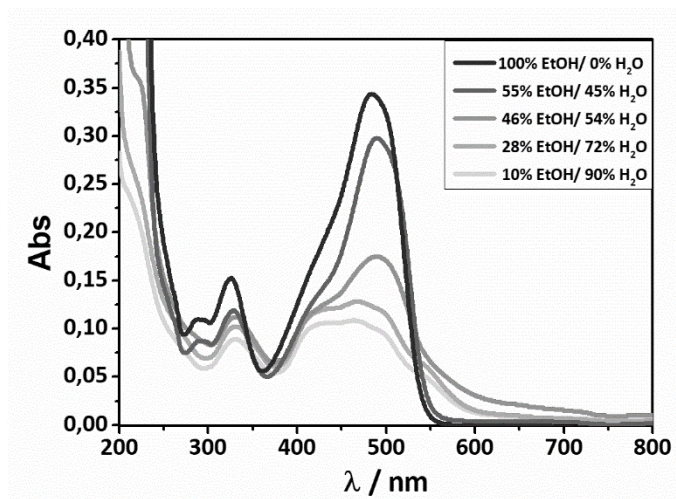


Figura 5.11. Efecto de la variación en la proporción EtOH/H₂O en el espectro de absorción de PR, a 25,0 °C.

5.5.2.3 Efectos del pH en la absorción UV-visible de Para Red

Se evaluó el efecto de pH en las propiedades espectroscópicas de PR. En la figura 5.12 se observa el espectro de absorción UV-visible de PR a tres niveles de pH y para soluciones a diferente proporción de mezclas de solvente. Empleando una relación 1:9 EtOH/H₂O, no se observan cambios significativos en la posición del máximo del espectro de absorción de PR (figura 5.12A) para los niveles de pH evaluados. Sin embargo, a pH 12 y a una relación EtOH/H₂O 1:1, se observa el desplazamiento batocrómico de la longitud de onda de absorción máxima de PR a 540 nm (figura 5.12B), que indicaría la formación de una especie naftolato (figura 5.13). Esto es consistente con el trabajo realizado por Barnes *et al.* [42], donde analizaron dos compuestos azo (Para Red y Orange II) y mediante un análisis por espectroscopia Raman identificaron las señales correspondientes a la forma naftolato de PR a pH básico y la forma hidrazona correspondiente a pH neutro.

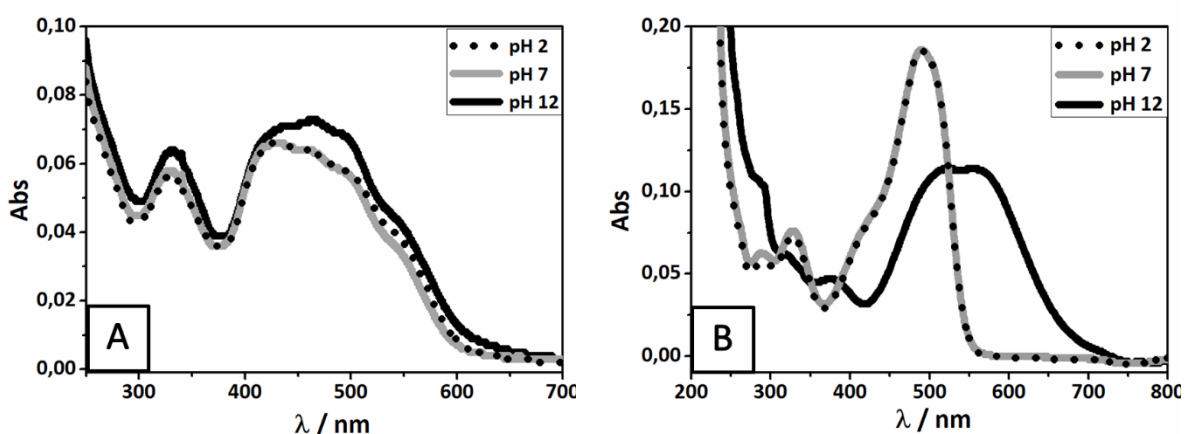


Figura 5.12. Espectros de absorción UV-visible de PR a tres niveles de pH (2,7 y 12) en una solución 1:9 (A) y 1:1 (B) EtOH/H₂O, a 25°C y b =1 cm.

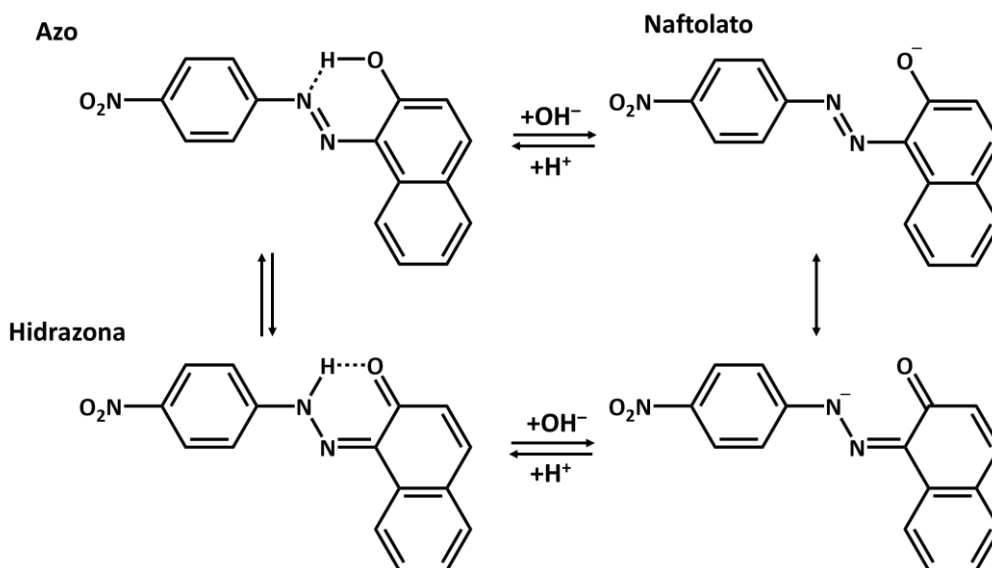


Figura 5.13. Representación del equilibrio ácido-base tautomérico de PR. Ref. [42].

5.5.3 INTERACCIÓN DE PARA RED CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

La interacción de PR con MNP se evaluó empleando AgNP@gálico a dos niveles de concentración de PR (1,2 o 12 μM), variando la concentración de las MNP a una proporción 1:9 y 1:1 EtOH/H₂O. A su vez, se examinó la interacción de PR (1,2 o 11 μM) con AgNP@SDDC a una proporción 1:9 EtOH.

Primero, se analizó el efecto de la interacción entre las MNP y PR a partir de los espectros de absorbancia de ambos componentes. Para ello, se obtuvo el espectro diferencia (ΔAbs) al restar el espectro de absorción de PR a la absorbancia de la mezcla MNP/PR, y este se comparó con el espectro de la MNP. De la misma forma, esto se realizó para PR comparando el espectro

diferencia con el espectro de PR puro. Finalmente, todos los espectros de absorbancia experimentales se analizaron en función del espectro diferencia de absorbancia neta de la mezcla MNP/PR (ΔAbs_{neto}), que fue realizado restando la absorbancia de las mezclas MNP/PR con la de cada componente por separado ($\Delta Abs_{neto} = Abs_{MNP/PR} - Abs_{SMNP} - Abs_{SPR}$). El objetivo de realizar este procedimiento consiste en evaluar los cambios netos en la absorbancia producidos por la interacción de los componentes de la mezcla. En el caso de que no se produzca interacción, el espectro ΔAbs_{neto} debería ser nulo [43].

5.5.3.1 Nanopartículas de plata funcionalizadas con ácido gálico

Se emplearon los espectros de diferencia de absorbancia neta para evaluar si se observaba alguna dependencia con la concentración de las AgNP@gálico (figura 5.14).

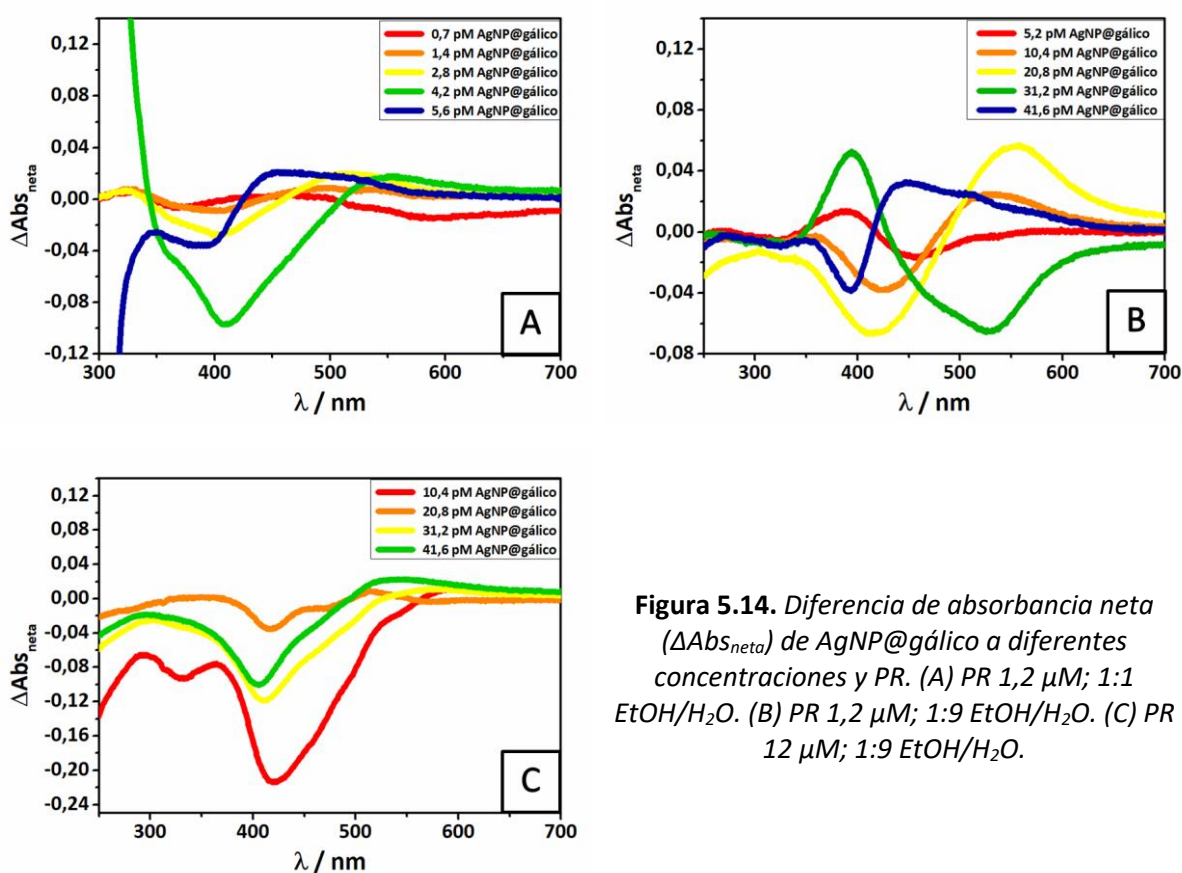


Figura 5.14. Diferencia de absorbancia neta (ΔAbs_{neto}) de AgNP@gálico a diferentes concentraciones y PR. (A) PR 1,2 μM ; 1:1 EtOH/H₂O. (B) PR 1,2 μM ; 1:9 EtOH/H₂O. (C) PR 12 μM ; 1:9 EtOH/H₂O.

En la figura 5.14A, se observa la disminución de la absorbancia de la mezcla alrededor de 400 nm, tendencia que, luego de sobrepasar los 4,2 pM de AgNP@gálico, se pierde. En la literatura, se ha reportado que moléculas orgánicas que contienen heteroátomos (S, N y O)

pueden interactuar fuertemente con la superficie de nanopartículas metálicas actuando como ligandos [44]. Cuando estos ligandos son colorantes, la interacción con AuNP y AgNP resulta en un efecto marcado sobre las propiedades espectroscópicas de los componentes involucrados [31,45]. De esta manera, los cambios en el espectro $\Delta\text{Abs}_{\text{neto}}$ indicarían que PR estaría interactuando con las AgNP@gálico y que esta interacción, si bien, depende en cierta medida de la concentración de AgNP presentes en la mezcla, no lo hace de forma proporcional. Debido a que en estas condiciones PR se encontraría como su tautómero hidrazona, el grupo NH podría interactuar con la superficie de las AgNP@gálico y, al ser una molécula neutra, disminuye la carga neta de la nanopartícula favoreciendo la formación de agregados, lo que produciría el ensanchamiento de la banda SPR de las AgNP@gálico que se observa en la figura 5.15A [46]. En el caso del espectro de PR y de su correspondiente ΔAbs (figura 5.15B), se observa un pequeño incremento de la señal del tautómero hidrazona (484 nm) y una leve disminución de absorbancia en la señal del tautómero azo (400-450 nm) debido a la presencia de AgNP@gálico. Esto podría indicar que existe un desplazamiento del equilibrio hacia una mayor formación de hidrazona, debido a su interacción con las AgNP@gálico.

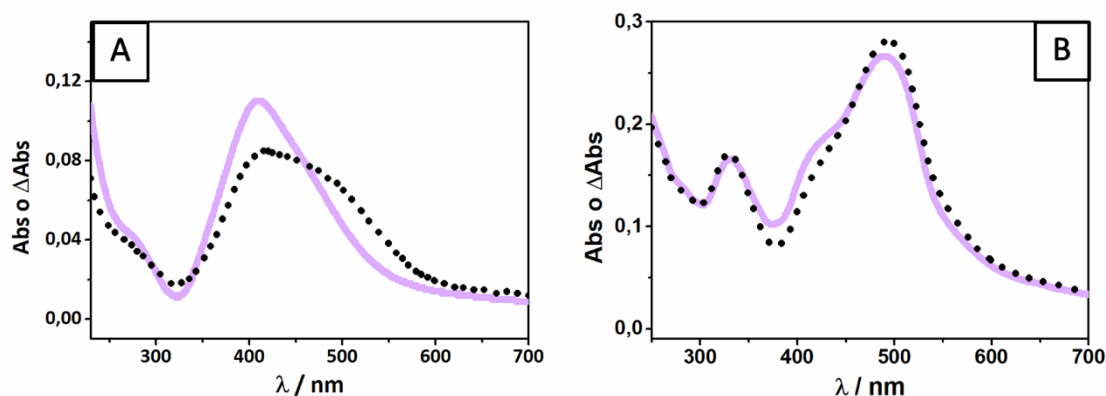


Figura 5.15. Espectros de absorbancia para AgNP@gálico 2,8 pM (A) y PR 1,2 μM (B) (—) en 1:1 EtOH/H₂O con su correspondiente ΔAbs (•••••). 25,0 °C.

En la figura 5.14B se observa variación de la absorbancia en la región de 400-550 nm; y en la figura 5.14C, principalmente, la disminución de la absorbancia de la mezcla. Sin embargo, en ambos casos no se evidencia una tendencia clara con la variación de la concentración de las AgNP@gálico. Se presume que en estas condiciones (1:9 EtOH/H₂O), PR se encuentra en su forma azo principalmente y podría interactuar con la superficie metálica por su grupo OH. Aun así, los cambios registrados son menores al 10% en la mayoría de los casos, muy

pequeños para asegurar que los cambios espectroscópicos observados se producen por interacción entre los componentes de la mezcla o se deben a errores experimentales aleatorios.

5.5.3.2 Nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC

En este caso, no se observaron variaciones en los espectros de absorbancia de PR 1,2 μM o de AgNP@SDDC en las mezclas. Esto podría estar ocasionado por el gran empaquetamiento del ligando SDDC sobre la superficie de la nanopartícula, que dificultaría de alguna manera el acceso de PR a la superficie metálica.

Sin embargo, al incrementar la concentración de PR (11 μM), se observa ensanchamiento de la banda SPR de las AgNP@SDDC (figura 5.16A). La interacción del OH de PR, por enlace de hidrógeno, con el carboxilato del SDDC podría disminuir la carga neta de las AgNP@SDDC, facilitando la formación de agregados, lo que ensancharía su banda SPR [43]. Aun así, los cambios observados son muy pequeños (<10%) como para asegurar que se deben a la interacción entre los componentes de la mezcla (figura 5.17).

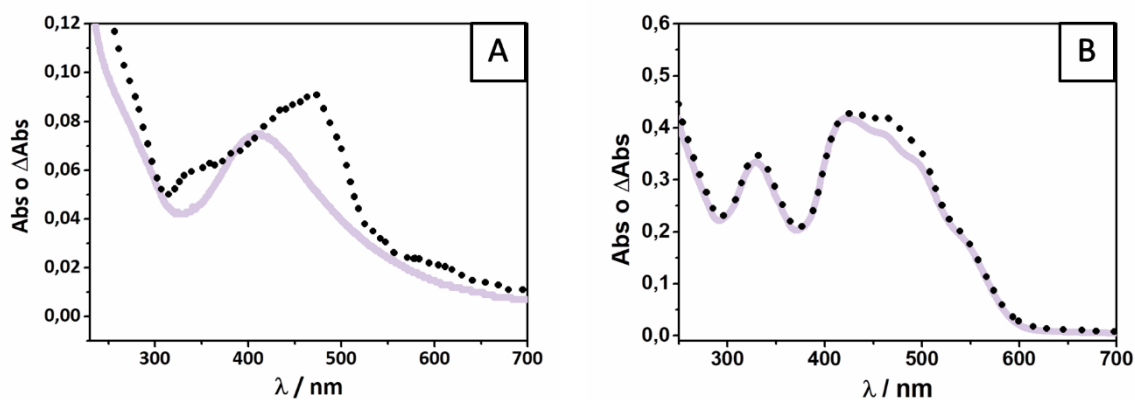


Figura 5.16. Espectros de absorbancia para AgNP@SDDC 0,25 nM (A) y PR 11 μM (B) (—) en 1:9 EtOH/H₂O con su correspondiente ΔAbs (▪▪▪▪▪). 25,0 °C.

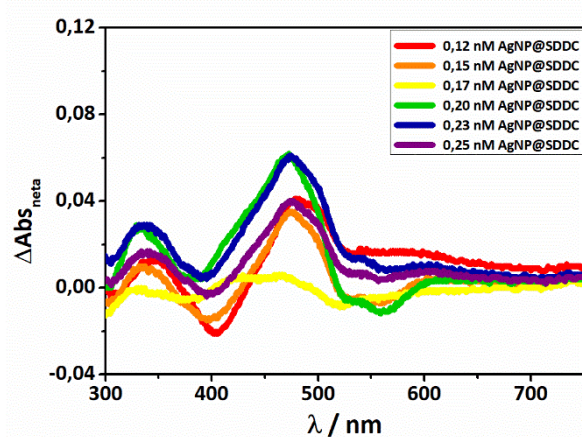


Figura 5.17. Diferencia de absorbancia neta (ΔAbs_{neta}) de AgNP@SDDC a diferentes concentraciones y PR 11 μM , 1:9 EtOH/ H_2O .

5.5.4 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE RODAMINA 6G Y RODAMINA B

Los espectros de absorción de R6G y RhB se muestran en la figura 5.18. Se observó que R6G presentaba un valor de absorción máxima a 525,5 nm y un hombro a 494 nm; mientras que en RhB se registran a 552 y 520 nm.

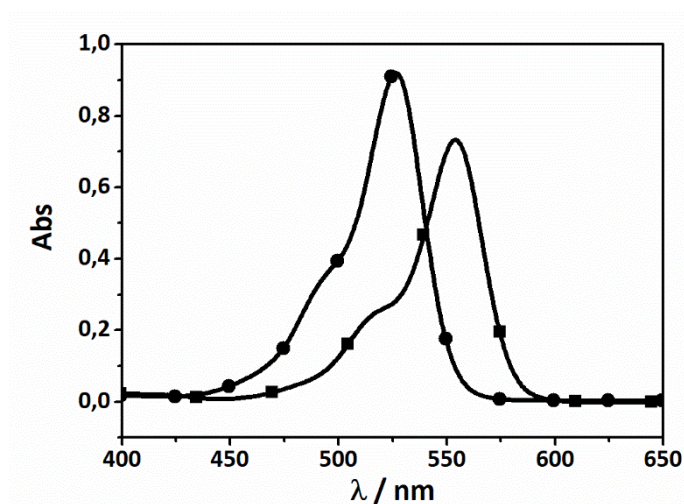


Figura 5.18. Espectros de absorción de R6G 9,7 μM (●) y RhB 13,3 μM (■), en agua a 25°C. Se observan los máximos de absorción a 525,5 y 554 nm, respectivamente.

Se determinó la absorptividad molar de las rodaminas a partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida por cuadrados mínimos entre la absorbancia a la longitud de onda máxima y

la concentración de R6G y RhB. En el caso de R6G el valor de ϵ resultó de $(9,4 \pm 0,1)10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 525,5 nm en agua; y para RhB, de $(54,4 \pm 0,8)10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 552 nm en agua.

Los espectros de emisión de fluorescencia de R6G y RhB se obtuvieron excitando a 525,5 y 554 nm, respectivamente, en agua y en buffer fosfato pH 6,94 (PBS). La emisión máxima para R6G se observó a 551 nm; mientras que para RhB se presentó a 575 nm (figura 5.19). No se observaron discrepancias en la emisión de fluorescencia con o sin control del pH del medio.

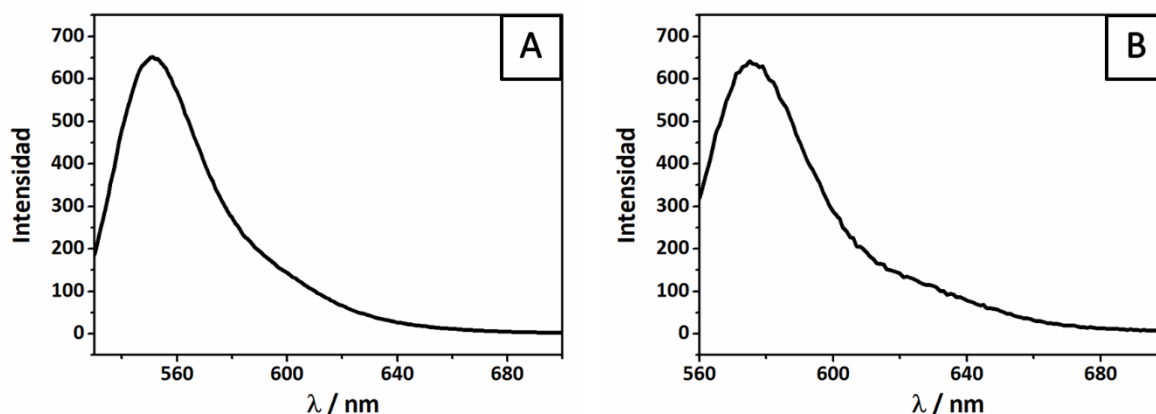


Figura 5.19. Emisión de fluorescencia de R6G 0,40 μM , $\lambda_{exc} = 525,5 \text{ nm}$, (A) y RhB 0,55 μM , $\lambda_{exc} = 554 \text{ nm}$, (B) en PBS, 25,0 $^{\circ}\text{C}$.

5.5.5 INTERACCIÓN DE RODAMINAS CON NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

En todos los casos donde se estudió la interacción de R6G con MNP se observó *quenching* o desactivación de la fluorescencia de R6G (figura 5.20) al incrementar la concentración de MNP. Por lo tanto, las MNP actuarían como *quencher* de la fluorescencia de R6G. Estos estudios se llevaron a cabo manteniendo constante la concentración de R6G (0,40 μM) y variando la concentración de AuNP@citrato, AgNP@gálico y AgNP@SDDC, empleando PBS pH 6,94, cuando se realizó el control de pH. Se eligió una concentración de R6G que permitiera obtener una señal fluorescente con alta intensidad dentro de los límites de saturación del detector del espectrómetro de fluorescencia utilizado.

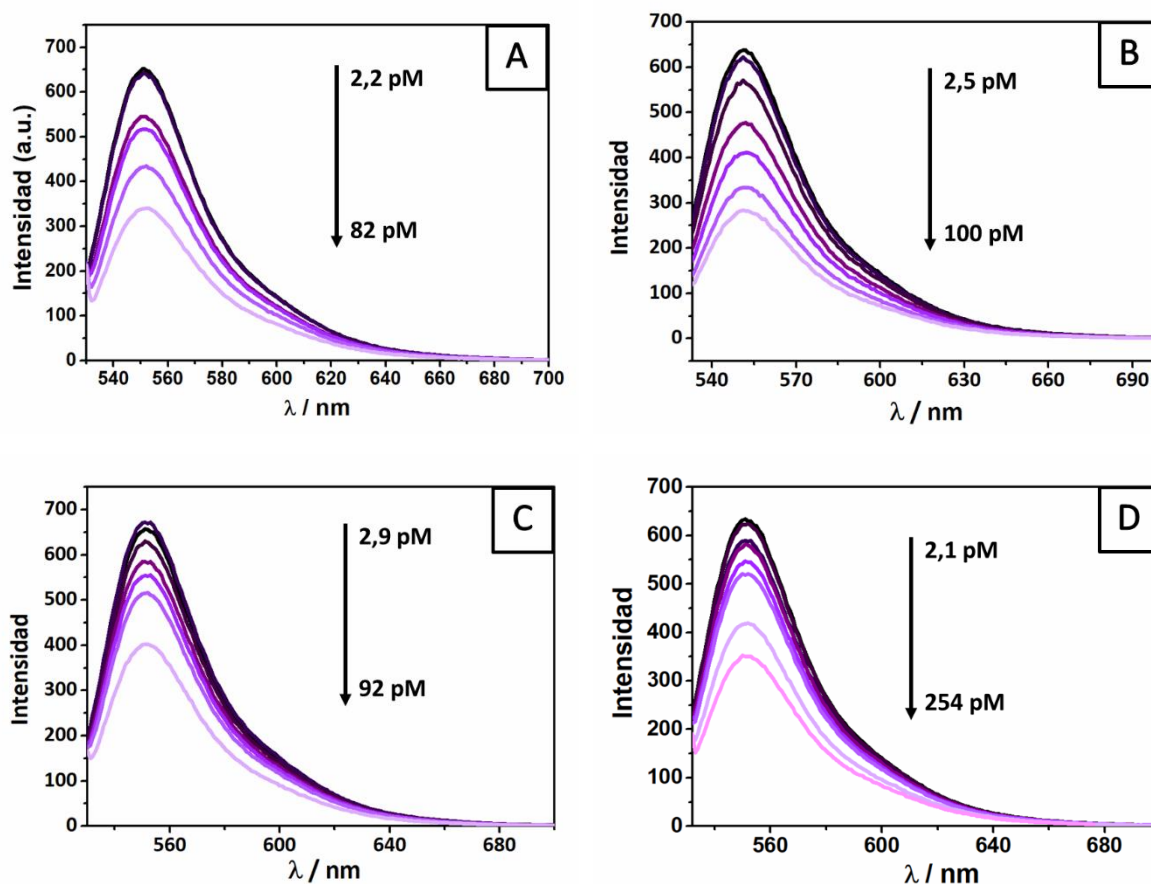


Figura 5.20. Efecto de la concentración de $AuNP^{22}@citrate$ (A), $AuNP^{26}@citrate$ (B), $AgNP@SDDC$ (B) y $AgNP@gálico$ (C) en la emisión de fluorescencia de R6G en PBS pH 6,94 y a 25,0 °C.

Como se ha mencionado en la sección 5.2.1, las sondas fluorescentes, que se encuentran muy cerca de las nanopartículas metálicas, pueden interactuar con su superficie generando desactivación de la fluorescencia de la sonda [31]. R6G posee en su estructura átomos de N y O que podrían interactuar con las MNP [44], lo que la acercaría lo suficiente a la superficie para inducir el *quenching* de la emisión fluorescente de R6G. Usualmente, este fenómeno se produce por transferencia de energía de Förster (FRET) del fluoróforo en estado excitado hacia la MNP. FRET se produce por solapamiento de la banda de emisión del donador y la banda de absorción del aceptor dentro de la región espectral [47]. Como las bandas SPR de $AuNP@citrate$, $AgNP@SDDC$ y $AgNP@gálico$, respectivamente, se solapan parcialmente con la banda de emisión de R6G (551 nm), las MNP estarían actuando como aceptores de los fotones emitidos por el donador R6G (figura 5.22). Por otra parte, Yun *et al.* propusieron otro mecanismo que no está basado en transferencia de energía [48]. La Transferencia Electrónica de Superficie (SET) se basa en la interacción del campo electromagnético del dipolo del donador

con la resonancia de plasmón superficial de la MNP, que actuaría como el aceptor. Los electrones de la banda SPR de la MNP interactúan fuertemente con el dipolo del fluoróforo cuando el mismo se encuentra cerca de la superficie y perpendicular a la misma. Ambos mecanismos podrían combinarse para explicar la desactivación de la emisión de fluorescencia de R6G que generan las MNP empleadas. Estos fenómenos ya fueron reportados para la desactivación de la emisión fluorescente de R6G por AuNP@PVA (25-70 nm) [47].

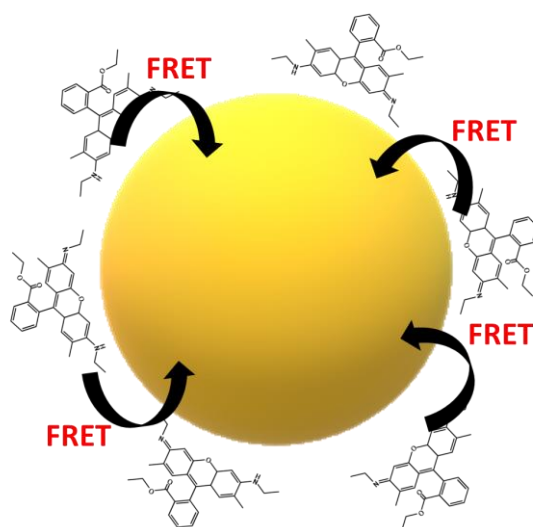


Figura 5.21. Representación esquemática de la transferencia electrónica de R6G a MNP.

En función de los resultados obtenidos, se graficaron las curvas de Stern-Volmer para cada uno de los sistemas estudiados (figura 5.22). Para ello se tomó el área bajo la curva de la señal fluorescente de R6G en ausencia (F_0) y en presencia de MNP (F) y se graficó la relación F_0/F en función de la concentración de MNP. Todas las curvas presentaron un comportamiento lineal, por lo que los valores de K_{SV} se obtuvieron a partir de la regresión lineal por cuadrados mínimos empleando la ecuación B.4. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 5.1.

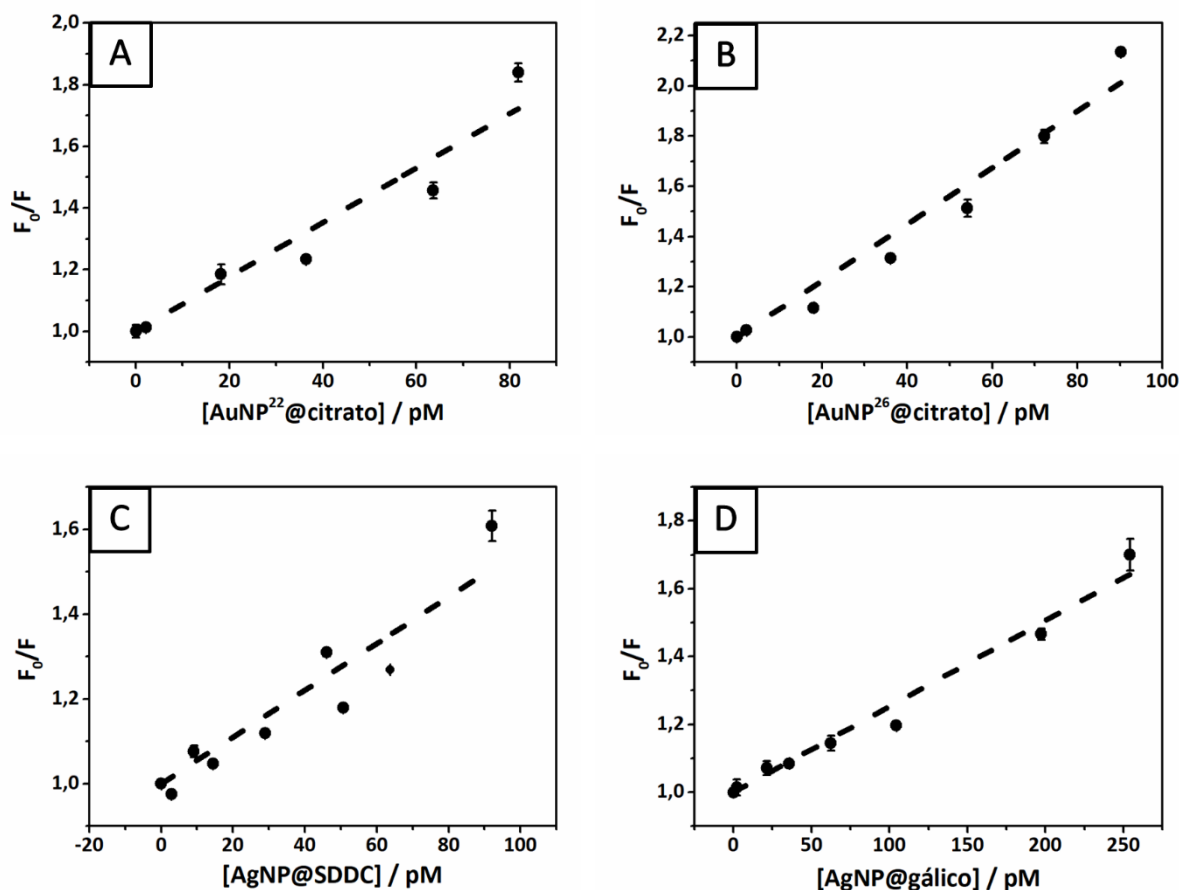


Figura 5.22. Curvas de Stern-Volmer de R6G ($0,4 \mu M$) en presencia de $AuNP^{22}@citrate$ (A), $AuNP^{26}@citrate$ (B), $AgNP@SDDC$ (C) y $AgNP@galico$ (D) en buffer fosfato pH 6,94; $25,0 \text{ }^\circ C$. Las barras de error corresponden las desviaciones estándar para duplicados a cada nivel de concentración.

Tabla 5.1 Constantes de Stern-Volmer para R6G y MNP.

MNP	$K_{SV} (10^9 M^{-1})^*$	
	PBS	Agua
$AuNP^{22}@citrate$	$8,8 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,2$
$AuNP^{26}@citrate$	$11,2 \pm 0,7$	n.d.
$AgNP@SDDC$	$5,5 \pm 0,5$	n.d.
$AgNP@galico$	$2,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$

* $25,0 \text{ }^\circ C$. Los errores en la K_{SV} corresponden a los calculados por el software Origin™ al realizar la regresión lineal. n.d. = no determinado.

Al evaluar cómo el control de pH influye en las constantes de Stern-Volmer determinadas, se observaron valores mayores de K_{SV} para MNP en buffer fosfato pH 6,94, con una mayor

diferencia para AgNP@gálico (50%), que para AuNP²²@citrato (15%). Esto podría deberse a que la variación de pH y el incremento en la concentración de sales influye en la intensidad de fluorescencia observada [17]. Es posible que las sales del buffer presentes en el medio puedan facilitar la interacción de las MNP con R6G.

La naturaleza (metal) y el ligando de la MNP también influyen en la desactivación de la emisión fluorescente de R6G con MNP. En este caso, las constantes de Stern-Volmer son mayores en un 40-70% para AuNP que para AgNP y se observó una variación del 55% que depende del ligando de las AgNP. Se han realizado estudios de la desactivación de fluorescencia de RhB con AuNP@citrato de 22 nm de diámetro [49], donde se observó que RhB puede interaccionar fuertemente con las nanopartículas mediante la interacción con el ion citrato aniónico que recubre la superficie metálica, por medio de interacciones electrostáticas y de hidrógeno con el grupo amino protonado de RhB. De esta manera, en el caso de R6G, la interacción con los ligandos aniónicos de las MNP puede generarse por el resto NH⁺ que presenta esta sonda a pH cercanos a la neutralidad. La naturaleza del ligando influye directamente en la interacción de R6G con las MNP, favoreciendo la desactivación de la emisión de fluorescencia de R6G en el siguiente orden: gálico < SDDC.

Además, el tamaño de las nanopartículas también es un factor a tener en cuenta en la desactivación de la fluorescencia de las sondas. Debido a que las nanopartículas más pequeñas poseen mayor área superficial que las más grandes, se ha observado que son *quencher*s más eficientes [50]. Las AgNP@SDDC son más pequeñas (12 nm, SD = 3) en promedio que las AgNP@gálico (18 nm, SD = 4), lo que podría favorecer la mayor desactivación de la fluorescencia de R6G por parte de las AgNP@SDDC. En el caso de las AuNP, se observa mayor desactivación a mayor tamaño de nanopartícula. Esto podría explicarse en función de las distribuciones de tamaño de las AuNP@citrato. Como las AuNP²⁶@citrato poseen un FWHM de 226 nm, 54% mayor que el FWHM de AuNP²²@citrato; la población de AuNP²⁶@citrato es más polidispersa y la contribución de AuNP más pequeñas podría generar ese leve incremento en la K_{SV} para AuNP²⁶@citrato.

De esta manera, se observa que el tamaño, ligando y naturaleza de las MNP influye en la interacción de las mismas con R6G. La desactivación de la fluorescencia de la sonda se produce mediada por la interacción de R6G con los ligandos de superficie de las MNP mediante interacciones electrostáticas y de hidrógeno, que permitirían que R6G se encuentre a una distancia cercana a la superficie metálica. Luego, la transferencia de energía (FRET) y la

transferencia electrónica de superficie (SET) serían los mecanismos por medio de los cuales se generaría la desactivación de la fluorescencia.

De manera similar, se evaluó la interacción entre la sonda fluorescente RhB y MNP, con y sin control de pH. La concentración de RhB se mantuvo constante (0,55 μM) y se varió la concentración de AuNP²²@citrato y AgNP@gálico, empleando PBS cuando se realizó control de pH. En todos los casos, se observó mayor desactivación de la fluorescencia de RhB (figura 5.23) al incrementar la concentración de MNP.

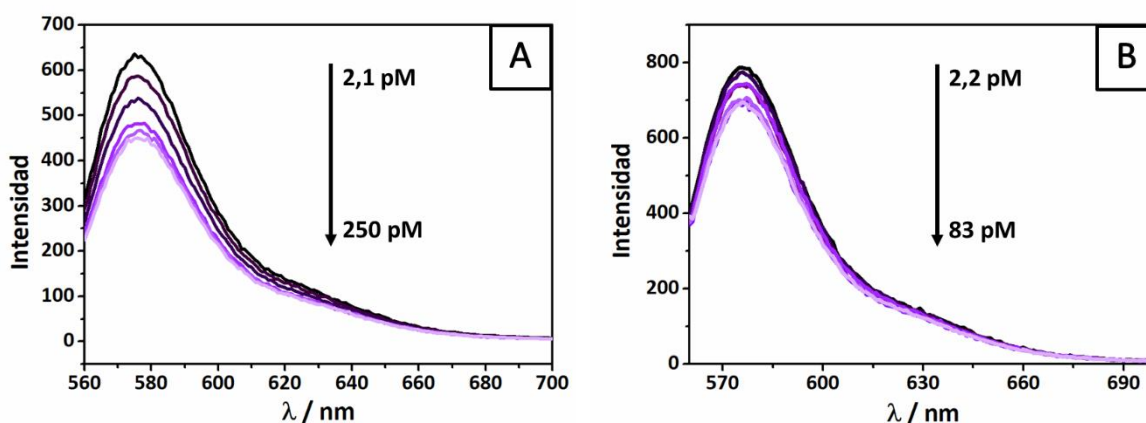


Figura 5.23. Efecto de la concentración de AuNP²²@citrato (A) y AgNP@gálico (B) en la emisión de fluorescencia de RhB en agua a 25,0 °C. El incremento en la concentración de las MNP (flecha) genera la desactivación de la fluorescencia de RhB en todas las condiciones estudiadas.

A partir de esto, se realizaron los gráficos de Stern-Volmer para ambos sistemas (figura 5.24). A partir de la pendiente de la curva de calibración correspondiente se determinó la constante de Stern Volmer (K_{SV}). Los valores obtenidos se presentan en la tabla 5.2.

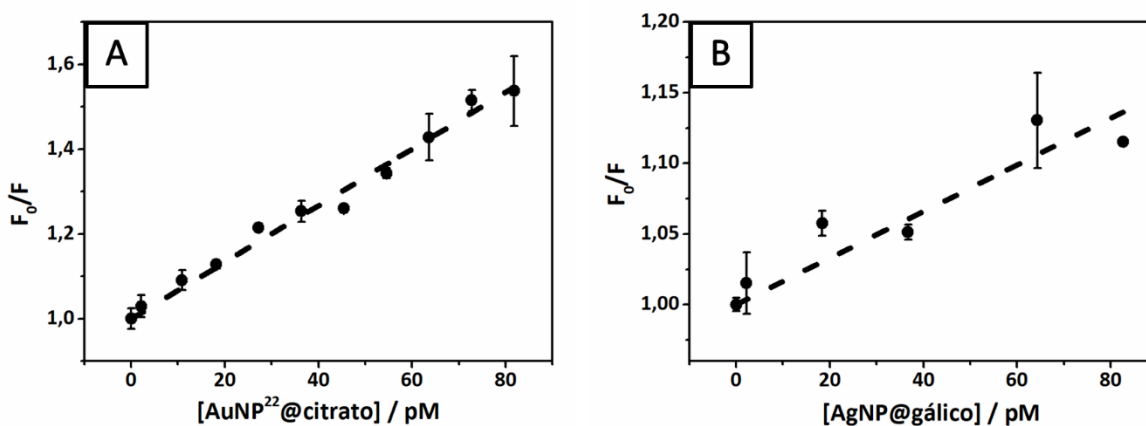


Figura 5.24. Curvas de Stern-Volmer de RhB en presencia de AuNP²²@citrato (A) y AgNP@SDDC (B) en agua a 25,0 °C.

Tabla 5.2 Constantes de Stern Volmer para RhB y MNP.

MNP	$K_{SV} (10^9 M^{-1})^*$	
	PBS	Agua
AuNP ²² @citrato	$5,3 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,1$
AgNP@gálico	$0,9 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$

*25,0 °C. Los errores en las constantes corresponden a los determinados por el software Origin™ al realizar la regresión lineal.

En este caso, nuevamente se observa que el control de pH influye en la interacción de RhB con las MNP evaluadas. A diferencia de la tendencia que se presenta con R6G, el control de pH resulta en menores constantes de Stern-Volmer en relación con las que fueron calculadas en agua. A su vez, se evidencia una mayor interacción de RhB con AuNP en relación a las AgNP; resultados comparables a los encontrados con R6G. Sin embargo, en función de los valores de K_{SV} calculados para R6G y RhB, se puede concluir que R6G es la sonda más sensible a la variación de la concentración de MNP y que las AuNP generan una mayor desactivación de las sondas fluorescentes empleadas en las condiciones estudiadas. De la misma manera, el control de pH, la naturaleza de la MNP, su tamaño y el ligando que estabiliza la MNP influyen en la interacción de las mismas con las sondas fluorescentes. A partir de estos hallazgos resultó promisorio desarrollar un método analítico que sea capaz de detectar y cuantificar MNP, con miras a ser aplicado en matrices reales.

5.6 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ Las AgNP@gálico interaccionan con Para Red sin seguir una tendencia clara con la concentración de las MNP.
- ✓ Las AgNP@SDDC no interaccionaron con Para Red en las condiciones experimentales analizadas.
- ✓ La presencia de las MNP seleccionadas produjo la desactivación de la fluorescencia de R6G y RhB, atribuida a la interacción de la sonda molecular con la superficie de la NP.
- ✓ La sensibilidad de R6G es mayor para todas las MNP examinadas, en comparación con RhB. A su vez, la sonda molecular es más sensible en buffer fosfato pH 6,94.

5.7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Klajn R., Stoddart J.F., Grzybowski B.A., *Nanoparticles functionalised with reversible molecular and supramolecular switches*, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 2203–2237.
 - [2] Jia S., Fong W.K., Graham B., Boyd B.J., *Photoswitchable Molecules in Long-Wavelength Light-Responsive Drug Delivery: From Molecular Design to Applications*, Chem. Mater. 30 (2018) 2873–2887.
 - [3] Chevalier A., Renard P.Y., Romieu A., *Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges*, Chem. - An Asian J. 12 (2017) 2008–2028.
 - [4] Shakya A.K., Nandakumar K.S., *An update on smart biocatalysts for industrial and biomedical applications*, J. R. Soc. Interface. 15 (2018) 20180062.
 - [5] Joseph J.M., Destailats H., Hung H.M., Hoffmann M.R., *The Sonochemical Degradation of Azobenzene and Related Azo Dyes: Rate Enhancements via Fenton's Reactions*, J. Phys. Chem. A. 104 (2000) 301–307.
 - [6] Albini A., Fasani E., *Photochemistry*, Royal Society of Chemistry, England, 2017.
 - [7] Tan E.M.M., Amirjalayer S., Smolarek S., Vdovin A., Zerbetto F., Buma W.J., *Fast photodynamics of azobenzene probed by scanning excited-state potential energy surfaces using slow spectroscopy*, Nat. Commun. 6 (2015) 5860.
 - [8] Chu Z., Han Y., Bian T., De S., Král P., Klajn R., *Supramolecular Control of Azobenzene Switching on Nanoparticles*, J. Am. Chem. Soc. 141 (2019) 1949–1960.
-

- [9] Zhang J., Whitesell J.K., Fox M.A., *Photoreactivity of self-assembled monolayers of azobenzene or stilbene derivatives capped on colloidal gold clusters*, Chem. Mater. 13 (2001) 2323–2331.
- [10] Rauf M.A., Hisaindee S., Saleh N., *Spectroscopic studies of keto-enol tautomeric equilibrium of azo dyes*, RSC Adv. 5 (2015) 18097–18110.
- [11] Adegoke O.A., *Relative predominance of azo and hydrazone tautomers of 4-carboxyl-2,6-dinitrophenylazohydroxynaphthalenes in binary solvent mixtures*, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 83 (2011) 504–510.
- [12] Satheskumar A., El-Mossalamy E.H., Manivannan R., Parthiban C., Al-Harbi L.M., Kosa S., Elango K.P., *Anion induced azo-hydrazone tautomerism for the selective colorimetric sensing of fluoride ion*, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 128 (2014) 798–805.
- [13] Adegoke O.A., Adesuji T.E., Thomas O.E., *Novel colorimetric sensors for cyanide based on azo-hydrazone tautomeric skeletons*, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 128 (2014) 147–152.
- [14] Reeves R.L., Kaiser R.S., *Selective Solvation of Hydrophobic Ions in Structured Solvents. Azo-Hydrazone Tautomerism of Azo Dyes in Aqueous Organic Solvents*, J. Org. Chem. 35 (1970) 3670–3675.
- [15] Brode W.R., Gould J.H., Wyman G.M., *The Relation between the Absorption Spectra and the Chemical Constitution of Dyes. XXV. Phototropism and cis-trans Isomerism in Aromatic Azo Compounds*, J. Am. Chem. Soc. 74 (1952) 4641–4646.
- [16] Ju C., Tang Y., Fan H., Chen J., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a specific monoclonal antibody as a new tool to detect Sudan dyes and Para red*, Anal. Chim. Acta. 621 (2008) 200–206.
- [17] Harvey D., *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw Hill Companies, Inc., USA, 2000.
- [18] Kim H., Lee S., Lee J., Tae J., *Rhodamine triazole-based fluorescent probe for the detection of Pt²⁺*, Org. Lett. 12 (2010) 5342–5345.
- [19] Peng H., Cheng Y., Dai C., King A.L., Predmore B.L., Lefer D.J., Wang B., *A fluorescent probe for fast and quantitative detection of hydrogen sulfide in blood*, Angew. Chemie - Int. Ed. 50 (2011) 9672–9675.
- [20] Sahana A., Banerjee A., Guha S., Lohar S., Chattopadhyay A., Mukhopadhyay S.K., Das D., *Highly selective organic fluorescent probe for azide ion: Formation of a “molecular*
-

- ring*," *Analyst*. 137 (2012) 1544–1546.
- [21] Doumani N., Bou-maroun E., Maalouly J., Tueni M., Dubois A., Bernhard C., Denat F., Cayot P., Sok N., *A new pH-dependent Macrocyclic Rhodamine B-based Fluorescent Probe for Copper Detection in White Wine*, *Sensors*. 19 (2019) 4514–4525.
- [22] Kobayashi H., Ogawa M., Alford R., Choyke P.L., Urano Y., *New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging*, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2620–2640.
- [23] Dickinson B.C., Chang C.J., *A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells (Journal of the American Chemical Society (2008) 130, (9638-9639))*, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 11561.
- [24] Demchenko A.P., *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2010.
- [25] Kaur R., Saini S., Kaur N., Singh N., Jang D.O., *Rhodamine-based fluorescent probe for sequential detection of Al³⁺ ions and adenosine monophosphate in water*, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 225 (2020) 117523.
- [26] Vuu K., Xie J., McDonald M.A., Bernardo M., Hunter F., Zhang Y., Li K., Bednarski M., Guccione S., *Gadolinium-rhodamine nanoparticles for cell labeling and tracking via magnetic resonance and optical imaging*, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 995–999.
- [27] Sivaraman G., Chellappa D., *Rhodamine based sensor for naked-eye detection and live cell imaging of Fluoride ions*, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 5768–5772.
- [28] Zhang L.F., Zhao J.L., Zeng X., Mu L., Jiang X.K., Deng M., Zhang J.X., Wei G., *Tuning with pH: The selectivity of a new rhodamine B derivative chemosensor for Fe³⁺ and Cu²⁺*, *Sensors Actuators, B Chem.* 160 (2011) 662–669.
- [29] Chang H.Y., Hsiung T.M., Huang Y.F., Huang C.C., *Using rhodamine 6G-modified gold nanoparticles to detect organic mercury species in highly saline solutions*, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1534–1539.
- [30] Rahman D.S., Deb S., Ghosh S.K., *Relativity of Electron and Energy Transfer Contributions in Nanoparticle-Induced Fluorescence Quenching*, *J. Phys. Chem. C.* 119 (2015) 27145–27155.
- [31] Ghosh S.K., Pal T., *Photophysical aspects of molecular probes near nanostructured gold surfaces*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 3831–3844.
- [32] Zhang H., Wang L., Jiang W., *Label free DNA detection based on gold nanoparticles*
-

- quenching fluorescence of Rhodamine B*, *Talanta*. 85 (2011) 725–729.
- [33] Núñez R.N., Veglia A.V., Pacioni N.L., *Improving reproducibility between batches of silver nanoparticles using an experimental design approach*, *Microchem. J.* 141 (2018) 110–117.
- [34] Lazurko C., Ahumada M., Valenzuela-Henríquez F., Alarcon E.I., *NANoPoLC algorithm for correcting nanoparticle concentration by sample polydispersity*, *Nanoscale*. 10 (2018) 3166–3170.
- [35] Leese R.A., Wehry E.L., *Corrections for Inner-Filter Effects in Fluorescence Quenching Measurements via Right-Angle and Front-Surface Illumination*, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1193–1197.
- [36] Falco W.F., Queiroz A.M., Fernandes J., Botero E.R., Falcão E.A., Guimarães F.E.G., M’Peko J.C., Oliveira S.L., Colbeck I., Caires A.R.L., *Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 299 (2014) 203–209.
- [37] Puchalski M.M., Morra M.J., von Wandruszka R., *Assessment of inner filter effect corrections in fluorimetry*, 340 (1991) 341–344.
- [38] Ferreira G.R., Garcia H.C., Couri M.R.C., Dos Santos H.F., de Oliveira L.F.C., *On the Azo/Hydrazo Equilibrium in Sudan I Azo Dye Derivatives*, *J. Phys. Chem. A*. 117 (2013) 642–649.
- [39] McCleverty J.A., Meyer T.J., *Comprehensive coordination chemistry II : from biology to nanotechnology*, Elsevier Science Inc., 2004.
- [40] Sanchez A.M., Rossi R.H., *Effect of Hydroxide Ion on the Cis-Trans Thermal Isomerization of Azobenzene Derivatives*, *J. Org. Chem.* 60 (1995) 2974–2976.
- [41] Stoyanov S., Antonov L., *Quantitative analysis of azo-quinonehydrazone tautomeric equilibrium*, *Dye. Pigment.* 10 (1989) 33–45.
- [42] Barnes A.J., Majid M.A., Stuckey M.A., Gregory P., Stead C. V., *The resonance Raman spectra of Orange II and Para Red: molecular structure and vibrational assignment*, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 41 (1985) 629–635.
- [43] Pacioni N.L., Veglia A. V., *Analytical strategy to detect metal nanoparticles in mixtures without previous separation*, *Sensors Actuators B Chem.* 228 (2016) 557–564.
- [44] Cookson J., *The preparation of palladium nanoparticles*, *Platin. Met. Rev.* 56 (2012) 83–98.
-

- [45] Ni W., Chen H., Su J., Sun Z., Wang J., Wu H., *Effects of dyes, gold nanocrystals, pH, and metal ions on plasmonic and molecular resonance coupling*, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 4806–4814.
- [46] Valcárcel M., López-Lorente Á.I., *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*, Elsevier, 2014.
- [47] Karthikeyan B., *Fluorescence quenching of rhodamine-6G in Au nanocomposite polymers*, J. Appl. Phys. 108 (2010) 1–6.
- [48] Yun C.S., Javier A., Jennings T., Fisher M., Hira S., Peterson S., Hopkins B., Reich N.O., Strouse G.F., *Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier*, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 3115–3119.
- [49] Stobiecka M., Hepel M., *Multimodal coupling of optical transitions and plasmonic oscillations in rhodamine B modified gold nanoparticles*, Phys. Chem. Chem. Phys. 13 (2011) 1131–1139.
- [50] Ghosh S.K., Pal A., Kundu S., Nath S., Pal T., *Fluorescence quenching of 1-methylaminopyrene near gold nanoparticles: Size regime dependence of the small metallic particles*, Chem. Phys. Lett. (2004).

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EMPLEANDO RODAMINAS

VI

6.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el rápido desarrollo de la nanotecnología ha permitido que las MNP sintéticas comenzaran a emplearse en un rango de aplicaciones muy amplio, como ser la cosmética, en productos farmacéuticos, óptica, electrónica, entre otros [1,2]. Las AgNP y AuNP se encuentran entre las MNP sintéticas más utilizadas en diversos productos [3,4]. Estas nanopartículas se producen y utilizan en grandes cantidades, lo que hace inevitable su liberación en ambientes acuáticos durante su producción, uso, manipulación, reciclado o eliminación [1]. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos mundiales para abordar y regular la producción y la manipulación segura de los nanomateriales mediante el desarrollo de guías y de una serie de recomendaciones; aún no existe una legislación completamente destinada a la regulación de nanomateriales [5].

En vista de esto, se hace fundamental el desarrollo de tecnologías confiables y robustas que sean capaces de identificar, caracterizar y cuantificar las MNP sintéticas en matrices complejas como las ambientales. En la actualidad, existen diversas metodologías capaces de lograrlo y las mismas fueron introducidas en el capítulo I de esta tesis doctoral. Sin embargo, está claro que es necesario mejorar los métodos analíticos y las estrategias para permitir las evaluaciones de riesgos e implementar regulaciones futuras [6]. De esta manera, en este

capítulo se desarrollará la validación del método analítico basado en la desactivación de la fluorescencia de R6G por MNP sintéticas, discutido en el capítulo V.

6.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

El objetivo de la validación analítica de un método es el de asegurar que cualquier medición realizada posteriormente, en un análisis de rutina, sea lo suficientemente cercana al valor real del contenido de analito en la muestra analizada [7]. De esta forma, se busca investigar si se logran los propósitos analíticos del método, lo que consiste en obtener resultados analíticos con un nivel de confianza aceptable [8].

En el caso de la validación de métodos para la detección y cuantificación de MNP, para los métodos de *screening* se recomienda la determinación del límite de detección (LOD), la precisión, la selectividad y la robustez. Cuando se trata de métodos confirmatorios, se deben adicionar ciertos parámetros como ser el límite de cuantificación (LOQ), rango lineal y recuperación [9]. En la siguiente sección se desarrollarán los aspectos más importantes en la determinación del límite de detección, límite de cuantificación y exactitud.

6.2.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

La IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) define al **límite de detección** (LOD) como la menor concentración de analito que puede ser detectada a un grado de confianza específico para un determinado procedimiento analítico [10].

En general, se utilizan dos parámetros para determinar la detectabilidad analítica:

- ✓ El límite de decisión crítico (LC), sobre el cual se puede afirmar que el analito está presente, pero sin la evidencia suficiente.
- ✓ El límite de detección (LOD), sobre el cual se afirma que el analito se encuentra presente en la muestra a un nivel de confianza determinado.

De este modo, la definición de LOD se basa en distinguir tres regiones de concentración: (i) menores al LC, (ii) aquellas que se encuentran entre LC y LOD, y (iii) mayores al LOD [11]. Análogamente, la definición de estos límites puede ser comparada a una situación cotidiana como aquella presentada en la figura 6.1. Inicialmente, se observa que no hay evidencia de ningún hecho (figura 6.1A); en el segundo caso se observa una imagen borrosa que podría evidenciar un evento, pero donde no es posible afirmar con certeza de qué evento se trata

(figura 6.1B). Finalmente, podemos afirmar cuál era ese evento debido a la nitidez de la última imagen (figura 6.1C) [11].

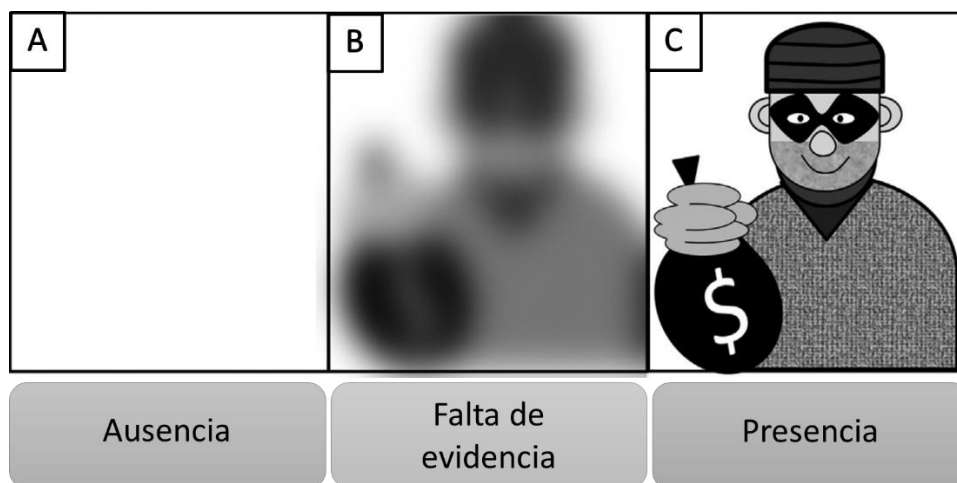


Figura 6.1. Analogía en la determinación del LC y LOD con un ejemplo cotidiano respecto a la ausencia de un evento determinado (A), la falta de evidencia del mismo (B) o la afirmación de que este evento se llevó a cabo (C).

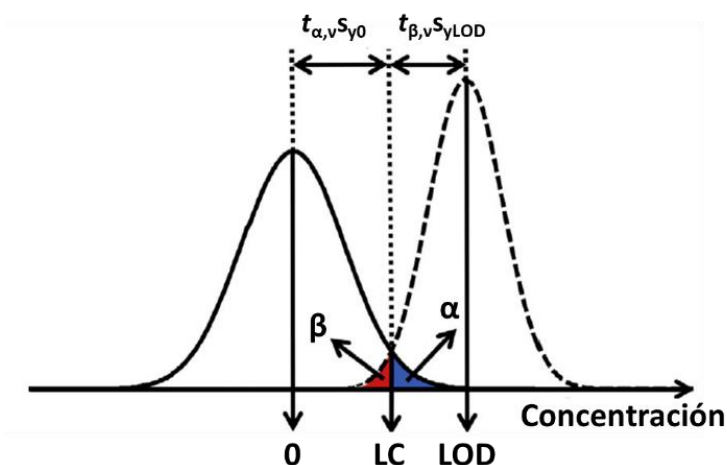


Figura 6.2. Representación gráfica de la prueba de significancia para la estimación del límite de detección. Las curvas Gaussianas representan las distribuciones de concentración a nivel del blanco y del LOD. Las áreas sombreadas azul y roja corresponden a las probabilidades de cometer errores Tipo I y II, respectivamente. Ref [11].

El LOD puede ser estimado a partir de un test estadístico de hipótesis (figura 6.2). La concentración al nivel crítico LC, a partir del cual se toman decisiones con respecto a la detección del analito, conduce a una mayor probabilidad de cometer errores Tipo I (detección de falsos positivos). De esta manera, se acepta erróneamente la hipótesis alternativa afirmando que el analito se encuentra presente en la muestra cuando en realidad está

ausente. La probabilidad de cometer errores Tipo I se visualiza en la región sombreada en azul (α) observada en la figura 6.2. La distancia entre LC y la concentración cero de analito es el producto de s_{y0} (error estándar de la concentración del blanco químico) y el coeficiente $t_{\alpha,v}$. Para $\alpha = 0,05$; una concentración mayor al LC tiene una probabilidad del 5% de ser un falso positivo. A su vez, también existe una probabilidad β de cometer un error Tipo II (falso negativo o analito no detectado), aceptando la hipótesis nula y afirmando que el analito está ausente cuando en realidad se encuentra en la muestra. Esta probabilidad se representa como la región sombreada roja (β) de la figura 6.2. Si $\beta = 0,05$; la probabilidad de obtener un resultado falso negativo es de 5%. La distancia entre LC y la concentración de analito para $\beta = 0,05$ es el producto del coeficiente $t_{\beta,v}$ y s_{y0} . En función de estas aproximaciones, la IUPAC recomienda obtener el LOD empleando la siguiente ecuación [11,12]:

$$\text{LOD} = 2t_{0,05;v}s_{y0} = \frac{2t_{0,05;v}s_x}{SEN} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

donde la desviación de la señal del blanco es reemplazada por la desviación estándar de los residuales de la regresión (s_x), h_0 corresponde a un parámetro de efecto palanca que se calcula empleando la ecuación 6.2, I representa el número de muestras de calibración y SEN corresponde a la pendiente de la regresión lineal (sensibilidad de calibración).

$$h_0 = \frac{\bar{c}_{\text{cal}}^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c}_{\text{cal}})^2} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

\bar{c}_{cal} = promedio de las concentraciones de calibración.

c_i = cada valor de concentración de calibración.

Si el número de grados de libertad (v) es grande, $2t_{0,05;v} \approx 3,3$; por lo que una aproximación al LOD es la siguiente [12]:

$$\text{LOD} = \frac{3,3s_x}{SEN} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Anteriormente, el LOD se determinaba sólo considerando errores Tipo I, donde la concentración se correspondía a una relación señal/ruido igual a 3. Esto implica establecer el

límite de detección en función de la ecuación 6.4; siendo s_{x0} la desviación estándar de la señal del blanco químico.

$$LOD = \frac{3s_{x0}}{SEN} \quad \text{Ecuación 6.4}$$

En esta estimación, la probabilidad de cometer errores Tipo I es de 0,1% en el caso de $t_{0,001,v} = 3$ (para valores de v grandes). Recientemente, la IUPAC no recomienda utilizar esta definición ya que no considera los errores Tipo II [13].

6.2.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración de analito donde el error predictivo relativo es hasta 10% como máximo. La relación que existe entre LOD y LOQ puede establecerse fácilmente: si la concentración de analito es 10 veces la incertidumbre de predicción, entonces esta última es 10% en relación con la concentración predicha [11]. De esta manera, la determinación del LOQ se calcula empleando la siguiente ecuación [12]:

$$LOQ = \frac{10s_x}{SEN} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad \text{Ecuación 6.5}$$

De manera similar al LOD, la definición anterior de LOQ expresada en la ecuación 6.6 ya no se recomienda por la IUPAC [13].

$$LOQ = \frac{10s_{x0}}{SEN} \quad \text{Ecuación 6.6}$$

6.2.3 EXACTITUD

La determinación de la exactitud de un método analítico es esencial en el proceso de validación. Para su estudio se emplean cuatro métodos basados en [14]:

- ✓ El uso de materiales de referencia certificados (CRM).
- ✓ La comparación del método propuesto con un método de referencia.
- ✓ La realización de ensayos de recuperación en matrices o muestras reales.
- ✓ Las pruebas inter-laboratorios (estudios en colaboración).

Los materiales de referencia certificados han sido producidos y caracterizados con altos estándares y son acompañados por certificados que declaran los valores de sus propiedades de interés (usualmente, concentraciones de analito) y la incerteza asociada a este valor. Si se dispone de CRM, debería ser la primera opción en la elección del método para estudiar la exactitud. Sin embargo, algunas desventajas de emplear este método son el elevado costo de materiales de referencia y la baja disponibilidad de CRM adecuados para el número de matrices y analitos posibles [15].

El desempeño de un nuevo método también puede evaluarse al ser comparado con los resultados obtenidos para un método de referencia de precisión y exactitud conocidas [16]. En el caso de las MNP, aunque se han desarrollado algunos métodos excelentes para su cuantificación y algunos CRM para ciertas matrices [17], aún se carecen de métodos de referencia y CRM adecuados para la gran variedad de MNP y ligandos sintetizados hasta el momento y de matrices ambientales apropiadas para su estudio [18].

El empleo de estudios inter-laboratorios aún no han sido reportados para MNP en matrices ambientales [18], pero en general tienen las desventajas de ser costosos y el proceso muy lento.

6.2.3.1 Ensayos de recuperación

Una alternativa a los materiales de referencia consiste en preparar una muestra de referencia al adicionar o enriquecer una matriz con una cantidad determinada del analito de interés [15]. A partir de esto, se calcula la recuperación como una medida de la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado a la matriz del blanco. La recuperación se determina agregando cantidades conocidas de analito al solvente, realizando la ya mencionada curva de calibración. Luego, se agregan cantidades conocidas de este analito a la matriz donde se aplicará el método desarrollado y se realizará una segunda curva. Si ambas curvas coinciden, se obtendrá una recuperación del 100% y las interferencias de la matriz se harán despreciables [19]. Sin embargo, la falta de superposición de las curvas puede deberse a un posible efecto matriz, que produce errores sistemáticos, por exceso o por defecto, y, en consecuencia, aumenta proporcionalmente con la concentración del analito, distinguiéndose del efecto producido por especies interferentes.

De acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC se distinguen dos términos para representar las recuperaciones:

- ✓ **Recuperación o factor de recuperación (R)**: indica la relación entre cantidad de analito establecida por el método propuesto (Q'_A) y la cantidad presente en la muestra, original o adicionada previo al procedimiento de extracción y/o preconcentración (Q_A), en una etapa de preconcentración o extracción dentro del método analítico (ecuación 6.7). De esta manera, el valor de la recuperación está relacionado al error sistemático global del procedimiento analítico [20].

$$R = \frac{Q'_A}{Q_A} \quad \text{Ecuación 6.7}$$

- ✓ **Recuperación Aparente (R')**: corresponde a la relación entre el valor observado (x'), derivado de un procedimiento analítico, por medio de la curva de calibración en función de un valor de referencia (x) (ecuación 6.8). Este valor de referencia corresponde a la cantidad de analito adicionada a la muestra previo al proceso de medición y, en consecuencia, el valor de la recuperación aparente se asocia al error sistemático atribuido a un efecto matriz [20].

$$R' = \frac{x'}{x} \quad \text{Ecuación 6.8}$$

A partir de los valores obtenidos de R o R' , se puede obtener un valor de recuperación promedio empleando la ecuación 6.9. Finalmente, es importante evaluar si la recuperación promedio es significativamente diferente de 100%. Para ello, se emplea una prueba de hipótesis donde la hipótesis nula, $H_0: \bar{R} = 100$ se acepta o rechaza empleando un *test t* de dos colas a un determinado nivel de confianza (α). El valor t se calcula a partir de la ecuación 6.10 [14,15], donde $s_{\bar{R}}$ corresponde a la desviación estándar para los n ensayos de recuperación a partir de los que se calcula la recuperación promedio \bar{R} .

$$\bar{R} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} R'_i \quad \text{Ecuación 6.9}$$

$$t = \frac{(\bar{R} - 100)\sqrt{n}}{s_{\bar{R}}} \quad \text{Ecuación 6.10}$$

Si el valor de t obtenido ($t_{n-1;\alpha}$) es menor que el valor tabulado para $n-1$ grados de libertad, entonces la hipótesis nula se acepta y el método es exacto [14].

6.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la desviación estándar de blancos químicos (s_{x0}) y los parámetros analíticos: límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).
- ✓ Evaluar la selectividad del método propuesto.
- ✓ Emplear el método espectrofluorimétrico en matrices reales de agua de río y agua de red domiciliaria y determinar la eficiencia y la exactitud de la cuantificación de MNP mediante ensayos de recuperación.

6.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.4.1 Soluciones de nanopartículas con agua de red y de río

Se prepararon soluciones de R6G 0,40 μM en buffer fosfato pH 6,94 0,01 M; a las que se les adicionó agua de red o agua de río sin un tratamiento previo a una concentración de 10% v/v. Posteriormente, las soluciones fueron fortificadas con AgNP@SDDC a dos niveles de concentración (30-165 pM), AgNP²²@citrato a cuatro niveles de concentración (26-54 pM) y AgNP²⁶@citrato a dos niveles de concentración (27-63 pM). Para finalizar, se registró la fluorescencia de R6G empleando los parámetros especificados en el capítulo V.

El agua de red se recolectó en un frasco estéril de plástico de una canilla en zona Norte, barrio Poeta Lugones, ciudad de Córdoba, luego de dejar circular agua por 10 minutos. El agua de río se recolectó en botellas de plástico de agua de río superficial, a contracorriente y al medio del cauce, en dos localizaciones diferentes (previo y posterior a las industrias químicas) de la ciudad de Río Tercero, Córdoba (figura 6.3). Las muestras se almacenaron en la heladera hasta su uso.

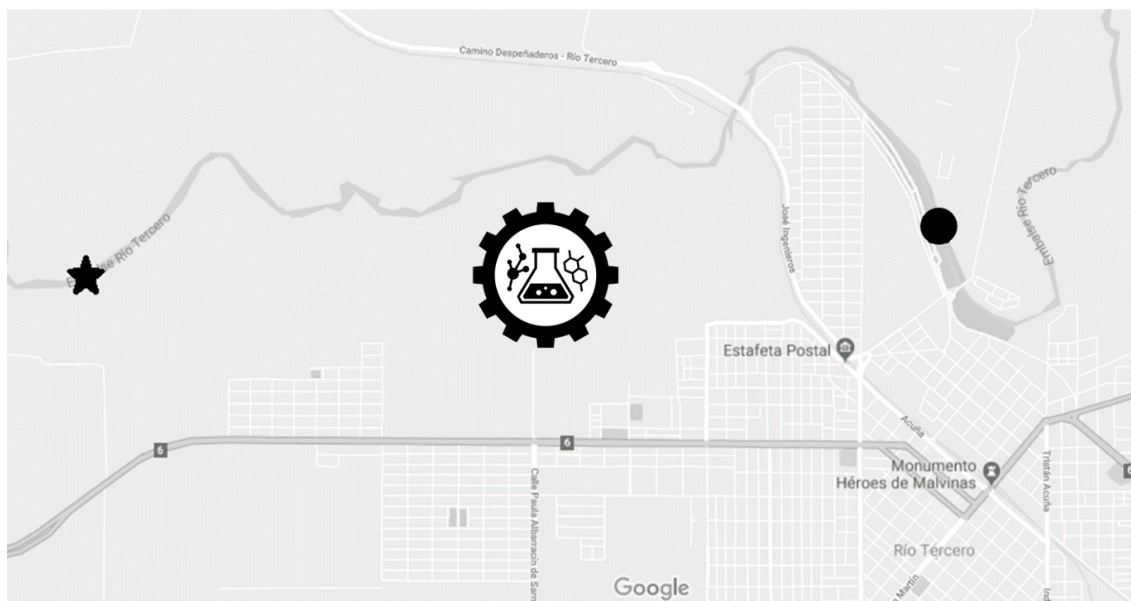


Figura 6.3. Ubicación geográfica de los sitios donde se recolectó el agua de río en su recorrido previo (★) y posterior (●) a su paso por industrias químicas.

6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el capítulo anterior, se analizó la respuesta de la absorbancia o fluorescencia de un azocompuesto (Para Red) y dos rodaminas, respectivamente, a la variación de la concentración de nanopartículas metálicas. En el caso de Para Red, no se observó una variación en la señal espectroscópica de la mezcla PR/MNP que permita el desarrollo de un método analítico en las condiciones examinadas. Sin embargo, se observó que la variación en la concentración de las MNP empleadas generaban la desactivación de la fluorescencia de R6G y RhB, respuesta que se relacionó empleando la ecuación de Stern-Volmer. A partir de esto, se determinaron algunos parámetros analíticos, como ser el rango dinámico, la sensibilidad, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), se evaluó la tolerancia máxima a interferentes para los sistemas estudiados y el porcentaje de recuperación en muestras reales de agua de red y agua de río.

6.5.1 LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN

Dado que el modelo que explica el fenómeno luminiscente observado es la función de Stern-Volmer, la relación lineal entre las variables [MNP] y fluorescencia relativa de rodaminas (F_0/F) permite que la función obtenida pueda ser empleada como la curva de calibración, dentro del rango dinámico del método. De esta manera, los parámetros estadísticos de la

función de calibración, la sensibilidad ($SEN = K_{sv}$) y la señal del blanco corresponden a la constante K_{sv} y a la señal analítica de las rodaminas en ausencia de MNP ($F_0/F = 1$), de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer (tabla 5.1 y 5.2). El valor del coeficiente de correlación de las regresiones lineales obtenidas (figura 5.14; figura 5.16) indica una fuerte asociación entre la fluorescencia de las rodaminas y la concentración de las MNP ($r > 0,99$).

En todos los casos, los valores de sensibilidad de calibración obtenidos resultaron del orden de 10^9 M^{-1} . De ambas sondas estudiadas, R6G fue la más sensible a la detección de las MNP analizadas a pH 6,94 en buffer fosfato. A su vez, tanto R6G como RhB resultaron más sensibles a AuNP@citrato que a AgNP. El control de pH del medio generó un incremento de la sensibilidad de R6G a MNP (17% para AuNP²²@citrato y 100% para AgNP@gálico); pero en el caso de RhB se observó disminución de la sensibilidad (26% para AuNP²²@citrato y 78% para AgNP@gálico) en la solución amortiguadora.

La validez del modelo lineal se analizó en función del test F , donde, en todos los casos, el valor de F_{calc} resultó mayor que $F_{n,d}$ crítico para los correspondientes grados de libertad de cada caso y para un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$). Esto nos permite afirmar que la relación entre la intensidad relativa de fluorescencia de las sondas analizadas y la concentración de MNP sigue una función lineal en el rango de concentraciones evaluado. Por otra parte, se realizó el análisis de los residuales de la regresión para evaluar su distribución normal y su aleatoriedad (figura 6.3 es representativa). Se concluyó que los residuos siguen una distribución normal y se consideran aleatorios en las condiciones estudiadas, comprobando la validez de los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

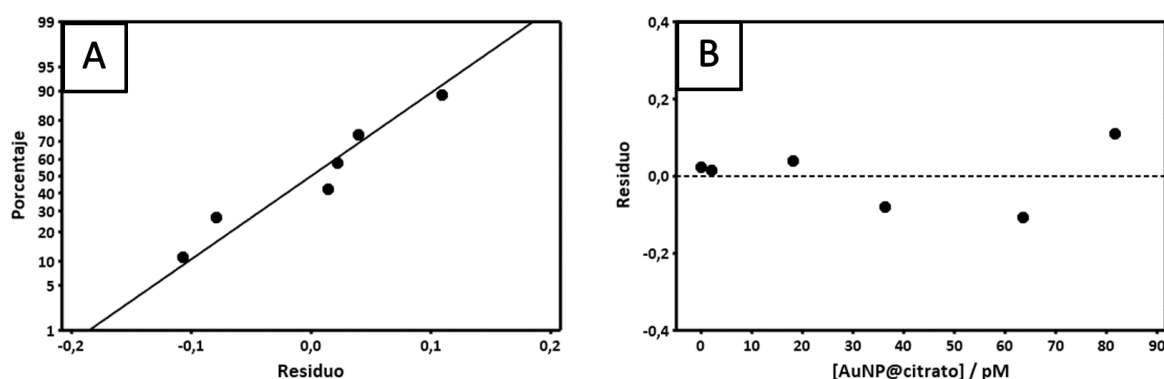


Figura 6.3. Gráficas de probabilidad normal de los residuos (A) y residuales en función de la concentración de AuNP²²@citrato (B).

6.5.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

Los parámetros LOD y LOQ se determinaron empleando las definiciones de la IUPAC desarrolladas en la sección 6.2.2 y 6.2.3 (ecuaciones 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6). Para ello, la desviación estándar del blanco químico (s_{x0}) se determinó a partir de la media de las áreas de fluorescencia relativas de 20 soluciones de R6G (0,40 μ M) y RhB (0,55 μ M) en ausencia de MNP y preparadas independientemente en agua MilliQ o en buffer fosfato a pH 6,94; según corresponda. En las tablas 6.2 y 6.3 se presentan los valores obtenidos para LOD y LOQ y en la tabla 6.4 se presentan las desviaciones de los blancos empleados en cada caso.

Tabla 6.2. Límite de detección para MNP en medio acuoso empleando como sensor R6G y RhB.

MNP	LOD (10^{-12} M)							
	R6G				RhB			
	PBS		Agua		PBS		Agua	
	A	B	A	B	A	B	A	B
AuNP ²² @citrato	4,1	4,5	7,5	8,0	20,5	23,0	14,8	15,8
AuNP ²⁶ @citrato	3,2	3,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AgNP@SDDC	6,6	7,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AgNP@gálico	14,5	15,6	47	53	121	129	62	71

A = determinado empleando la ecuación 6.4. B = determinado empleando la ecuación 6.3. *25,0 °C. n.d. = no determinado. En **negrita** se resaltan los mejores LOD.

Tabla 6.3. Límite de cuantificación de MNP en medio acuoso empleando como sensor R6G y RhB.

MNP	LOQ (10^{-12} M)							
	R6G				RhB			
	PBS		Agua		PBS		Agua	
	A	B	A	B	A	B	A	B
AuNP ²² @citrato	12,5	14,0	22,7	24,2	62,3	69,6	44,8	47,8
AuNP ²⁶ @citrato	9,8	10,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AgNP@SDDC	20	22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AgNP@gálico	44	47	142	162	367	384	188	215

A = determinado empleando la ecuación 6.6. B = determinado empleando la ecuación 6.5. *25,0 °C. n.d. = no determinado. En **negrita** se resaltan los mejores LOQ.

Tabla 6.4. Desviaciones del blanco para los sistemas analizados.

Sonda Fluorescente	S_{x0} *	
	PBS	Agua
R6G	0,01(1)	0,01(7)
RhB	0,03(3)	0,03(0)

*Entre paréntesis se especifica la siguiente cifra decimal.

En todos los casos se obtuvieron valores de LOD y LOQ del orden de los pM (10^{-12} M), lo que permite la detección y cuantificación de concentraciones muy pequeñas de MNP. De ambas sondas fluorescentes, R6G en buffer fosfato pH 6,94 resultó mejor sensor para la detección de AuNP y AgNP que RhB, al ser capaz de detectar menores concentraciones de estos analitos (LOD más bajos). A su vez, R6G resultó más eficaz en detectar menores concentraciones de AuNP que de AgNP, con LOD entre 50-78% más bajos. En el capítulo V se analizó cómo el ligando y el tamaño de las MNP influye en su interacción con las rodaminas. Se observó que para AgNP, R6G resultó un sensor más eficiente para MNP más pequeñas ($LOD_{AgNP@SDDC,12nm} < LOD_{AgNP@gálico,18nm}$) y que es capaz de detectar menores concentraciones de MNP cuando SDDC estabiliza las mismas.

Los LOD obtenidos en esta tesis se encuentran en el orden de los reportados en bibliografía para MNP similares [21,22]. En otros casos, el empleo de estrategias de preconcentración de

la muestra con MNP, acopladas a sistemas de cuantificación costosos (ICP-MS), permiten la obtención de LOD más bajos (orden de los fM) [23–26]. Sin embargo, la disminución en los límites de detección se alcanza con procedimientos que incluyen una gran cantidad de etapas que requieren periodos considerables [24,27,28], el empleo de otras MNP en la preconcentración [24] o la digestión de la muestra como proceso previo a la cuantificación [27,28]. También se han empleado otros nanomateriales (*carbon dots*) para la detección de MNP alcanzando LOD similares [29] o más altos [30,31] a los obtenidos con el sistema desarrollado en esta tesis doctoral.

De esta manera, el método analítico presentado en esta tesis para la detección y cuantificación de nanopartículas de oro y de plata presenta como principales ventajas su sensibilidad, simplicidad y rapidez. Además, es económico, emplea pequeñas cantidades de reactivos y no requiere de equipamiento muy costoso ni de personal altamente calificado para su realización, lo que permitiría su implementación en laboratorios de rutina.

6.5.3 SELECTIVIDAD

La selectividad del método propuesto se evaluó analizando la influencia de especies potencialmente presentes en muestras reales. Las determinaciones se realizaron adicionando las especies, que probablemente podrían actuar como interferentes, a soluciones que contenían la sonda fluorescente y las MNP. Es importante destacar que sólo se evaluó la selectividad de R6G a AuNP²²@citrato y AgNP@SDDC en buffer fosfato 0,01 M pH 6,9 debido a que estos sistemas presentaron mejores LOD en relación a los demás estudiados. Si bien el LOD de AuNP²⁶@citrato es ligeramente más bajo en comparación con las AuNP²²@citrato, estas últimas presentaron una distribución de tamaños más homogénea que las MNP de 26 nm ($FHWM_{AuNP22} < FHWM_{AuNP26}$).

En todos los casos se consideró que la especie adicionada producía una interferencia cuando la variación de la señal era superior a 10%. Para ello se prepararon soluciones de R6G (0,4 µM) y AuNP²²@citrato (36,4 pM) o AgNP@SDDC (57,2 pM), a las que se les adicionaron cantidades crecientes de los interferentes presentados en la tabla 6.5. El sistema R6G/AuNP²²@citrato presentó una excelente tolerancia a la adición de sales ($>10^{10}$) y una muy buena tolerancia a la presencia de Au³⁺ (10^5). Sin embargo, presentó una tolerancia más baja a la adición de AgNP@SDDC (0,26) debido a que la sonda fluorescente R6G también es muy sensible a la presencia de AgNP@SDDC. Con respecto al sistema R6G/AgNP@SDDC, se

observó una gran tolerancia a la presencia de sales ($>10^9$) y AgNO_3 (10^5); pero una baja tolerancia a $\text{AuNP}^{22}\text{@citrato}$ y AgNP@gálico (0,13 y 1,06, respectivamente) originada por la sensibilidad de R6G a estas MNP.

Tabla 6.5. Efecto de interferentes en el sistema R6G/MNP.

Interferente	Tolerancia (T) ^a	
	$\text{AuNP}^{22}\text{@citrato}^{\text{b,d}}$	$\text{AgNP@SDDC}^{\text{c,d}}$
AgNP@SDDC	0,26	-
Au^{3+}	$3,2 \times 10^5$	n.d. ^e
$\text{AuNP}^{22}\text{@citrato}$	-	0,13
AgNP@gálico	n.d. ^e	1,06
AgNO_3	n.d. ^e	$5,6 \times 10^5$
NaCl	$>1,8 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^9$
KCl	$8,2 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
KBr	$>1,8 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$

^a $T = [\text{Interferente}]/[\text{Analito}]$. ^b $[\text{AuNP}^{22}\text{@citrato}] = 36,4 \text{ pM}$. ^c $[\text{AgNP@SDDC}] = 57,2 \text{ pM}$. ^d $[\text{R6G}] = 0,4 \text{ }\mu\text{M}$, buffer fosfato pH 6,94 0,01 M (concentración analítica). ^e n.d. = no determinado. 25 °C.

6.5.4 APLICABILIDAD DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES

La eficiencia y exactitud del método propuesto para la detección y cuantificación de MNP fueron evaluadas mediante ensayos de recuperación del analito en matrices reales, como agua de red y agua de río.

Al emplear un método analítico para determinar la concentración de una especie en una matriz real, se pueden observar desviaciones negativas (recuperaciones muy bajas) o positivas (recuperaciones muy altas). Estas desviaciones son generalmente producto del efecto matriz, que corresponde a los efectos combinados de todos los componentes de la muestra diferentes al analito en la medición de una cantidad [32]. Para corregir o minimizar el efecto matriz, observado sobre las señales obtenidas, se emplea el método de adiciones estándar (*Method of Standar Additions* - MOSA). Este método, se basa en agregar distintas cantidades conocidas del analito a soluciones que contienen cantidades constantes de la matriz, las cuales se diluyen hasta un mismo volumen final.

Los ensayos de recuperación se realizaron preparando soluciones de R6G (0,40 μM) en buffer fosfato 0,01 M pH 6,94, enriquecidas con distintos niveles de concentración de MNP, por triplicado, dentro del intervalo lineal establecido previamente. A cada solución se le adicionó agua de red o agua de río recolectada antes y después de su paso por industrias químicas. La concentración de matriz evaluada fue de 10% v/v sin realizar un tratamiento previo de la matriz.

6.5.4.1 *Nanopartículas de oro funcionalizadas con citrato*

Los valores de recuperación aparente (R') se calcularon mediante el cociente entre la cantidad de analito determinada a partir de la señal analítica obtenida y la curva de calibración; y la cantidad adicionada conocida previo al proceso de medición. No se detectaron residuos de AuNP@citrato en la solución blanco. Los ensayos de recuperación se realizaron para AuNP²⁶@citrato no envejecidas (tabla 6.6) y todos los valores obtenidos se corrigieron por efecto matriz negativo.

Tabla 6.6. Recuperaciones de AuNP²⁶@citrato en agua de red domiciliaria y agua de río.

Analito	Matriz	Cantidad adicionada (pM)	Cantidad determinada (pM)	%R' (RSD) ^a
AuNP ²⁶ @citrato	Agua de red ^b	27	23	85(13)
		63	60	95 (2)
	Agua de río pre-industria ^c	27	21	78 (6)
		63	61	97 (3)
	Agua de río post-industria ^d	27	23	85 (6)
		63	63	100 (6)

^aObtenidas por triplicado. ^bSEN = (10,7 \pm 0,3) 10⁹ M⁻¹. ^cSEN = (10,9 \pm 0,5) 10⁹ M⁻¹. ^dSEN = (9,5 \pm 0,2) 10⁹ M⁻¹. RSD = desviación estándar relativa.

Los valores de recuperación aparente obtenidos para AuNP²⁶@citrato se encuentran entre 78-100%, similares que los obtenidos empleando otras metodologías [23,24,30,33]. Estos valores son aceptables para la determinación de AuNP@citrato sintéticas en muestras de agua de red domiciliaria y agua de río.

La determinación de la recuperación aparente para las AuNP²²@citrato se llevó a cabo al transcurrir aproximadamente un año desde su síntesis y se observó que el proceso de

envejecimiento de las MNP generó una ligera disminución de su tamaño medio ($d_0 = 22$ nm, $SD = 5 > d_{1año} = 21$ nm, $SD = 4$) (figura 6.4). Debido a esto, se recalculó la sensibilidad y se determinó la recuperación aparente en muestras reales para $AgNP^{22}@citrato$ envejecidas (tabla 6.7). Todos los valores obtenidos se corrigieron por efecto matriz negativo.

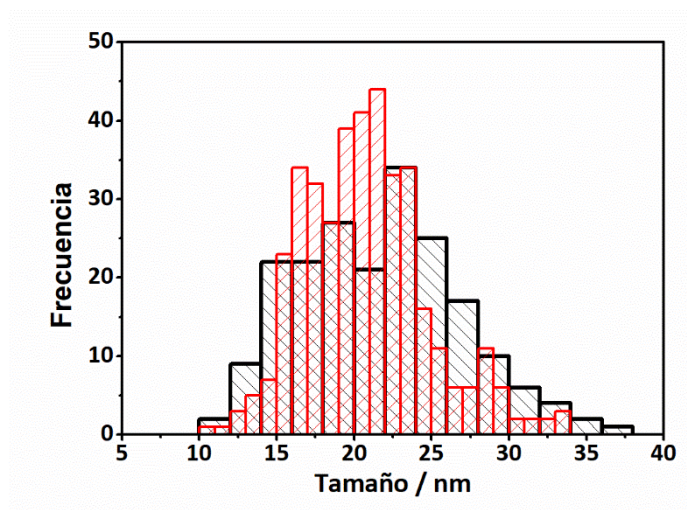


Figura 6.4. Distribución de tamaños de las $AuNP^{22}@citrato$ al ser sintetizadas (negro) y envejecidas por 1 año (rojo).

Tabla 6.7. Recuperaciones de $AuNP^{22}@citrato$ envejecidas en agua de río.

Analito	Matriz	Cantidad adicionada (pM)	Cantidad determinada (pM)	%R' (RSD) ^a
$AuNP^{22}@citrato$ envejecidas	pre-industria ^b	31	36	116 (20)
		44	37	84 (4)
		53	64	121 (8)
		66	61	92 (24)
	Agua de río post-industria ^c	31	31	100 (16)
		44	36	82 (12)
		53	55	104 (6)
		66	68	103 (7)

^aObtenidas por triplicado. ^bSEN = $(6,0 \pm 0,5) 10^9 M^{-1}$. ^cSEN = $(6,6 \pm 0,3) 10^9 M^{-1}$. RSD = desviación estándar relativa.

En este caso, se observó una disminución del valor de la pendiente de la curva de calibración en un 25-32%, obteniéndose valores de recuperación entre 84-121% considerados aceptables para la cuantificación de AuNP en muestras ambientales [24,29]. Los métodos

analíticos clásicos (DLS, TEM o ultracentrifugación) en general son insensibles a la ligera variación del tamaño de las MNP causada por envejecimiento [34]. Por ello, resulta importante destacar que este proceso influye en los parámetros analíticos determinados y debe ser considerado como un factor a ser evaluado en el desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de MNP sintéticas [34].

Con el objetivo de evaluar la exactitud del método para las determinaciones de AuNP@citrato en agua, se calcularon las recuperaciones promedio ($\% \bar{R}$). Posteriormente, se efectuó el *test t* de dos colas a un nivel de confianza del 90 y 95% para verificar que no existen diferencias significativas respecto a 100% para las recuperaciones promedio. Los resultados se informan en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Parámetros calculados para establecer la exactitud del método para el análisis de AuNP@citrato en agua de red y agua de río.

Analito (n) ^a	Matriz	$\% \bar{R}$	\bar{s}_R ^b	t_{exp}	$t_{n-1;\alpha=0,05}$	$t_{n-1;\alpha=0,10}$
AuNP ²² @citrato envejecidas (4)	Agua de río pre-industria	103	18	0,33	3,18	2,35
	Agua de río post-industria	97	10	0,60	3,18	2,35
AuNP ²⁶ @citrato (2)	Agua de red	90	6	2,36	12,7	6,31
	Agua de río pre-industria	88	13	1,30	12,7	6,31
	Agua de río post-industria	93	11	0,90	12,7	6,31

^aEntre paréntesis se especifica el número de ensayos de recuperación usados para el cálculo de la recuperación promedio. ^b \bar{s}_R es la desviación estándar relativa.

Dado que $t_{exp} < t_{n-1;\alpha}$ en todos los casos, se puede concluir que, en análisis de agua de red y agua de río, el método desarrollado que emplea R6G como sonda fluorescente es exacto para la cuantificación de AuNP²²@citrato envejecidas y AuNP²⁶@citrato a un nivel de confianza del 90 y 95%.

6.5.4.2 Nanopartículas de plata funcionalizadas con SDDC

Los valores de recuperación aparente se determinaron de la misma manera que para AuNP@citrato (tabla 6.8). No se detectaron residuos de AgNP@SDDC en la solución blanco.

En este caso, se observaron diferencias en la sensibilidad de R6G en función del lote de AgNP@SDDC empleado. De esta forma, la recuperación se calculó considerando la sensibilidad de R6G a cada lote de MNP.

Tabla 6.8. Recuperaciones de AgNP@SDDC en agua de red y agua de río.

Matriz real	Cantidad adicionada (pM)	Cantidad determinada (pM)	%R' (RSD)^a
Agua de red ^b	80	60	75 (12)
	162	144	89 (5)
Agua de río pre-industria ^c	37	33	89 (3)
	82	80	98 (24)
Agua de río post-industria ^b	80	59	74 (6)
	162	148	91 (4)

^aObtenidas por triplicado. ^bSEN = $(4,3 \pm 0,2) 10^9 \text{ M}^{-1}$. ^cSEN = $(5,5 \pm 0,5) 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Para la determinación de AgNP@SDDC se obtuvieron valores de recuperación entre 74-97% en agua de red y agua de río (10% v/v), similares a las determinadas para AgNP por otros métodos reportados en la bibliografía [28,35–37].

A modo de evaluar la exactitud del método para estas determinaciones se calcularon las recuperaciones promedio ($\% \bar{R}$). Posteriormente, se realizó el test t de dos colas, a 90 y 95% de confianza, para verificar que no existan diferencias significativas respecto a 100% para las recuperaciones promedio. Los resultados se presentan en la tabla 6.9.

Tabla 6.9. Parámetros calculados para establecer la exactitud del método para el análisis de AgNP@SDDC en agua de red y agua de río.

Matriz real ^a	% \bar{R}	\bar{s}_R ^b	t	$t_{n-1;\alpha=0,05}$	$t_{n-1;\alpha=0,10}$
Agua de red	82	10	2,55	12,7	6,31
Agua de río pre-industria	94	6	1,41	12,7	6,31
Agua de río post-industria	83	12	2,00	12,7	6,31

^aSe emplearon 2 valores de recuperación para el cálculo de la recuperación promedio en cada caso. ^b \bar{s}_R es la desviación estándar relativa.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el método desarrollado es exacto para la determinación de AgNP@SDDC en agua de red y agua de río ($t < t_{n-1;\alpha}$) a un 90 y 95% de confianza.

6.5 CONCLUSIONES PARCIALES

- ✓ R6G fue la sonda más sensible a la variación de la concentración de MNP en buffer fosfato CA = 0,01 M pH 6,94.
- ✓ El control de pH es un factor que influye en la sensibilidad de las sondas fluorescentes en la detección de MNP.
- ✓ Variaciones en el tamaño y en ligando sobre la superficie de las MNP generan variaciones en la sensibilidad de R6G.
- ✓ Los mejores LOD y LOQ se obtuvieron para AuNP y AgNP@SDDC.
- ✓ Los ensayos de recuperación en agua de red domiciliaria y agua de río pre- y post-industria fueron de buenos a muy buenos para todos los sistemas analizados.
- ✓ El método es exacto a un 90 y 95% de confianza para detectar y cuantificar AuNP@citrato y AgNP@SDDC en agua de red domiciliaria y agua de río.

6.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S., *Nanoparticles in the environment: where do we come from, where*

- do we go to?*, Environ. Sci. Eur. 30 (2018) 1–17.
- [2] Garcia M.A., *Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications*, J. Phys. D. Appl. Phys. 44 (2011) 283001.
- [3] *Nanotechnology - Project on Emerging Nanotechnologies*, (2005). <http://www.nanotechproject.org/> (accessed August 13, 2019).
- [4] Weinberg H., Galyean A., Leopold M., *Evaluating engineered nanoparticles in natural waters*, TrAC - Trends Anal. Chem. 30 (2011) 72–83.
- [5] Amenta V., Aschberger K., Arena M., Bouwmeester H., Botelho Moniz F., Brandhoff P., Gottardo S., Marvin H.J.P., Mech A., Quiros Pesudo L., Rauscher H., Schoonjans R., Vettori M.V., Weigel S., Peters R.J., *Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries*, Regul. Toxicol. Pharmacol. 73 (2015) 463–476.
- [6] Mattarozzi M., Suman M., Cascio C., Calestani D., Weigel S., Undas A., Peters R., *Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages*, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 63–80.
- [7] Gustavo González A., Ángeles Herrador M., *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*, TrAC - Trends Anal. Chem. 26 (2007) 227–238.
- [8] Taverniers I., Van Bockstaele E., De Loose M., *Analytical Method Validation and Quality Assurance*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2010.
- [9] López-Sanz S., Guzmán Bernardo F.J., Rodríguez Martín-Doimeadios R.C., Ríos Á., *Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges*, Anal. Chim. Acta. 1059 (2019) 1–15.
- [10] IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, IUPAC, Research Triangle Park, NC, 2009.
- [11] Allegrini F., Olivieri A.C., *Figures of Merit*, 2nd ed., Elsevier Inc., 2018.
- [12] Olivieri A.C., *Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial*, Anal. Chim. Acta. 868 (2015) 10–22.
- [13] Currie L.A., *Detection and quantification limits: Origins and historical overview*, Anal. Chim. Acta. 391 (1999) 127–134.
- [14] González A.G., Herrador M.A., Asuero A.G., *Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays*, Talanta. 48 (1999) 729–736.
- [15] Ellison S.L.R., Barwick V.J., Farrant T.J.D., *Practical statistics for the analytical scientist*.
-

- A bench guide*, The Royal Society of Chemistry, Inglaterra, 2009.
- [16] Mehta A.C., *Quality management in drug analysis*, *Analyst*. 122 (1997) 83–88.
- [17] Linsinger T.P.J., Roebben G., Solans C., Ramsch R., *Reference materials for measuring the size of nanoparticles*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 18–27.
- [18] Leopold K., Philippe A., Wörle K., Schaumann G.E., *Analytical strategies to the determination of metal-containing nanoparticles in environmental waters*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 107–120.
- [19] Meier P.C., Zünd R.E., *Statistical methods in analytical chemistry*, *Stat. Methods Anal. Chem.* (2005) 1–424.
- [20] Burns D.T., Danzer K., Townshend A., *Use of the terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in Analytical Procedures*, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 2201–2205.
- [21] Costa M.M. Da, La Escosura-Muñiz A. De, Merkoçi A., *Electrochemical quantification of gold nanoparticles based on their catalytic properties toward hydrogen formation: Application in magnetoimmunoassays*, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 1501–1504.
- [22] Pacioni N.L., Veglia A. V., *Analytical strategy to detect metal nanoparticles in mixtures without previous separation*, *Sensors Actuators B Chem.* 228 (2016) 557–564.
- [23] Allabashi R., Stach W., De La Escosura-Muñiz A., Liste-Calleja L., Merkoçi A., *ICP-MS: A powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving*, *J. Nanoparticle Res.* 11 (2009) 2003–2011.
- [24] Su S., Chen B., He M., Xiao Z., Hu B., *A novel strategy for sequential analysis of gold nanoparticles and gold ions in water samples by combining magnetic solid phase extraction with inductively coupled plasma mass spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 444–453.
- [25] Zhu S., Yang L., Long Y., Gao M., Huang T., Hang W., Yan X., *Size differentiation and absolute quantification of gold nanoparticles via single particle detection with a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer*, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12176–12178.
- [26] Laborda F., Bolea E., Cepriá G., Gómez M.T., Jiménez M.S., Pérez-Arantegui J., Castillo J.R., *Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples*, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016) 10–32.
- [27] Liu J.F., Chao J.B., Liu R., Tan Z.Q., Yin Y.G., Wu Y., Jiang G. Bin, *Cloud point extraction as*
-

- an advantageous preconcentration approach for analysis of trace silver nanoparticles in environmental waters*, Anal. Chem. 81 (2009) 6496–6502.
- [28] Tsogas G.Z., Giokas D.L., Vlessidis A.G., *Ultraprecise determination of silver, gold, and iron oxide nanoparticles by micelle mediated preconcentration/selective back-extraction coupled with flow injection chemiluminescence detection*, Anal. Chem. 86 (2014) 3484–3492.
- [29] Mandyla S.P., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Giokas D.L., *Determination of gold nanoparticles in environmental water samples by second-order optical scattering using dithiotreitol-functionalized CdS quantum dots after cloud point extraction*, J. Hazard. Mater. 323 (2017) 67–74.
- [30] Cayuela A., Soriano M.L., Carrión M.C., Valcárcel M., *Functionalized carbon dots as sensors for gold nanoparticles in spiked samples: Formation of nanohybrids*, Anal. Chim. Acta. 820 (2014) 133–138.
- [31] Kong L., Lu K., Ling X., Zhu P., Liu W., Guan H., Wang C., *Biocompatible Glutathione Capped Functionalized Carbon Dots as Nanosensors for the Detection of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution and Human Cells as well as Bacterial Cells*, ChemistrySelect. 1 (2016) 4092–4100.
- [32] Guilbault G.G., Hjelm M., *Nomenclature for automated and mechanised analysis*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 29 (1991) 577–585.
- [33] Yang Y., Long C.L., Li H.P., Wang Q., Yang Z.G., *Analysis of silver and gold nanoparticles in environmental water using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Sci. Total Environ. 563–564 (2016) 996–1007.
- [34] Kittler S., Greulich C., Diendorf J., Köller M., Epple M., *Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions*, Chem. Mater. 22 (2010) 4548–4554.
- [35] Bolea E., Jiménez-Lamana J., Laborda F., Castillo J.R., *Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry*, in: Anal. Bioanal. Chem., 2011: pp. 2723–2732.
- [36] Hartmann G., Hutterer C., Schuster M., *Ultra-trace determination of silver nanoparticles in water samples using cloud point extraction and ETAAS*, J. Anal. At. Spectrom. 28 (2013) 567–572.
-

- [37] Chao J.B., Liu J.F., Yu S.J., Feng Y. Di, Tan Z.Q., Liu R., Yin Y.G., *Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation*, Anal. Chem. 83 (2011) 6875–6882.

VII

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se abordó el estudio de estrategias analíticas para detectar y cuantificar nanopartículas metálicas de oro (AuNP) y plata (AgNP) empleando sondas fluorescentes de la familia de las rodaminas (Rodamina B y Rodamina 6G). A partir de los resultados y discusión detallados en los capítulos precedentes, las principales conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

- ✓ El surfactante gémico aniónico SDDC puede ser empleado como estabilizante en la síntesis de AgNP esféricas al interactuar con la superficie metálica mediante una unión monodentada vía el grupo carboxilato, conservando intacto el enlace disulfuro y con un alto grado de empaquetamiento.
- ✓ El surfactante SDDC, además, es un interesante agente estabilizante, capaz de modular la síntesis de nanoestructuras de plata de diferentes tamaños en soluciones de crecimiento adecuadas. Las nanopartículas obtenidas dependen de la naturaleza de las semillas y de los aniones agregados a la solución de crecimiento. Las semillas AgNP@SDDC favorecen exclusivamente la nucleación secundaria con formación de nuevas nanopartículas; mientras que con semillas de AgNP@citrate se induce el crecimiento en tamaño de las semillas adicionadas a la solución.
- ✓ Las AgNP@SDDC pueden emplearse como catalizadores en la reducción de 4-NPh por borohidruro de sodio. A tiempos cortos, la etapa limitante de la velocidad es la

formación de 4-hidroxilaminofenolato, mientras que a tiempos más largos la velocidad está gobernada por la conversión a aminofenolato. La actividad catalítica de las AgNP@SDDC es mayor sobre la primera etapa.

- ✓ El compuesto azo Para Red interacciona débilmente con AgNP; sin embargo, esta interacción no presenta una tendencia clara relativa a la concentración de las nanopartículas en las mezclas MNP/PR.
- ✓ Las AuNP y AgNP interaccionan con las sondas fluorescentes R6G y RhB produciendo el *quenching* o desactivación de la emisión de fluorescencia de estas sondas; proceso que depende de la concentración de las MNP, de su naturaleza, del tamaño y del ligando que la estabiliza. A su vez, R6G presentó mayor sensibilidad hacia las nanopartículas evaluadas en buffer fosfato pH 6,94.
- ✓ El método propuesto para la detección y cuantificación de AuNP y AgNP basado en el *quenching* de la emisión de fluorescencia de sondas fluorescentes proporciona buenos valores de recuperación y es adecuado para detectar MNP a bajos niveles de concentración (pM) en agua de red domiciliaria y agua de río.
- ✓ El método desarrollado es simple, rápido, económico, no requiere de equipamiento costoso ni de personal altamente calificado, no requiere preprocesamiento de la muestra y permite detectar AuNP y AgNP en el orden de los pM.

7.1 PERSPECTIVAS

El desarrollo de esta Tesis permitió explorar nuevas áreas de la química analítica de nanopartículas metálicas y, a partir del mismo, es posible considerar las siguientes estrategias a futuro:

- ✓ La reducción del grupo nitro de PR (amino-PR) plantea una buena estrategia para favorecer su interacción con MNP y evaluar si la presencia del grupo amino permite la isomerización de amino-PR. Las reducciones sintéticas más empleadas reportadas en bibliografía suelen reducir conjuntamente el grupo azo de PR o incluso romper este enlace. Sin embargo, se ha observado que empleando un catalizador basado en minerales de hierro (ferrihidrita), se produce la reducción selectiva del grupo nitro de algunos compuestos azo por hidracina, a 70 °C bajo atmósfera de nitrógeno [1]. Por lo tanto, una proyección de este trabajo de tesis podría ser examinar la reducción

planteada en la figura 7.1, como posible síntesis del derivado amino-PR. Debido a que las AgNP@SDDC poseen propiedades catalíticas, resulta interesante evaluar si las mismas pueden catalizar la formación de amino-PR y, de esta manera, ser base para proponer un método analítico basado en la cinética del proceso.

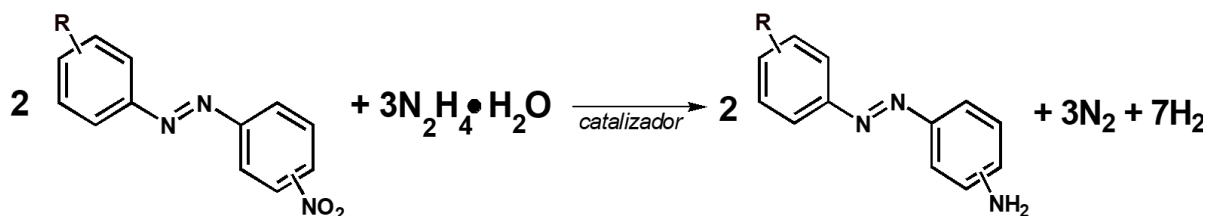


Figura 7.1. Reducción selectiva del grupo nitro de PR por hidracina en presencia de un catalizador metálico.

7.2 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lauwiner M., Roth R., and Rys P., *Reduction of aromatic nitrocompounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide hydroxide catalyst*, Appl. Catal. A Gen. 177 (1999) 9–14.

ANEXO

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A

Las diferencias en la polidispersidad entre diferentes lotes del mismo tipo de nanopartícula se originan tanto durante la síntesis o durante el agregado de un ligando de superficie. Es posible tener en cuenta la variabilidad de la polidispersidad si uno considera la distribución de tamaños de las nanopartículas. El algoritmo llamado NANOpoLC (Nanoparticle Polidispersity Corrector) [1] fue diseñado para ser usado directamente con datos de dispersión dinámica de luz (DLS) y también es compatible con mediciones de partículas individuales mediante microscopias electrónicas de transmisión y emisión (TEM/SEM). Cuando se usan datos derivados de SEM o TEM, un tamaño de muestra grande debe considerarse para llevar a cabo los cálculos, particularmente para muestras con una gran polidispersidad.

El modelo puede aplicarse a cualquier distribución de tamaño, independientemente del nanomaterial considerado. Se define la probabilidad de encontrar una MNP de diámetro d , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\int_{d^-}^{d^+} g(s) ds \approx g(d)h \quad \text{Ecuación A.1}$$

donde el valor de $g(d)h$ puede interpretarse como la relación del número de nanopartículas de diámetro d respecto del número total de nanopartículas en la muestra con una distribución de tamaños descrita por la función g . En la ecuación anterior, ($d^- \leq d \leq d^+$)

y $d = d^+ - d^-$ es un valor infinitesimalmente pequeño. El término $g(d)h$ está directamente relacionado con la dispersión de tamaños de la muestra. Se puede demostrar que la concentración total de cualquier sistema de MNP dado satisface la ecuación A.2,

$$[MNP] \int F(s)g(s)ds = [S] \quad \text{Ecuación A.2}$$

donde $[S]$ denota la concentración inicial del precursor de la nanopartícula y $F(d)$ es el número total de átomos para un precursor de nanopartículas de diámetro d . Para proveer una buena aproximación a la integral anterior, se puede utilizar la suma de Riemann (ecuación A.3).

$$[S] = [MNP] \sum F(d_i)g(d_i)h_i \quad \text{Ecuación A.3}$$

Como $h_i = d_{i+1} - d_i$, la suma en la ecuación A.3 se calcula para cada $i = 1, \dots, n - 1$. Por lo tanto, los datos recolectados, es decir, $g(d_i)$, no fueron considerados totalmente en la integral total. Entonces, se utiliza la “regla del trapecoide” para convertir la ecuación anterior en la siguiente:

$$[S] = [MNP] \sum [F(d_i)g(d_i) + F(d_{i+1})g(d_{i+1})] \frac{h_i}{2} \quad \text{Ecuación A.4}$$

donde la suma en la ecuación se realiza para cada $i = 1, \dots, n$; y $[NP]$ se determina utilizando la ecuación A.5, que es el algoritmo denominado NANoPoLC.

$$[MNP] = \frac{2[S]}{\sum [F(d_i)g(d_i) + F(d_{i+1})g(d_{i+1})]h_i} \quad \text{Ecuación A.5}$$

En este caso, se considera una geometría esférica para la población, que puede ser integrada en la función que cuenta los átomos $F(d)$ sólo conociendo el diámetro “ d ”. Así, la función $F(d_i)$ es un aspecto fundamental que determina el volumen de la nanopartícula, abriendo la posibilidad de extender el uso de esta ecuación a formas más allá de las esferas (ecuación A.6):

$$F(d_i) = \frac{V_{NP}(d_i)}{V_{átomo}} \quad \text{Ecuación A.6}$$

$V_{NP}(d_i)$ corresponde al volumen de la MNP, y $V_{átomo}$ al volumen de un átomo único.

A.1 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lazurko C., Ahumada M., Valenzuela-Henríquez F., Alarcon E.I., *NANoPoLC algorithm for correcting nanoparticle concentration by sample polydispersity*, *Nanoscale*. 10 (2018) 3166–3170.

CONCEPTOS BÁSICOS DE FLUORESCENCIA

B.1 NATURALEZA DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA

Cuando una molécula absorbe un fotón de luz, pasa a un estado excitado de mayor energía. Al retornar a su estado basal, el exceso de energía debe ser liberado. Existen varias vías por medio de las cuales puede hacerlo. Una de ellas consiste en la liberación de energía por medio de calor, proceso al que se denomina **desactivación vibracional** o **relajación no radiativa**. Por otra parte, la relajación también puede estar mediada por una **reacción fotoquímica**, donde la molécula puede generar un producto determinado por descomposición o por reacción con otras especies [1].

Por último, si la relajación se produce por la liberación de un fotón de radiación electromagnética, el proceso se denomina **fotoluminiscencia**. La fotoluminiscencia puede dividirse en dos categorías: la fluorescencia y la fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado involucrado. Para visualizar estos procesos es conveniente analizar el diagrama de Perrin-Jablonski presentado en la figura B.1. Los estados electrónicos se denotan como S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 , S_2 . Los estados tripletes como T_1 , T_2 , etc. Los niveles vibracionales se encuentran asociados a cada nivel electrónico [1,2].

La **fluorescencia** tiene lugar cuando una molécula en un nivel de energía vibracional cero de un estado electrónico excitado retorna al estado electrónico fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), sin cambios en la multiplicidad de spin, por la emisión de un fotón. Una expresión cuantitativa de

la eficiencia de la fluorescencia es el **rendimiento cuántico**, ϕ_f , que corresponde a la fracción de moléculas excitadas que regresan a su estado fundamental por emisión de fluorescencia. Los valores que puede adoptar el rendimiento cuántico rondan desde 1, que implica que todas las moléculas en un estado excitado emiten luz por fluorescencia, a 0, donde la fluorescencia no ocurre [1].

Dado que las moléculas que se relajan hacia el estado basal por un mecanismo muy rápido, la fluorescencia se observa sólo cuando es un mecanismo de relajación más eficiente que la combinación de otras desactivaciones, por ejemplo, por conversión interna. La **conversión interna** se entiende como la transición no radiativa entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de spin. Ocurre desde el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado a un nivel vibracional alto de un estado electrónico de menor energía [1].

Por otra parte, el **entrecruzamiento entre sistemas** puede llevarse a cabo cuando, la molécula que se encuentra en el estado vibracional de menor energía de un estado electrónico excitado, pasa a un estado vibracional alto de un estado electrónico excitado de menor energía que posee diferente estado de espín ($S_1 \rightarrow T_1$). A partir de esto, se puede llevar a cabo la **fosforescencia**, que se observa cuando la relajación ocurre con la emisión de un fotón de un estado electrónico triplete al estado basal ($T_1 \rightarrow S_0$) [1].

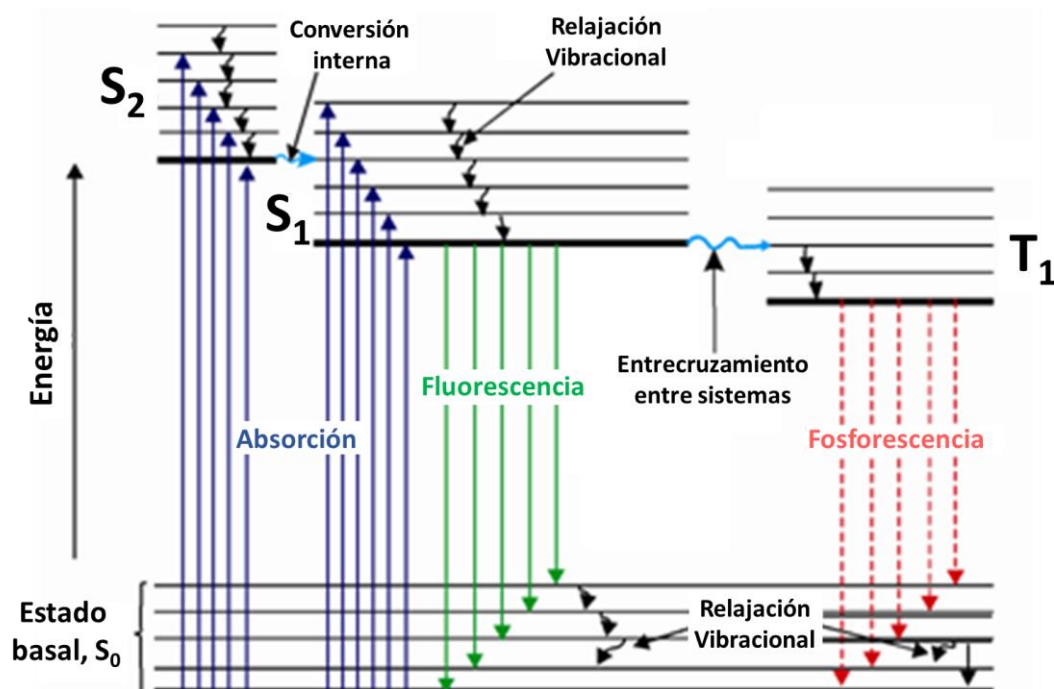


Figura B.1. Diagrama de Perrin-Jablonski.

B.2 QUENCHING DE FLUORESCENCIA

La desactivación de la fluorescencia, o **quenching** de emisión de fluorescencia, se define como cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de la sonda fluorescente [2]. Este proceso suele involucrar otra especie, el *quencher* Q , cuya presencia provoca la atenuación de la intensidad de emisión fluorescente de un fluoróforo F en el estado excitado (F^*) de manera competitiva con los procesos naturales de desactivación radiativos y no radiativos (procesos 1 y 2 en figura B.2) [3]. Los tipos de *quenching* que involucran a Q pueden ser descriptos como **estático** o **dinámico**, según el mecanismo de acción de Q , aunque existen casos complejos en los que operan ambos simultáneamente. En el primer caso, la preformación de un complejo no fluorescente $F\sim Q$ en el estado energético basal, gobernado por la constante de *quenching*, K_A . (proceso 3, figura B.2) conlleva a una disminución de la fracción de F libre. En el segundo caso, F^* es desactivado por la colisión bimolecular con Q (proceso 4, figura B.3).

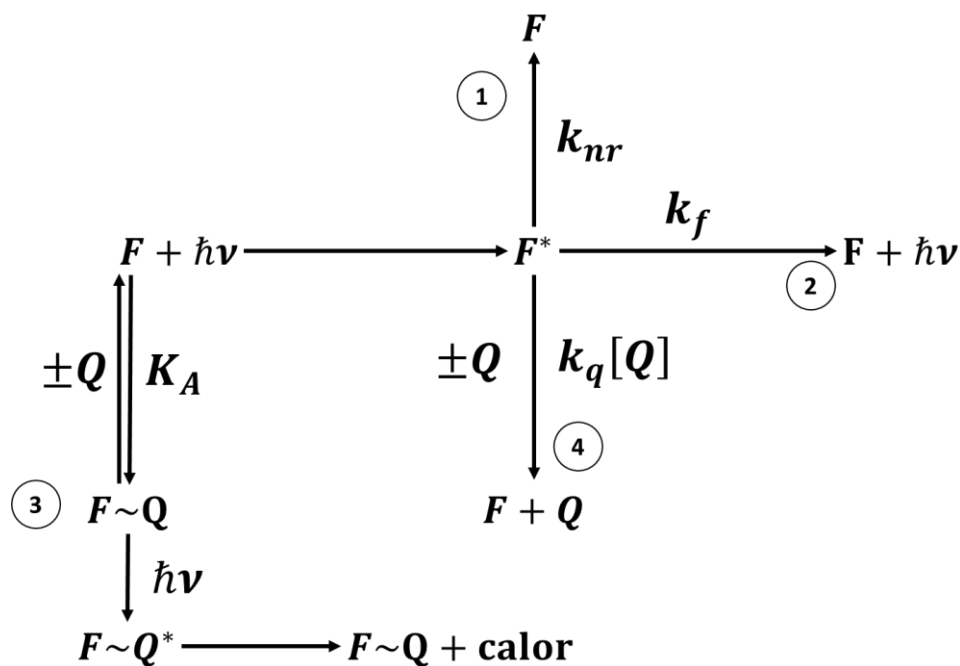


Figura B.2. Representación esquemática de los posibles mecanismos de desactivación de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo F . Mecanismos de desactivación intrínsecos de F^* : **1**, desactivación no radiativa gobernada por la constante de velocidad k_{nr} ; **2**, emisión de fluorescencia dependiente de la constante de velocidad k_f . Mecanismos de *quenching* de la fluorescencia de F^* : **3**, formación de $F\sim Q$ no fluorescente en el estado basal entre F y un *quencher* Q (*quenching* estático); **4**, desactivación de F^* por colisión bimolecular con Q dependiente de la constante de velocidad de *quenching* k_q y $[Q]$ (*quenching* dinámico). $\hbar\nu$ se refiere a la absorción de luz de frecuencia ν . \hbar , constante de Planck. K_A , constante de asociación.

En el caso del *quenching* estático, la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de *quencher* puede ser derivada de la constante de asociación de la formación del complejo. Esta constante está dada por la ecuación B.1 [2].

$$K_A = \frac{[F - Q]}{[F][Q]} \quad \text{Ecuación B.1}$$

donde $[F - Q]$ es la concentración del complejo, $[F]$ es la concentración del fluoróforo no complejoado y $[Q]$ es la concentración del *quencher*. Si el complejo no es fluorescente, entonces la fracción de fluorescencia restante (F/F_0) está dada por la fracción de fluoróforo que no está complejoado: $f = F/F_0$. Si la concentración total de fluoróforo esta dada por la ecuación B.2 [2];

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad \text{Ecuación B.2}$$

al sustituir esta ecuación en la ecuación B.1, se obtiene:

$$K_A = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad \text{Ecuación B.3}$$

Al sustituir las concentraciones de fluoróforo por las intensidades de fluorescencia, la ecuación B.3 puede reescribirse de la siguiente manera:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A[Q] \quad \text{Ecuación B.4}$$

Esta ecuación se conoce como **ecuación de Stern-Volmer** [2].

La derivación formal de la ecuación de Stern-Volmer surge de las consideraciones de las velocidades de todos los procesos de desactivación de un fluoróforo en el estado excitado (k_{nr} , k_f y k_q , Figura B.2). En este sentido, la variable que engloba las constantes de velocidad de los procesos de desactivación es el tiempo de vida de F^* , τ . Los experimentos de determinación de los tiempos de vida de un fluoróforo en el estado excitado (técnica denominada espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo) en ausencia (τ_0) y en presencia (τ) de Q permiten discernir inequívocamente el tipo de *quenching* involucrado. En general, si $\tau = \tau_0$, la presencia de Q no afecta a F^* ; de manera que la asociación ocurre con F en el estado basal (*quenching* estático). Por el contrario, si $\tau < \tau_0$, la aceleración en la

desactivación de F^* se atribuye a la colisión bimolecular con Q (*quenching* dinámico). A partir de un gráfico de τ_0/τ en función de $[Q]$ es posible determinar de manera directa la constante de velocidad de *quenching* colisional, k_q [2]. Una característica del *quenching* colisional es que la disminución en la intensidad de fluorescencia es proporcional al tiempo de vida, por lo que la relación τ_0/τ puede expresarse por la siguiente ecuación:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Ecuación B.5}$$

La dependencia de F_0/F en función de $[Q]$ es lineal; relación que se observa para *quenching* estático y dinámico. De esta manera, ambas ecuaciones pueden representarse por:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Ecuación B.6}$$

donde K_{SV} es la **constante de Stern-Volmer** [2]. Por lo tanto, si el *quenching* es estático se cumple que $K_{SV} = K_A$ y las ecuaciones B.4 y B.6 son equivalentes; pero si es dinámico, $K_{SV} = k_q \tau_0$. Si ambos mecanismos ocurren simultáneamente, se obtienen desviaciones de la linealidad [2].

B.3 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Harvey D., *Modern Analytical Chemistry*, The McGraw Hill Companies, Inc., USA, 2000.
- [2] Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, New York, 2006.
- [3] Fraiji L.K., Hayes D.M., and Werner T.C., *Static and dynamic fluorescence quenching experiments for the physical chemistry laboratory*, J. Chem. Educ. 69 (1992) 424–428.

CONCEPTOS BÁSICOS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

C

C.1 PARÁMETROS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico requiere la determinación de una serie de parámetros entre los que se incluyen:

- ✓ **Linealidad:** consiste en determinar el intervalo de concentraciones del analito donde la respuesta es lineal. Entre ambos extremos del mismo se define el **rango dinámico**, que corresponde al intervalo de concentraciones del analito, definido entre la menor concentración cuantificable y la concentración, en la cual se pierde la relación entre la respuesta medida y la concentración del sustrato (figura C.1). En general, para el trabajo cuantitativo, se aconseja el empleo de la zona central denominada **rango lineal**, donde la respuesta es proporcional a la concentración de manera lineal.
- ✓ **Sensibilidad:** cambio en la respuesta del instrumento empleado inducido por un cambio en la concentración del analito. La sensibilidad es la pendiente de la recta de regresión para un gráfico de la señal medida en función de la concentración [1].
- ✓ **Selectividad:** se define como el grado en que un método puede cuantificar el analito en presencia de interferentes bajo las condiciones establecidas para el método desarrollado [2].

- ✓ **Exactitud:** corresponde al grado de sesgo entre el valor verdadero y el determinado por la aplicación del método analítico [3].
- ✓ **Precisión:** brinda información sobre la cercanía entre los valores obtenidos para observaciones repetidas [4].
- ✓ **Límite de Detección (LOD):** Se define como la menor concentración de analito que puede ser detectada y es significativamente diferente de la señal del blanco o del ruido de fondo [2,4].
- ✓ **Límite de Cuantificación (LOQ):** se define como la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada a un nivel de confianza aceptable [4].

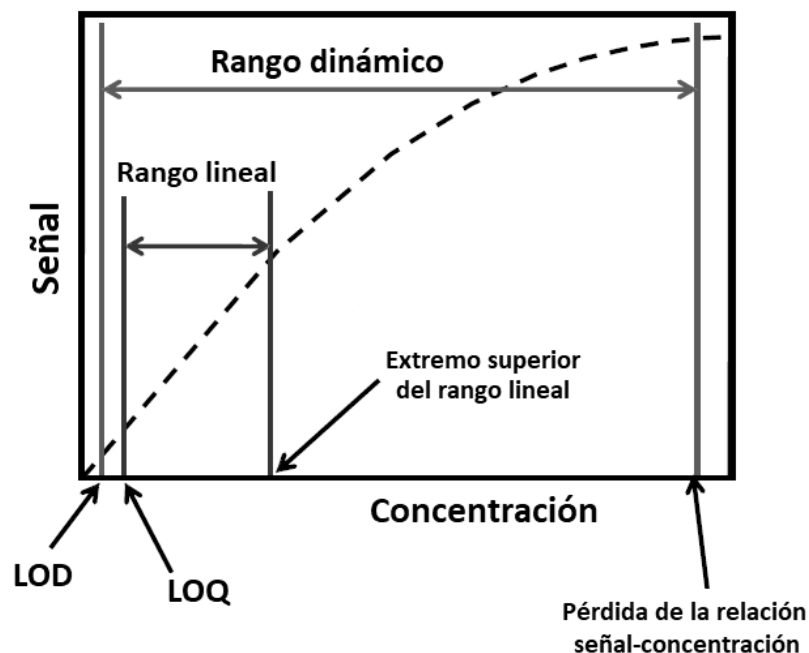


Figura C.1. Representación del rango dinámico, rango lineal, LOD y LOQ en una curva de calibración.

C.1.1 Calibración y linealidad

La calibración de un método analítico corresponde a establecer una correlación entre la señal analítica o la respuesta observada (y) y la concentración o cantidad del analito presente en la muestra (x) (ecuación C.1).

$$y = F(x) + e_y \quad \text{Ecuación C.1}$$

$F(x)$ representa la función de calibración y e_y corresponde al error o diferencia entre el resultado observado y el predicho por el modelo. Si se supone que e_y sigue una distribución

normal para cada valor de x , con varianza igual a cero; $F(x)$ está dada por la ecuación C.2, obteniéndose una línea recta si la relación entre x e y es lineal. Por consiguiente, el modelo expresado en la ecuación C.3 se denomina **regresión lineal** [5,6].

$$F(x) = \mathbf{B} + \mathbf{S} = \mathbf{B} + \mathbf{A}x \quad \text{Ecuación C.2}$$

$$y_i = \mathbf{B} + \mathbf{A}x_i + e_{yi} \quad \text{Ecuación C.3}$$

En las ecuaciones C.2 y C.3; \mathbf{B} es la señal del blanco, \mathbf{S} representa la señal neta y \mathbf{A} la sensibilidad. De esta manera, los valores estimados (\hat{y}) pueden ser calculados a partir de la ecuación C.4, donde $\hat{\mathbf{A}}$ y $\hat{\mathbf{B}}$ corresponden a los valores estimados para la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente. Luego, los residuales (e_{yi}) se determinan a partir de la ecuación C.5.

$$\hat{y}_i = \hat{\mathbf{B}} + \hat{\mathbf{A}}x_i \quad \text{Ecuación C.4}$$

$$e_{yi} = y_i - \hat{y}_i = y_i - (\hat{\mathbf{B}} + \hat{\mathbf{A}}x_i) \quad \text{Ecuación C.5}$$

Al analizar el modelo lineal, es importante comprobar si este modelo es el adecuado para el sistema donde fue aplicado para asegurar su validez estadística y práctica. Una manera de evaluar esto consiste en realizar una prueba de diagnóstico gráfica y observar el comportamiento de los residuales e_y en función de la concentración de analito x . Las desviaciones aleatorias de los residuales alrededor del cero indican que el modelo es el adecuado (figura C.2A). Por el contrario, cuando se observan que los residuales presentan desviaciones sistemáticas o si estos siguen una tendencia definida con el aumento de la variable x (figura C.2B), indica que el modelo lineal es inadecuado o que el supuesto de homocedasticidad no se cumple (figura C.2C) [6]. Se entiende por **homocedasticidad** cuando los residuales son constantes, es decir, todos los puntos de la curva de calibración tienen igual ponderación cuando se estiman la pendiente y la ordenada al origen de la recta. En algunos casos, los residuales pueden aumentar en función de la concentración del analito (figura C.2C), por lo que se considera a los datos como **heterocedásticos** [7].

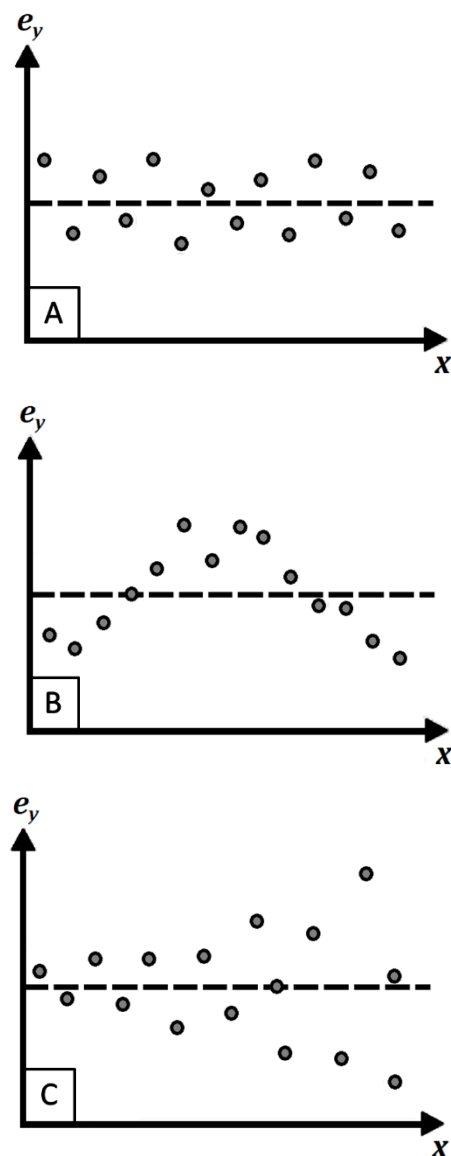


Figura C.2. Residuales en función de la concentración de analito. Se observan desviaciones aleatorias (A), sistemáticas que indican la no linealidad de los datos (B) y distribuciones que señalan heteroscedasticidad (C).

Otra manera de evaluar la validez estadística del modelo de regresión lineal utilizado es empleando un test de hipótesis. Si bien existen diferentes maneras de realizar estos test, el mejor procedimiento es el denominado “*test F*”. Esta prueba estadística se basa en los principios del análisis de varianza (ANOVA) para evaluar una hipótesis nula. La mayoría de los programas informáticos que realizan este tipo de test consideran que, si existe una relación lineal entre la señal y la concentración del analito, la pendiente de la regresión **A** debe ser diferente de cero, obteniéndose las hipótesis planteadas en la ecuación C.6 [8].

$$H_0: \mathbf{A} = 0$$

Ecuación C.6

$$H_a: \mathbf{A} \neq 0$$

La hipótesis nula (H_0) se rechazará a un nivel de confianza α si F_{calc} excede su valor crítico a un nivel α , $F_{crítico}$. En otras palabras, la calibración lineal es estadísticamente significativa a un nivel α . En lugar de usar un valor crítico, usualmente se calcula la probabilidad de que F_{calc} sea mayor a $F_{crítico}$, llamado p -valor. En este caso, la hipótesis nula se rechaza (el modelo es significativo) a un nivel de confianza α si el p -valor es menor que α [8].

C.2 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Booksh K.S., and Kowalski B.R., *Theory of Analytical Chemistry*, Anal. Chem. 66 (1994) 782–791.
- [2] Gustavo González A., and Ángeles Herrador M., *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*, TrAC - Trends Anal. Chem. 26 (2007) 227–238.
- [3] Green J.M., *Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation*, Anal. Chem. 68 (1996) 305A-309A.
- [4] Ellison S.L.R., Barwick V.J., and Farrant T.J.D., *Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide*, The Royal Society of Chemistry, Inglaterra, 2009.
- [5] Danzer K., and Currie L.A., *Guideline for calibration in analytical chemistry— Part 1. Fundamentals and single component calibration*, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 993–1014.
- [6] Danzer K., *Theoretical and Metrological Fundamentals*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [7] Miller J.N., and Miller J.C., *Statistics and Chemistry for Analytical Chemometrics*, Pearson, Inglaterra, 2010.
- [8] Ortiz M.C., Sánchez M.S., and Sarabia L.A., *Quality of Analytical Measurements: Univariate Regression*, in: Compr. Chemom., Elsevier, 2009: pp. 127–169.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

“Role of a cystine-based Gemini surfactant ligand in the synthesis of catalytic active silver nanoparticles”

M. Andrea Molina Torres, Érica M. Pachón Gómez, Mariana A. Fernández, Alicia V. Veglia y Natalia L. Pacioni.

Journal of Molecular Liquids 284 (2019) 110–116.

“Synthesis and Characterization of Nanomaterials for Biomedical Application”

Natalia L. Pacioni, **M. Andrea Molina Torres**, Rodrigo. N. Nuñez

En *Nanoengineering Materials for Biomedical Uses*. Emilio Alarcón, Manuel Ahumada Eds., Capítulo 2, pp 13-34. ISBN: 978-3-030-31261-9 (versión electrónica disponible 3 noviembre 2019); 978-3-030-31260-2 (versión impresa); Springer Nature Switzerland AG, Suiza.

“Sensing silver and gold nanoparticles based on the fluorescence quenching of Rhodamines”

M. Andrea Molina Torres, Alicia V. Veglia y Natalia L. Pacioni

En redacción.