

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Diferenciación y detección de nanomateriales sintéticos por métodos ópticos empleando sensores (supra)moleculares

Lic. en Química Rodrigo Nicolás Núñez

Directora de Tesis: Dra. Natalia Lorena Pacioni

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Orgánica

Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba

Córdoba, Argentina

-2022-

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

I N F I Q C



**Departamento de
QUÍMICA ORGÁNICA**

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Instituto de Investigaciones de Fisicoquímica de Córdoba y en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. Natalia L. Pacioni, y se presenta en consideración ante la siguiente comisión evaluadora para optar al grado de DOCTOR en Ciencias Químicas.

Dr. Eduardo A. Coronado
Prof. Asociado, Departamento de Fisicoquímica, FCQ, UNC.

Dra. Nancy Ferreyra
Prof. Adjunta, Departamento de Fisicoquímica, FCQ, UNC.

Dra. Alicia V. Veglia
Prof. Titular, Departamento de Química Orgánica, FCQ, UNC.

Evaluador externo: Dr. Alejandro C. Olivieri
Prof. Titular, Departamento de Química Analítica, FBIOyF, UNR.

A la memoria de mi madre

Susana María Núñez

30 de enero de 1959 – 25 de febrero de 2021

Agradecimientos

No creo que existan los logros individuales. Haber llegado a este punto es resultado de la interacción con diferentes personas, algunas cercanas y otras no, durante todos estos años. Cada una de ellas, desde su lugar y en la medida de sus posibilidades, contribuyó para que pueda llegar hasta el final.

Quiero agradecer profundamente a las instituciones que me brindaron durante más de 10 años educación y financiamiento. La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba fue, sin lugar a dudas, un segundo hogar para mí. Allí no solo me eduqué en el aspecto químico y científico, sino también en el humano y en el cívico. Y eso es probablemente lo más valorable de mi paso por sus pasillos y aulas. Por otro lado, nada de esto hubiese sido posible sin la beca doctoral que me ofreció CONICET y sin el lugar que me brindó el INFIQC en sus laboratorios. A todas aquellas personas que construyen estas instituciones a diario, muchas gracias por la confianza depositada en mí y por todo lo brindado.

Desde mis primeros años en la facultad, el laboratorio de química orgánica analítica del DQO me recibió con los brazos abiertos. Por todo el apoyo y cariño recibido durante más de 9 años, también agradezco a todos desde lo más profundo de mi corazón. De cada persona que ha compartido momentos a mi lado, me llevo alguna enseñanza que me hizo mejor científico y mejor persona. Particularmente quiero agradecer a Nati por estar a mi lado durante todos estos años, contribuyendo a mi formación y siempre haciéndome ver el lado positivo de las cosas, y a Alicia, por todo el apoyo brindado y por el orgullo mostrado con cada logro alcanzado. Y a todos mis compañeros, desde aquellos que conocí durante los primeros años, hasta los que estuvieron en estos últimos meses: Guada, Mati, Santi, Vale, Euge, Guille, Hugo, Andre, Johannes, Ariel, Noe, David, Pedro, Hector y Duham. Gracias por hacer los días tan amenos y divertidos, y por siempre dar lugar a las discusiones filosóficas que tanto me interesan.

Agradezco también a aquellos que te sostienen cuando pensás que ya no quedan más fuerzas, a mis amigas y amigos de siempre. A las chicas: Tini, Dai y Luciana, son una clara demostración que la amistad perdura más allá del tiempo y de la distancia, y a pesar de no vernos tan seguido, sigo sintiéndolas siempre tan cerca. Las quiero enormemente. A los chicos: Andrés, Nacho, Colorado, Marco, Leo, Fabri y Michael. Han sido una fuente de

Agradecimientos

diversión interminable durante todos estos años. Agradezco por cada juntada, por cada salida. Siempre pensé que ambos grupos se complementan perfectamente, y por eso espero que nuestra amistad se mantenga por todos los años que la vida nos permita.

A mis amigos y compañeros de La 15 de Junio: gracias a ustedes, que me enseñaron que la construcción de una mejor universidad es colectiva. Gracias por cada enseñanza y por cada momento compartido. Gracias por defender un modelo de universidad pública, para todos. Con una ciencia al servicio del pueblo y con una docencia comprometida con el bien social.

Agradezco a mi familia y, particularmente, a mis hermanos. Rocío y Roger, estos últimos años no han sido fáciles para ninguno de nosotros. Hay cosas que cambiaron para siempre, pero acá seguimos, unidos y fuertes. Todo va a estar bien.

Y a la persona más importante de mi vida le agradezco absolutamente por todo. Todo esto es por vos, mamá. Ojala estas palabras trasciendan lo físico y de algún modo te alcancen. Ojala te sientas orgullosa de mi, y me des un abrazo. Te extraño mucho, y te recuerdo con el amor más puro que pueda existir. Gracias por haber hecho de mí quien soy hoy.

Y finalmente, a todos aquellos que lleguen a este manuscrito y se embarquen en su lectura, gracias por el interés. Espero que puedan aprender algo de ello y lo disfruten.

Rodrigo Núñez

Índice de contenidos

PREFACIO	XVII
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Marco teórico	1
1.2. Nanomateriales	8
1.2.1. Reseña histórica.....	9
1.2.2. Clasificación de los nanomateriales.....	11
1.2.2.1. De acuerdo a su composición química.....	11
1.2.2.2. De acuerdo a la dimensionalidad del nanomaterial.....	13
1.2.3. Síntesis de nanopartículas de oro y plata	14
1.2.3.1. Reducción química de cationes metálicos.....	15
<i>Reducción por anión citrato</i>	16
<i>Reducción por borohidruro de sodio</i>	18
<i>Reducción por ácido gálico</i>	19
1.2.3.2. Síntesis fotoquímica de NP.....	20
1.2.3.3. Síntesis de NP anisotrópicas.....	22
1.2.4. Propiedades ópticas de los nanomateriales	24
1.3. Caracterización de nanopartículas metálicas	28
1.3.1. Técnicas microscópicas.....	29
1.3.2. Técnicas espectroscópicas.....	30
1.3.3. Técnicas de dispersión.....	32
1.3.3.1. Dispersión dinámica de luz.....	32
1.3.3.2. Potencial zeta (ζ).....	33
1.4. Observaciones finales	34
1.5. Referencias	34

Índice de contenidos

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.1. Problemática.....	55
2.2. Hipótesis.....	57
2.3. Objetivos del trabajo de tesis.....	58
2.3.1. Objetivo general.....	58
2.3.2. Objetivos específicos.....	58
2.4. Referencias.....	59
CAPÍTULO 3: SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ASISTIDA POR DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
3.1. Introducción.....	63
3.1.1. DOE: Diseño factorial fraccional, diseño Box-Behnken y optimización mediante función deseabilidad.....	65
<i>Diseño Factorial Fraccional (FrFD)</i>	68
<i>Diseño Box-Behnken (BBD)</i>	71
<i>Optimización: Función deseabilidad</i>	74
3.2. Objetivos específicos.....	77
3.3. Materiales y métodos.....	77
3.3.1. Reactivos.....	77
3.3.2. Instrumentación y software.....	77
3.3.3. Diseño experimental para la síntesis de AgNPg.....	78
3.3.3.1. Optimización de la síntesis de AgNPg.....	83
3.3.4. Optimización del protocolo post-síntesis.....	83
3.4. Resultados y discusión.....	84
3.4.1. Optimización multivariada para la síntesis de AgNPg.....	84
3.4.1.1. Condiciones óptimas en la síntesis de AgNPg.....	91

3.4.2. Optimización de la centrifugación post-síntesis.....	93
3.4.3. Performance del método de síntesis optimizado.....	95
3.5. Conclusiones.....	99
3.6. Referencias.....	99
CAPÍTULO 4: SÍNTESIS DE NANOVARILLAS DE PLATA EN AUSENCIA DE SURFACTANTES Y SEMILLAS. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN.....	105
4.1. Introducción.....	105
4.2. Objetivos específicos.....	107
4.3. Materiales y métodos.....	107
4.3.1. Reactivos.....	107
4.3.2. Instrumentación y software.....	108
4.3.3. Síntesis de nanovarillas de plata.....	108
4.3.4. Cuantificación de Ag ⁺ sin reaccionar.....	109
4.3.5. Caracterización de las nanopartículas.....	109
4.3.6. Modelo para el cálculo de la concentración de AgNR.....	110
4.4. Resultados y discusión.....	114
4.4.1. Síntesis y caracterización de AgNR.....	114
4.4.2. Modelo para el cálculo de la concentración de nanopartículas multiforma.....	123
4.5. Conclusiones.....	128
4.6. Referencias.....	128
CAPÍTULO 5: MÉTODO UNIVARIADO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE NANOMATERIALES DE ORO Y PLATA.....	133

Índice de contenidos

5.1. Introducción.....	133
5.1.1. Sondas moleculares fluorescentes y nanopartículas metálicas.....	134
5.1.2. Sondas moleculares fluorescentes y química analítica supramolecular.....	135
5.1.3. Validación de métodos analíticos.....	138
5.1.3.1. Recuperación.....	139
5.2. Objetivos específicos.....	140
5.3. Materiales y métodos.....	141
5.3.1. Reactivos.....	141
5.3.2. Instrumentación y software.....	141
5.3.3. Caracterización espectroscópica de CZL e Hp β CD.....	142
5.3.3.1. Espectroscopia UV-visible.....	142
5.3.3.2. Espectroscopia de fluorescencia.....	143
5.3.4. Síntesis de las nanopartículas de plata y oro empleadas.....	143
<u>Nanopartículas de plata/gálico (AgNPg)</u>	143
<u>Nanopartículas de plata/citrato (AgNPc)</u>	144
<u>Nanovarillas de plata/citrato (AgNR)</u>	144
<u>Nanopartículas de oro/gálico (AuNPg)</u>	144
<u>Nanopartículas de oro/citrato (AuNPc)</u>	144
<u>Nanopartículas de oro/I-2959 (AuNP_{heba})</u>	145
5.3.5. Interacción NP-sondas fluorescentes.....	146
5.3.6. Determinación de parámetros analíticos.....	147
5.4. Resultados y discusión.....	149
5.4.1. Caracterización espectroscópica de CZL e HP β CD.....	149
5.4.2. Determinación de la constante de asociación del complejo CZL@HP β CD.....	154

5.4.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas.....	158
5.4.4. Interacción NP-sondas fluorescentes.....	161
5.4.5. Determinación de parámetros analíticos de métodos propuestos.....	168
5.4.5.1. Linealidad y sensibilidad de calibración.....	168
5.4.5.2. Límites de detección y cuantificación.....	170
5.4.5.3. Exactitud y repetibilidad.....	173
5.4.5.4. Precisión intermedia.....	175
5.4.5.5. Selectividad.....	176
5.4.5.6. Ensayos de recuperación.....	178
5.5. Conclusiones.....	183
5.6. Referencias.....	183

CAPÍTULO 6: MÉTODO MULTIVARIADO PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE NANOMATERIALES DE ORO Y PLATA 191

6.1. Introducción.....	191
6.1.1. Teoría de U-PLS/RBL.....	193
6.1.1.1. Sensibilidad y otras figuras de mérito en U-PLS/RBL.....	195
6.2. Objetivos específicos.....	197
6.3. Materiales y métodos.....	197
6.3.1. Reactivos.....	197
6.3.2. Instrumentación y software.....	197
6.3.3. Síntesis de las nanopartículas de plata y de oro empleadas.....	198
6.3.4. Caracterización espectroscópica de CZL-S y R6G.....	198
6.3.5. Diseño y preparación del conjunto de muestras de calibración y de validación.....	200

Índice de contenidos

6.3.6. Datos de segundo orden y calibración multivariada.....	202
6.4. Resultados y discusión.....	203
6.4.1. Caracterización espectroscópica de CZL-SH y R6G.....	203
6.4.2. Datos de segundo orden: matrices de excitación-emisión y matrices de quenching.....	206
6.4.3. Calibración multivariada.....	210
6.4.3.1. Determinación del número de variables latentes y algoritmo RBL.....	210
6.4.3.2. Análisis cuantitativo y cifras de mérito del método propuesto.....	212
<i>Exactitud y precisión intra-ensayo</i>	216
<i>Recuperación</i>	218
6.5. Conclusiones.....	219
6.6. Referencias.....	219
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	225
ANEXOS.....	229
A) ANOVA EN DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	229
A.1. Introducción.....	229
A.2. Análisis de experimentos de un único factor.....	230
A.2.1. Ajuste de los modelos ANOVA.....	230
A.2.2. Test de hipótesis en experimentos de un factor.....	232
A.2.3. Análisis de los residuales.....	234
A.3. Análisis de experimentos con múltiples factores.....	234

A.3.1. Test de hipótesis en diseños factoriales generales.....	235
A.3.2. Cálculo de los coeficientes de los efectos.....	238
A.3.3. Análisis de los residuales.....	238
A.4. Tablas ANOVA del diseño BBD del capítulo 3.....	238
A.4.1. A_{\max}	239
A.4.2. λ_{\max}	241
A.4.3. FWHM.....	243
A.5. Referencias.....	244
B) ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	245
B.1. Referencias.....	247
C) CONCEPTOS BÁSICOS DE FLUORESCENCIA.....	249
C.1. Naturaleza del fenómeno de fluorescencia.....	249
C.2. <i>Quenching</i> de fluorescencia.....	251
C.3. Referencias.....	253
D) CONCEPTOS BÁSICOS DE CALIBRACIÓN UNIVARIADA.....	255
D.1. Parámetros analíticos.....	255
D.1.1. Calibración y linealidad.....	257
D.1.2. Límite de detección y límite de cuantificación.....	259
D.1.3. Precisión.....	262
D.1.4. Exactitud.....	263
D.1.5. Selectividad e interferencia.....	264
D.2. Referencias.....	264

Prefacio

La necesidad de generar estrategias analíticas sensibles, simples y económicas para la determinación de nanopartículas metálicas sintéticas (NP), principalmente de oro y de plata, motivó el desarrollo de esta tesis. Inicialmente, la tesis se centra en resolver algunos problemas característicos del trabajo con nanomateriales sintéticos, como la baja reproducibilidad lote a lote o la falta de algoritmos adecuados para la estimación de la concentración de sistemas complejos, como aquellos que presentan morfologías no esféricas o mezclas de morfologías. Posteriormente, nos enfocamos en el estudio de las interacciones que se establecen entre las nanopartículas metálicas y algunos sensores moleculares. 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. El conocimiento adquirido en ese sentido nos permitió expandir la estrategia hacia el desarrollo de metodologías multivariadas de segundo orden, para la detección y cuantificación simultánea de este tipo de analitos en muestras de agua de río y de red domiciliaria.

En el Capítulo 1 se introducen los conceptos más importantes necesarios para una mejor comprensión de los resultados. En primer lugar, se presenta la problemática de los nanomateriales como contaminantes emergentes como consecuencia de su extendido uso, se describe la particularidad de las nanopartículas metálicas como analitos y se mencionan algunos de los principales métodos para su detección y cuantificación actualmente disponibles. Luego se describe la naturaleza, propiedades de las nanopartículas metálicas, y las estrategias sintéticas más relevantes. Finalmente, se presentan las metodologías que se emplean con mayor frecuencia para la caracterización de nanopartículas metálicas.

En el Capítulo 2 se efectúa un análisis más profundo de la problemática de los nanomateriales sintéticos en el ambiente. Luego, se plantea la estrategia propuesta para la detección y cuantificación de nanopartículas metálicas empleando sensores moleculares. Finalmente, se plantean los objetivos de este trabajo de tesis y la organización de los resultados obtenidos.

En el Capítulo 3 se detalla la optimización de la síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con ácido gálico, mediante el empleo de una metodología quimiométrica, con

el objetivo de mejorar la reproducibilidad lote a lote. También se presenta la caracterización de dichas NP, y los ensayos de reproducibilidad pertinentes.

En el Capítulo 4 se describe el desarrollo de una metodología sintética *one-pot* de nanovarillas de plata en ausencia de agentes directores como surfactantes, junto a la caracterización de las mismas. Además, se presenta un algoritmo para la estimación de la concentración de sistemas polidispersos de nanopartículas multiforma.

En el Capítulo 5 se discute el desarrollo de un nuevo método analítico para la detección y cuantificación individual de NP de oro y plata (AgNP y AuNP), a partir de la interacción del nanomaterial con carbazol, como sensor molecular. El capítulo abarca la caracterización de los componentes individuales del sistema híbrido NP-fluoróforo, y los estudios de interacción y determinación de parámetros analíticos de validación (límite de detección y cuantificación, selectividad, precisión y exactitud, recuperación) de la metodología propuesta.

En el Capítulo 6 se desarrolla, a partir de calibración de segundo orden y datos de fluorescencia a dos vías, una nueva metodología analítica multivariada para la cuantificación simultánea de AgNP y AuNP. También se determinan los parámetros analíticos (límite de detección, límite de cuantificación, ensayos de recuperación, exactitud y precisión) del método propuesto.

En el Capítulo 7 se exponen las conclusiones generales de este trabajo de tesis de doctorado.

Finalmente, en los Anexos A, B, C y D se describen algunos aspectos que pueden ser necesarios para la interpretación de algunos resultados. Específicamente se discuten conceptos de análisis de la varianza (ANOVA) en diseño experimental, la estimación de la concentración de nanopartículas metálicas empleando un algoritmo denominado NANoPoLC, conceptos básicos de fluorescencia (que constituye la técnica instrumental empleada en las metodologías analíticas propuestas en esta tesis), y de validación de métodos analíticos en calibración univariada, respectivamente.

1

Introducción

1.1. Marco teórico

De acuerdo a como la define la Organización Internacional de Estandarización (International Organization for Standardization – ISO), la nanociencia es un área interdisciplinaria de desarrollo relativamente reciente enfocada en el estudio de las propiedades y los fenómenos de los nanomateriales (NM).¹ Estas entidades presentan al menos una de sus dimensiones (alto, largo y/o ancho) en la escala del nanómetro, entre 1 y 100 nm.¹ Este tipo de materiales tienen la particularidad de exhibir propiedades, funcionalidad y fenómenos notables y diferentes de sus análogos macroscópicos, como consecuencia de sus dimensiones.² A lo largo de la historia, los seres humanos se han valido de los nanomateriales y de sus propiedades especiales, incluso mucho antes de que pudiesen identificar que dichas propiedades tenían su origen en la escala nanométrica. Antiguas civilizaciones utilizaron nanopartículas de oro para impregnar un color rojizo a cerámicos, y fabricaron vitrales mediante el agregado de diferentes cantidades de nanopartículas de oro y de plata durante la producción del vidrio, entre otras aplicaciones.^{3,4} Sin embargo, en todos estos casos la existencia de los NM era ignorada, y su obtención y aplicaciones estaban limitadas al conocimiento empírico. La primera síntesis coloidal de nanopartículas de oro con rigurosidad científica se remonta al año 1857 y corresponde al trabajo experimental desarrollado por el destacado químico inglés Michael Faraday (1791-1867).⁵ Esta síntesis se llevó a cabo en un sistema de dos fases constituidas por agua y disulfuro de carbono (CS₂), empleando HAuCl₄ como precursor metálico y fosfina como reductor. La solución resultante presentó una coloración rojiza que fue atribuida, por Faraday, a la presencia de “partículas extremadamente finas” de oro metálico (Figura 1.1).

El desarrollo de la nanociencia está estrechamente ligado a los avances alcanzados en técnicas de caracterización e identificación de materiales nanoestructurados, como las

modernas microscopías electrónicas de transmisión (TEM) y barrido (SEM), de efecto tunel (STM) y de fuerza atómica (AFM), entre otras, que han permitido la visualización y el estudio más detallado de las estructuras que daban lugar a los interesantes fenómenos observados.^{4,6} La disponibilidad de técnicas instrumentales mejores y más variadas favoreció en las últimas décadas el diseño, la caracterización y la aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica, dando origen a la nanotecnología.²



Figura 1.1. Coloides de oro sintetizados por Michael Faraday hace aproximadamente 160 años. Archivo extraído de The Royal Institution©.⁷

El crecimiento rápido y sostenido de la nanotecnología, se ha extendido hacia diversas áreas científico-tecnológicas como catálisis, fotocatalisis, almacenamiento de datos, biomedicina, diagnóstico por imágenes, óptica, electrónica y cosmética.⁸⁻²⁰ Sin embargo, el desarrollo de la nanotecnología no se detiene en el ámbito científico, sino que también tiene el potencial de revolucionar todos los aspectos productivos y de manufactura de bienes y servicios a nivel mundial. De hecho, actualmente existe una gran variedad de productos de consumo que contienen en su formulación algún tipo de nanomaterial. En respuesta a esta situación, en los últimos años han comenzado a compilarse una serie de inventarios que contienen información acerca de NM, sobre productos que los contienen, y de potenciales riesgos que pueden surgir por el uso de los mismos, como el Inventario de Productos de Consumo (CPI) elaborado dentro del Proyecto de Nanotecnologías Emergentes (PEN),^{21,22} y la *Nanodatabase* desarrollada

Introducción

por el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad Técnica de Dinamarca.^{23,24} Estos inventarios representan un esfuerzo para poder comprender la transición de las nanotecnologías desde las mesadas de laboratorio hacia los estantes de los negocios y las plataformas de *e-commerce*, a fin de desarrollar las estrategias, herramientas y políticas que sean necesarias para asegurar el uso seguro y responsable de dichos productos. Un análisis del CPI realizado en octubre de 2019 (dentro del contexto de esta tesis doctoral) mostró que existe un claro incremento del número de productos disponibles a lo largo de los años y, por lo tanto, se espera que esta tendencia continúe en las siguientes décadas (Figura 1.2. A).

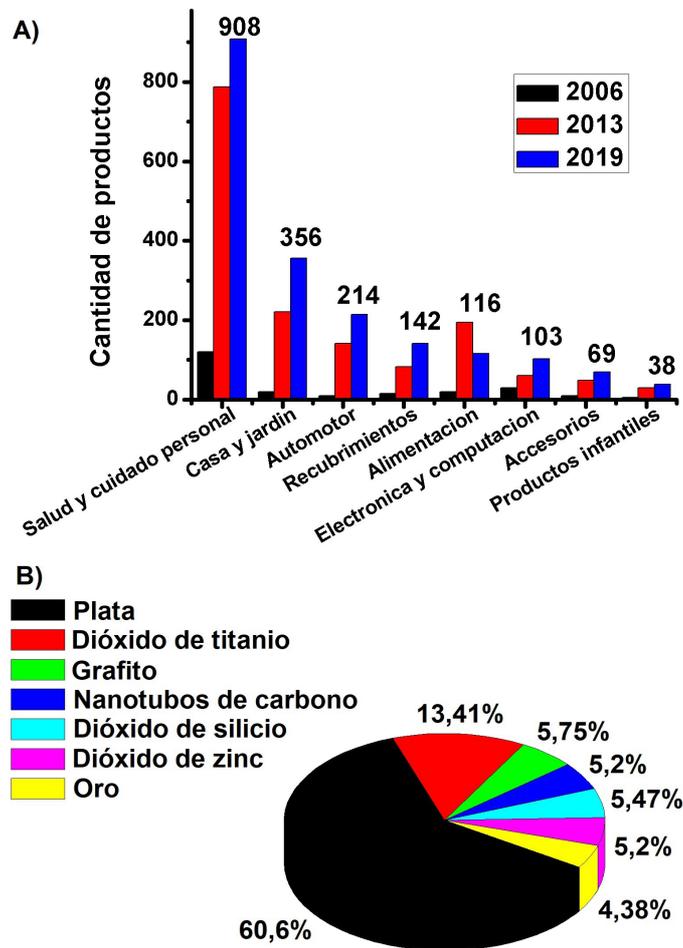


Figura 1.2. A) Número de productos que contienen nanomateriales en las diferentes categorías en las que los divide el CPI (se señala el número de productos registrados a octubre de 2019). **B)** Distribución del tipo de nanomaterial en todos los productos comerciales registrados.

Es notable el gran porcentaje que representa la categoría “*salud y cuidado personal*”, abarcando aproximadamente el 47 % de los productos listados, principalmente como consecuencia de las variadas aplicaciones medicinales y cosméticas de algunos NM que son utilizados en protectores solares,^{25,26} cremas anti-edad,^{27,28} tratamiento de heridas,^{29,30} sistemas de liberación de drogas,³¹⁻³³ entre otras. Por otro lado, los NM más recurrentes en productos comerciales son, por una gran diferencia (60 % del total de productos listados), nanopartículas de plata (AgNP), principalmente como consecuencia de las ampliamente reconocidas propiedades antimicrobianas y terapéuticas de las mismas (Figura 1.2. B).³⁴⁻³⁸ Se espera que la cantidad de productos comerciales que contengan AgNP se incremente en los siguientes años, considerando la intensa actividad de investigación que se desarrolla actualmente. En este sentido, las AgNP se han ensayado para su uso como potenciales agentes hepatoprotectores,³⁹ como antimicrobianos contra bacterias gram-positivo y gram-negativo,⁴⁰ como parte constituyente de injertos maxilofaciales para evitar la infección durante los procesos de oseo-integración,⁴¹ en aplicaciones teragnósticas,⁴² como anticancerígenos,^{43,44} entre otras. Sin embargo, los estudios sobre aplicaciones de AgNP no se limitan a la categoría “*salud y cuidado personal*” del CPI, sino que abarcan todas las categorías definidas. Hay numerosos estudios en los cuales abordaron la utilización de AgNP en empaques de alimentos,^{45,46} para la fabricación de telas con propiedades antimicrobianas⁴⁷⁻⁴⁹ (incluso contra el virus SARS-Cov-2),⁵⁰ en la producción de recubrimientos antibacteriales y anticorrosivos⁵¹⁻⁵³ y para la obtención de tintas electroconductoras para la fabricación de circuitos electrónicos impresos,^{54,55} etc.

Las nanopartículas de oro (AuNP), si bien no son las más utilizadas en productos de consumo y solo representan una pequeña fracción del total, sí son ampliamente estudiadas, como así también sus potenciales aplicaciones. Éstas usualmente se encuentran relacionadas a la biocompatibilidad de las AuNP,⁵⁶⁻⁵⁸ y a la gran facilidad y versatilidad con la que se puede funcionalizar su superficie.^{59,60} Las AuNP han sido utilizadas con fines catalíticos en diversas reacciones químicas,⁶¹⁻⁶⁴ en terapias contra el cáncer,^{65,66} en la producción de films y otros materiales antimicrobianos,^{67,68} y en

diferentes aplicaciones de sensado ópticas.⁶⁹⁻⁷¹

Lo anteriormente expuesto evidencia que el sector productivo se ha visto beneficiado de los desarrollos científicos sobre nanomateriales, y se espera que con el paso de los años esta transferencia de conocimiento desde los laboratorios hacia las industrias continúe a ritmo acelerado.

Como consecuencia de la producción a gran escala de este tipo de materiales, principalmente de nanopartículas metálicas (NP), la eventual liberación de los mismos en ambientes acuáticos o terrestres durante su producción, uso, reciclado o eliminación resulta prácticamente inevitable. Por otro lado, toda la investigación relacionada con las implicancias ambientales o sobre la salud humana del uso acelerado de los nanomateriales sintéticos está aun poco desarrollada y, si bien se realizan esfuerzos globales por abordar y controlar la producción y manipulación segura de estos productos, aún no existe legislación alguna que esté completamente destinada a la regulación de los mismos. Por ello, desde hace varios años, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha calificado a los NM como contaminantes emergentes.⁷² Esta situación le presenta a la comunidad científica un desafío para el cual está, al menos actualmente, poco preparada: el desarrollo de metodologías analíticas robustas para la detección y cuantificación ambiental de NM específicos.⁷³

La Química Analítica es un área de la ciencia enfocada principalmente en la detección, cuantificación y determinación de la composición y naturaleza de un analito mediante la utilización de diversas moléculas y/o de instrumentos electrónicos capaces de transformar la información química en una señal de utilidad analítica.⁷⁴ 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, en el desarrollo de productos farmacéuticos y en el estudio de sistemas biológicos complejos, al proporcionar un abanico de técnicas de análisis.⁷⁵

El desarrollo de métodos analíticos para la detección y cuantificación de NP requiere considerar sus propiedades fisicoquímicas únicas, y su estado coloidal. En el

caso de analitos convencionales, la información demandada por los organismos de regulación puede ser cuantitativa (concentración), como cualitativa (identidad química). Sin embargo, cuando el analito es una nanopartícula el problema resulta mucho más complejo porque la información cuantitativa se puede requerir como concentración en masa, pero también en número de partículas (partícula L⁻¹) o como concentración superficial (m² L⁻¹); y la información cualitativa no solo implica la detección del nanomaterial como tal, sino que también se debe proveer la información química (material del núcleo metálico y agentes estabilizantes de la superficie), y las características físicas de los mismos (tamaños, morfología, estado de agregación).⁷⁶ Incluso, si los estudios analíticos deben realizarse sobre muestras ambientales que pueden contener material nanoparticulado sintético, resulta necesario tener en cuenta todos los procesos que pueden transformar el nanomaterial antes de considerar una metodología analítica apropiada.^{77,78} Por estas razones, las NP son un tipo de analito especial, y su análisis requiere prestar una atención especial a las diversas variaciones que pueden manifestar en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y características, incluso en NP del mismo tipo. Una posible solución al problema de la variabilidad es el empleo de herramientas quimiométricas, como el diseño de experimentos (DOE) y las metodologías de superficie de respuesta (RSM),^{79,80} que han demostrado proveer entendimiento de los factores que interactúan durante la síntesis de los nanomateriales. Estas metodologías permiten comprender racionalmente las condiciones experimentales para la obtención del nanomaterial y, consecuentemente, se adquiere un mayor control sobre el producto final.⁸¹⁻⁸³

En los últimos años, se ha desarrollado una variedad limitada de técnicas analíticas que permiten la cuantificación de nanomateriales sintéticos y, particularmente, de NP. La mayoría de estas técnicas requieren procesos previos de separación de las NP en función de sus tamaños o formas, como por ejemplo mediante electroforesis capilar,⁸⁴⁻⁸⁷ extracción en punto nube⁸⁸⁻⁹² y cromatografía por exclusión de tamaños,⁹³⁻⁹⁶ e incluso necesitan digestión de las muestras, previa al análisis en matrices complejas, para realizar la cuantificación de los correspondientes

caciones metálicas.⁹⁷⁻⁹⁹ Este tipo de pretratamientos de las muestras insumen una gran cantidad de tiempo y dificultan el análisis de rutina. Actualmente, la técnica más utilizada para el análisis de NP metálicas en solución es la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), principalmente debido a su rapidez y porque ha demostrado ser una metodología muy precisa y exacta.¹⁰⁰⁻¹⁰³ Sin embargo, las metodologías basadas en ICP-MS requieren de equipamiento muy costoso y de personal altamente capacitado para su operación, por lo que su implementación para análisis de rutina en países en desarrollo se encuentra limitada.

Como alternativa a aquellas metodologías que requieren pretratamiento de las muestras y técnicas costosas, empieza a ganar importancia el desarrollo de métodos más sencillos, basados en sensores químicos. Un sensor químico es un dispositivo capaz de transformar la información química en una señal de utilidad analítica, originándose esta información a partir de una reacción química del analito o de una propiedad física que puede medirse en el sistema.¹⁰⁴ El uso de sensores químicos como estrategia analítica en el monitoreo de NP metálicas puede ser muy apropiado por su bajo costo, sensibilidad, portabilidad y simplicidad.¹⁰⁵

Recientemente, se han desarrollado metodologías analíticas para la detección de NP metálicas basadas en espectroscopia de fluorescencia y UV-visible. Estas metodologías permiten la cuantificación de los nanomateriales a partir de los cambios producidos sobre la señal de un determinado sensor molecular como resultado de su interacción con la nanopartícula. Un ejemplo es el método desarrollado por Zuber *et al.* donde la fluorescencia del compuesto bodipy (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) se incrementa de forma proporcional a la concentración de NP presente en la muestra.¹⁰⁶ Por otro lado, en nuestro laboratorio, se ha desarrollado una metodología para detectar AuNP y AgNP estabilizadas con citrato en concentraciones del orden pM en mezclas acuosas, sin previa separación, utilizando los indicadores ácido-base fucsina básica y ácido rosólico como sondas moleculares, y analizando las diferencias de absorbancia producidas en los espectros UV-visible de las NP por la interacción con las sondas mencionadas.¹⁰⁷ Si bien se ha avanzado en este ámbito, el empleo de este tipo de estrategias analíticas es aún un

área de estudio en desarrollo, con gran potencial para ser explotada, y es el motor de este trabajo de tesis doctoral.

A lo largo de las páginas siguientes de este capítulo se introducirán algunos conceptos relevantes para el entendimiento de la tesis, abarcando desde la clasificación de los diferentes tipos de nanomateriales más utilizados hasta sus procesos sintéticos y propiedades, poniendo particular énfasis en las NP. Asimismo, se mencionarán las técnicas de caracterización de nanomateriales más comúnmente empleadas y sus aplicaciones.

1.2. Nanomateriales

Como se estableció anteriormente, los NM presentan tamaños que van desde 1 nm a 100 nm en al menos una de sus dimensiones y tienen propiedades que son diferentes a aquellas que poseen los materiales macroscópicos de la misma composición química.^{108,109} Para lograr una inmediata comparación y poner en perspectiva estas dimensiones, se puede decir que un nanómetro es aproximadamente unas 100000 veces más pequeño que un cabello humano (Figura 1.3.). Los nanomateriales pueden ser metálicos, cerámicos, orgánicos, poliméricos o compósitos, y han adquirido una gran relevancia científica por las propiedades interesantes que presentan como consecuencia de su tamaño nanométrico y el incremento del área superficial disponible.^{4,110}

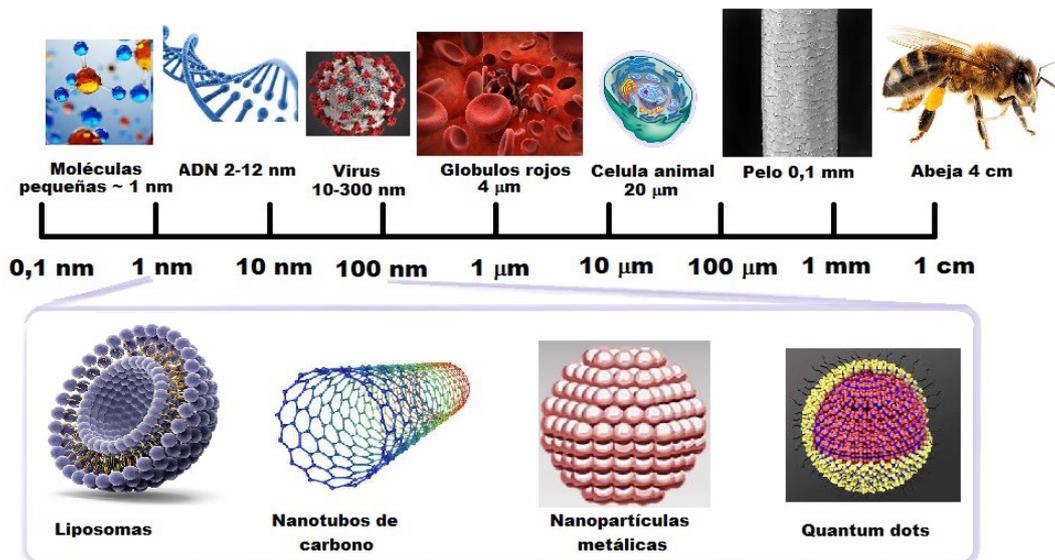


Figura 1.3. Representación de la escala de tamaños, con énfasis en la escala nanométrica. Los nanomateriales tienen dimensiones entre 1 nm y 100 nm.

1.2.1. Reseña histórica

Los NM, y particularmente las NP, han sido producidos y utilizados por los humanos por cientos de años. Sin embargo, el reconocimiento de ciertos materiales antiguos como materiales nanoestructurados es relativamente reciente, y se logró gracias a la disponibilidad de técnicas modernas de caracterización. Por ejemplo, se puede mencionar un objeto fabricado en el siglo IV, que se destaca por su alto grado de sofisticación: la copa de Licurgo (Figura 1.4.). Esta copa se caracteriza por presentar diferentes colores en función del ángulo de iluminación. La misma exhibe un color rojo cuando se la ilumina por dentro (color transmitido) y un color verde cuando se la ilumina por fuera (luz reflejada). Este efecto óptico representó un verdadero misterio para los hombres de la época convirtiéndose en un objeto mítico al cual se le atribuyeron poderes sobrenaturales. Recién en el siglo XX (1990) se determinó que dichas propiedades ópticas eran consecuencia de la presencia de AuNP y AgNP, con diámetros aproximados de 50 nm. El Au es el principal responsable de transmisión del color rojizo, mientras que el reflejo verdoso fue consecuencia de la dispersión de luz provocada por las AuNP y AgNP.²



Figura 1.4. Copa de Licurgo: iluminada desde afuera adquiere coloración verde (izquierda) mientras que si la fuente de luz se sitúa en el interior, se observa roja (derecha).¹¹¹

Las AuNP han sido ampliamente empleadas en tiempos antiguos como sustancia con fines diagnósticos y medicinales. Durante la Edad Media, hasta fines del siglo XV, al denominado “oro soluble” se le asignaban fabulosos poderes curativos para diversas enfermedades (tuberculosis, artritis, epilepsia, venéreas, afecciones de corazón), y también se utilizaba para diagnosticar la sífilis. Estas aplicaciones de las AuNP fueron registradas recién en el siglo XVII, cuando Francisci Antonii publica en 1618 el que es considerado como el primer libro de oro coloidal, y que incluye algunas recetas referidas a su fabricación y propiedades medicinales.³ En el mismo sentido, el químico Johann Kunckels publicó en 1676 otro libro que trata sobre soluciones ligeramente rosas de “oro bebible” con propiedades curativas para varias enfermedades y en el cual concluye, mucho antes que Faraday, “que el oro debe presentarse en tal grado de comunión que no es visible para el ojo humano”.¹¹² En el año 1908, Gustav Mie propuso una solución analítica al problema de la dispersión de la radiación electromagnética por partículas esféricas mediante la resolución de las ecuaciones de Maxwell, lo que contribuyó al entendimiento de los fenómenos ópticos observados.¹¹³ La teoría de Mie permitió predecir exitosamente el comportamiento

óptico de las partículas metálicas para ciertas geometrías particulares. En las décadas siguientes, se avanzó lentamente en el área de los NM, principalmente debido a las limitaciones técnicas y teóricas para el estudio de este tipo de sistemas. Sin embargo, algunos hitos científicos del siglo XX permitieron dar grandes avances en la nanociencia. La formulación de la mecánica cuántica permitió explicar y comprender el comportamiento de la materia a nivel atómico. La invención de la computadora y de herramientas de cálculo más poderosas favoreció el desarrollo teórico del área e impulsó la creación de dispositivos electrónicos. Además, la tendencia hacia la miniaturización trajo aparejados nuevos desafíos tecnológicos con el objetivo de alcanzar límites cada vez de menores dimensiones. Finalmente, el desarrollo de técnicas avanzadas (microscopía electrónica, de efecto tunel, etc.) permitió caracterizar, medir y manipular la materia en la escala nanométrica, posibilitando la realización de estudios de mayor complejidad y dotando a la investigación en nanociencia de una gran dinámica.

1.2.2. Clasificación de los nanomateriales

Varios nanomateriales han sido descritos a lo largo de los años y, por lo tanto, resulta necesario un sistema de clasificación para los mismos. De forma general, los nanomateriales pueden clasificarse de acuerdo a diferentes parámetros, como su origen (naturales o sintéticos), su composición química (orgánicos, inorgánicos, basados en carbono o compósitos), su morfología, tamaños, sus aplicaciones, etc. A continuación, se mencionarán las categorías de mayor relevancia para esta tesis doctoral.

1.2.2.1. De acuerdo a su composición química

De acuerdo a su composición, podemos clasificar a los nanomateriales en cinco grandes grupos: inorgánicos, orgánicos, basados en carbono, compósitos (materiales compuestos) u otros tipos de nanomateriales.¹¹⁴

- El grupo de los nanomateriales inorgánicos incluye las nanopartículas metálicas de elementos nobles como AuNP¹¹⁵⁻¹¹⁹ y AgNP^{43,120-123} (que fueron el foco de este trabajo de tesis doctoral), de algunos metales de transición (Fe,

Zn, Cu, Pd, Co)^{124–128} y otros metales como el Al.¹²⁹ También incluye a las nanopartículas de óxidos metálicos (Fe₂O₃, CuO, TiO₂, ZnO, CeO)²⁶ y de silicio (SiO₂), entre otros.¹³⁰ Como consecuencia de su tamaño y de la presencia de agentes estabilizantes u óxidos superficiales, las nanopartículas inorgánicas poseen un gran área superficial y una alta densidad superficial de carga, lo que las transforma en excelentes candidatas para numerosas aplicaciones. Las nanopartículas inorgánicas se han utilizado en biomedicina,^{131,132} catálisis,^{133–135} en producción o almacenamiento de energía,^{136–138} como sensores,^{70,139,140} en biorremediación,^{141,142} etc.

- Los nanomateriales orgánicos son usualmente polímeros (dendrímeros, nanopartículas poliméricas)^{143,144} o sistemas autoensamblados (liposomas, micelas)^{145,146} formados por material orgánico, sin tener en cuenta aquellas nanoestructuras basadas en carbono.
- Los nanomateriales basados en carbono son aquellos constituídos principalmente por ese elemento. Pueden clasificarse en cinco subcategorías: (a) fullerenos, que contiene al menos 60 átomos de carbono;¹⁴⁷ (b) nanotubos de carbono;¹⁴⁸ (c) grafeno;¹⁴⁹ (d) nanofibras de carbono;¹⁵⁰ y (e) los nanodiamantes de carbono, y carbon-dots (nanopuntos de carbono).¹⁵¹
- Los nanomateriales compuestos son sistemas nanoestructurados multifase, con al menos una de esas fases en la escala nanométrica. Pueden estar formados por cualquier combinación de nanoestructuras metálicas, basadas en carbono o orgánicas con cualquier forma de cerámicos, polímeros o metales macroscópicos.^{152,153}
- Otros tipos de materiales son todos aquellos que no forman parte de las otras categorías, incluyendo las nanocristalitas (sólidos policristalinos de dimensiones nanométricas),^{154–156} materiales nanoporosos (estructuras orgánicas o inorgánicas con poros de 100 nm o de menor tamaño),^{157–159} los *quantum dots* (un tipo particular de nanoestructura cristalina semiconductor con importantes propiedades fluorescentes como consecuencia del

confinamiento cuántico),¹⁶⁰⁻¹⁶² entre otras.

1.2.2.2. De acuerdo a la dimensionalidad del nanomaterial

Como cualquier característica morfológica del nanomaterial puede afectar la relación superficie-volumen del mismo y su interacción con la radiación electromagnética, las propiedades de estos materiales resultan muy dependientes de la forma de las nanoestructuras. En respuesta a esto, se propuso un sistema de clasificación de nanoestructuras basado en la dimensionalidad, que integra tanto el tamaño como la forma de dichas estructuras.^{163,164} De acuerdo a esta clasificación, los nanomateriales pueden caer dentro de una de las cuatro dimensionalidades posibles: 0D, 1D, 2D o 3D.

- Los nanomateriales cero dimensionales (0D) son aquellos que presentan todas sus dimensiones (x, y, z) 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 AuNP y AgNP, *quantum dots*, fulerenos, entre otros.
- Los nanomateriales uni-dimensionales (1D) 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 1D son nanoalambres, nanovarillas, nanotubos de metales, nanotubos de óxidos de metales o de carbono, fibras, filamentos, entre otros.
- Los nanomateriales bi-dimensionales (2D) son aquellos con una única dimensión en la nanoescala, y con las dos restantes con dimensiones mayores a 100 nm. Los nanomateriales 2D tienen generalmente formas laminares. Dentro de esta categoría, los NM más comunes son las 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 panal de abejas.

- Los nanomateriales tri-dimensionales (3D) son estructuras donde todas sus dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala (> 100 nm). Sin embargo, estos materiales poseen una estructura nanocristalina 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, “nanobrotos” (nanobuds) que son combinaciones de nanotubos de carbono y fulerenos unidos covalentemente, entre otros.

1.2.3. Síntesis de nanopartículas metálicas de oro y plata

En términos generales, las metodologías utilizadas para la preparación de nanomateriales pueden agruparse en dos categorías diferentes, de acuerdo a la estrategia sintética utilizada (Figura 1.5.):²

- métodos *top-down* (de arriba hacia abajo), que involucran la fabricación de las nanoestructuras partiendo desde el material macroscópico mediante procesos físicos, químicos o mecánicos; y
- métodos *bottom-up* (de abajo hacia arriba), que requieren la formación de los nanomateriales a partir de precursores moleculares o atómicos, usualmente mediante reacciones químicas.

Usualmente, las técnicas *top-down* comprenden moliendas mecánicas, corrosión química, degradación por láseres de alta energía, métodos de degradación térmicos y nanolitografía.¹⁶⁵ Este tipo de técnicas no suelen llevar a la formación de nanopartículas individuales, sin embargo, pueden producir materiales nanoestructurados macroscópicos,⁴ que se definen como sólidos macroscópicos que presentan microestructuras en la nanoescala.¹⁶⁶ Las técnicas *bottom-up* pueden clasificarse como métodos en fase gaseosa (deposición química de vapor, deposición física de vapor, deposición de capa atómica, etc.), en fase líquida (reducción química, electroquímica o fotoquímica de iones metálicos, procesos sol-gel, electrodeposición, etc.), y métodos biológicos.¹⁶⁵ Este tipo de técnicas pueden producir nanopartículas

individuales pequeñas y con distribuciones de tamaño estrechas, siempre y cuando los parámetros de síntesis se controlen apropiadamente.⁴ Ambos enfoques resultan complementarios entre sí, y su utilización depende de lo que se requiera para una determinada aplicación.

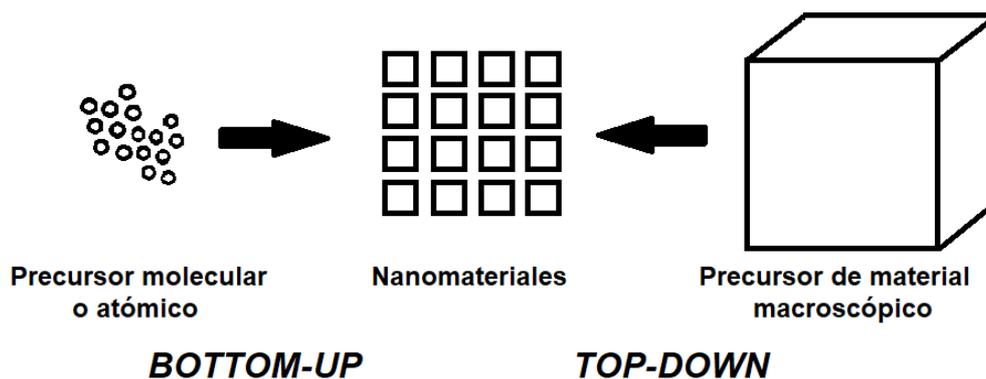


Figura 1.5. Representación esquemática de las estrategias posibles para la síntesis de nanomateriales.

Los métodos *bottom-up* son los más extendidos y utilizados tradicionalmente para la síntesis de AuNP y AgNP. A continuación se describirán, desde un punto de vista mecanístico, las metodologías sintéticas de mayor importancia para el desarrollo de esta tesis doctoral.

1.2.3.1. Reducción química de cationes metálicos

La reducción química de un catión metálico es un método de síntesis directo para la obtención de nanopartículas metálicas que resulta particularmente atractivo debido a su simplicidad, versatilidad y a la disponibilidad de precursores y reactivos de relativo bajo costo. Estas metodologías consisten en la disolución de una sal metálica en medios acuosos u orgánicos, seguida por la reducción del catión al estado de oxidación cero. Desde el punto de vista mecanístico, la formación de las NP también involucra la ocurrencia de otros fenómenos, como la nucleación, el crecimiento del nanocrystal, la maduración y/o la aglomeración.¹⁶⁷

Como en cualquier reacción de tipo rédox, la factibilidad del proceso de

transferencia electrónica depende de la termodinámica del proceso, y la conversión química del catión al metal cero-valente requerirá que la diferencia neta de los potenciales estándar de reducción de los reactivos involucrados sea positiva ($\Delta E^\circ > 0$). En el caso de la plata, por ejemplo, el potencial de reducción electropositivo de la reacción en agua $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ ($E^\circ = +0,799 \text{ V}$,¹⁶⁸) permite la utilización de varios agentes reductores, como citrato de sodio ($E^\circ = -0,180 \text{ V}$,¹⁶⁵), borohidruro de sodio ($E^\circ = -0,481 \text{ V}$,¹⁶⁸) y ácido gálico ($E^\circ = +0,560 \text{ V}$,¹⁶⁹), que fueron empleados para la preparación de las NP en este trabajo de tesis. Se puede arribar a la misma conclusión para el caso de Au, que tiene la reacción global $\text{AuCl}_4^- \rightarrow \text{Au}^0 + 4 \text{Cl}^-$ ($E^\circ = +0,994 \text{ V}$,¹⁷⁰). Por otro lado, algunos agentes reductores cumplen un doble rol durante el proceso sintético, ya que no solo participan en la reacción redox sino que también actúan como agentes estabilizantes al interactuar con la superficie metálica, como es el caso del citrato de sodio o el ácido gálico, aspecto en el que se profundizará a continuación para cada NP en particular.

Reducción por anión citrato

La obtención de nanopartículas metálicas de oro a partir de la reducción química con citrato de sodio se conoce popularmente como metodología de Turkevich, desde que este autor publicó la metodología en 1951.¹⁷¹ Desde entonces, la metodología se ha extendido a la fabricación de AgNP.^{172,173}

Existen numerosos estudios que abordan el mecanismo de crecimiento de NP mediante reducción química con anión citrato.^{173,174} Pillai *et al.*,¹⁷³ estudiaron el rol del citrato de sodio en la formación de AgNP mediante reacciones de radiólisis de pulso, y observaron que en etapas tempranas de la reacción el anión citrato interactuaba con dímeros Ag_2^+ formando complejos que, consecuentemente, modulaban el crecimiento de las partículas. El complejo $[\text{Ag}_2^+\text{-citrato}]$ experimenta transformaciones más lentamente que de los dímeros Ag_2^+ no complejados. Como consecuencia de estas transformaciones más lentas, los complejos de citrato llevan eventualmente a la formación de grandes agregados de plata. Esto ocurre porque a medida que se forman semillas de plata y se acomplejan con el anión citrato,

Introducción

disminuye la concentración de citrato del medio de reacción para reducir Ag^+ , produciendo cada vez menos semillas nuevas. Se observó que las pocas semillas formadas crecieron mediante maduración de Ostwald y por reducción del catión metálico únicamente sobre la superficie de los nanocrisales (Figura 1.6.). Al final del proceso, el anión citrato interacciona electrostáticamente con la superficie metálica de las NP formadas, actuando como estabilizante y evitando procesos de floculación.

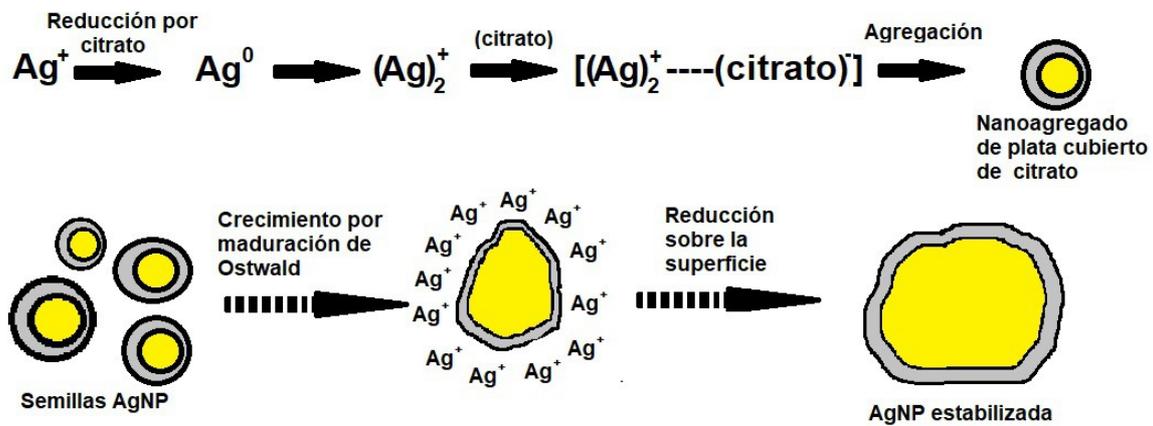


Figura 1.6. Representación del mecanismo de nucleación y crecimiento de AgNP obtenidas por reducción con citrato.¹⁷³

Polte *et al.*¹⁷⁴ propusieron un mecanismo para la formación de AuNP a partir de la reducción con citrato de sodio que involucra diferentes pasos de crecimiento de la partícula mediante coalescencia de los centros de nucleación y reducción del catión precursor sobre la superficie de las partículas, de modo muy similar al mecanismo propuesto para AgNP. La formación de AuNP incluye 4 etapas.¹⁷⁴ Inicialmente, ocurre una nucleación rápida (durante los primeros 60 segundos) en la cual se forman semillas de AuNP de 2 nm de diámetro, aproximadamente. A partir de estas semillas, ocurre el crecimiento de la partícula por coalescencia o maduración de Ostwald, proceso que dura aproximadamente 20 minutos en las condiciones estudiadas. Luego, estos agregados de Au continúan incrementando su tamaño mediante un crecimiento difusional lento sostenido tanto por reducción del precursor metálico como así también por la continua coalescencia de las partículas. Finalmente, las partículas crecen rápidamente hasta sus dimensiones finales por reducción

autocatalítica del precursor metálico sobre la superficie de las nanopartículas ya formadas.

Reducción por borohidruro de sodio

Hace algunos años, Polte *et al.* elucidaron un mecanismo de formación de AgNP mediante reacción con el anión borohidruro, realizando experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño resuelto en el tiempo (SAXS) y espectroscopia UV-visible combinados con caracterización por microscopía electrónica de transmisión.¹⁷⁵ El mecanismo propuesto consta de cuatro etapas de crecimiento. En una primera instancia, que sucede en los primeros 200 ms, se produce la reducción de los precursores metálicos con la formación de dímeros, trímeros y agregados de diferentes diámetros menores a 2 nm. Posteriormente, los agregados formados coalescen para generar partículas pequeñas de diámetros de 4-6 nm. Las primeras dos etapas ocurren muy rápidamente, durante los primeros 5 s de la reacción. Las partículas formadas luego entran en un estado metaestable donde no hay crecimiento del tamaño de las partículas. En un punto de la reacción, la estabilidad coloidal decrece abruptamente, lo que ocasiona un segundo proceso de coalescencia que eventualmente produce partículas de mayor tamaño, entre 10 y 16 nm de diámetro, que se mantienen estables por varios días. En resumen, a diferencia del mecanismo de citrato de sodio, las AgNP obtenidas mediante borohidruro sólo se forman por dos procesos de coalescencia de partículas pequeñas para formar otras de mayor tamaño, y el mecanismo está gobernado por estabilización electrostática de las partículas (Figura 1.7.).¹⁷⁵

El mecanismo de formación de AuNP mediante reducción con borohidruro también fue estudiado por Polte *et al.*¹⁷⁶ mediante un procedimiento experimental similar al descrito para AgNP. El mecanismo para AuNP presenta analogías al de AgNP. De manera similar al caso de Ag, el crecimiento de AuNP también ocurre únicamente por coalescencia, por lo que la formación de AuNP también está gobernada por la estabilidad coloidal. La principal diferencia entre ambos mecanismos radica en que durante el crecimiento de AuNP solo parece ocurrir una

única etapa de coalescencia.

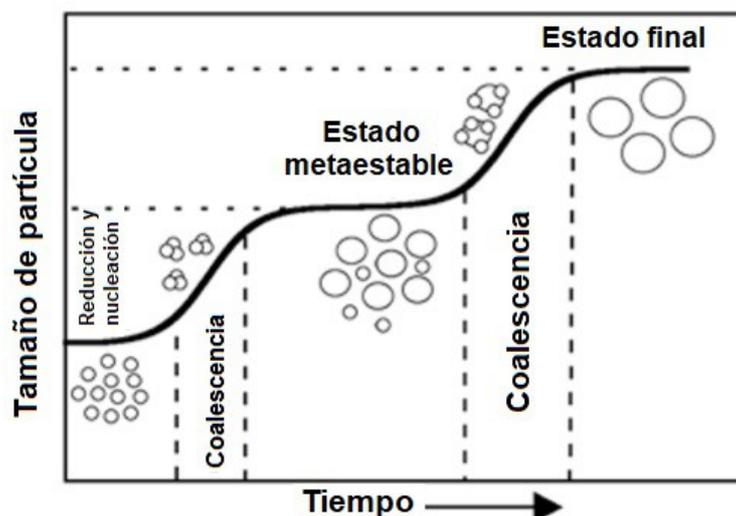
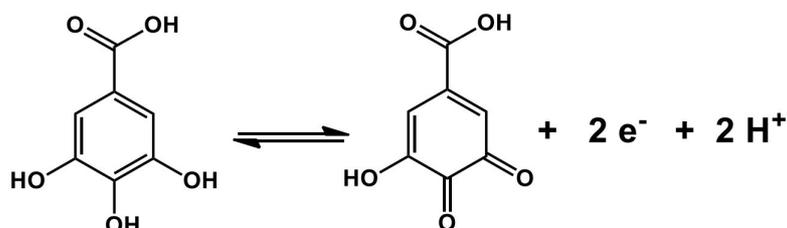


Figura 1.7. Mecanismo de formación de AgNP por reducción con borohidruro de sodio de acuerdo a lo propuesto por Polte et al. Diagrama adaptado de la Ref. 173.

Reducción por ácido gálico

El ácido gálico es un compuesto polifenólico abundante como compuesto libre o formando partes de los taninos en una gran variedad de especies del reino vegetal, entre las que se encuentran espinaca, uva, té verde, arándanos, etc.¹⁷⁷ Ha sido ampliamente utilizado debido a sus importantes propiedades antioxidantes,¹³⁸ anti-inflamatorias,¹⁷⁹ antibacteriales,¹⁸⁰ anticarcinogénicas,¹⁸¹ entre otras. El ácido gálico también ha sido empleado para la reducción de cationes metálicos en agua y a temperatura ambiente, ya que presenta un potencial de oxidación estándar de reacción (esquema 1.1.) igual a 0,500 V.¹⁸²



Esquema 1.1. Oxidación bi-electrónica del ácido gálico para la formación de la quinona correspondiente.

Las AuNP y AgNP obtenidas mediante reducción con ácido gálico son extremadamente estables a valores de pH alrededor de 4,5 y 5,0 debido a la interacción del anión carboxilato del ligando con la superficie metálica y la formación de una capa estabilizada mediante interacciones puente hidrógeno (Figura 1.8.) que les aporta una gran estabilidad coloidal, con potenciales zeta muy altos ($z = -45$ mV).¹⁸² Se observó que la reducción de cationes mediadas por polifenoles derivados del ácido benzoico fue muy dependiente de la posición relativa de los grupos hidroxilo. En este sentido, no se pudieron obtener nanopartículas cuando se emplearon derivados de ácido benzoico sustituidos con grupos hidroxilos en posiciones *meta*, pero sí se logró la síntesis de NP cuando éstos se localizaban en las posiciones *orto* y *para*.¹⁸² Se comprobó que esta reacción ocurre por la reducción bi-electrónica de los grupos hidroxilo a la correspondiente quinona, mientras que el grupo carboxilato actúa como ligando que estabiliza las partículas formadas (Figura 1.8.).¹⁸²

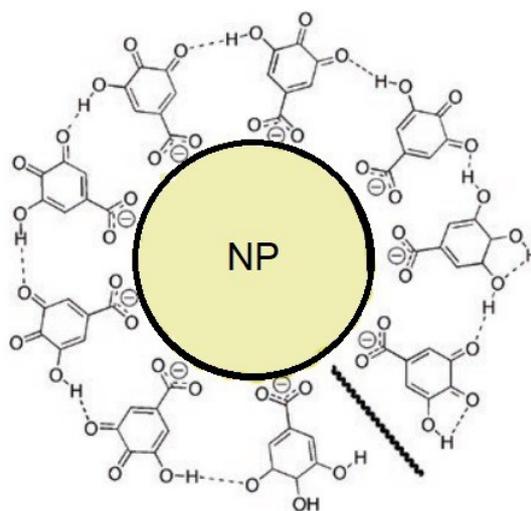


Figura 1.8. Ilustración de NP recubiertas y estabilizadas con la especie oxidada de ácido gálico.¹⁸²

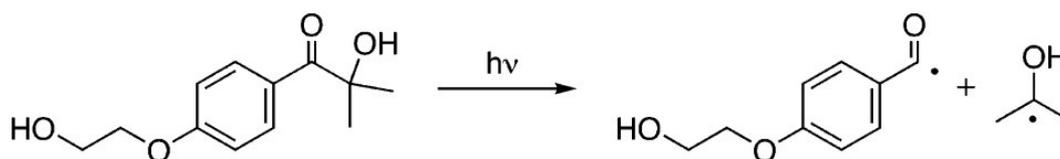
1.2.3.2. Síntesis fotoquímica de NP

En las últimas décadas los métodos de síntesis de NP asistidos por luz han sido ampliamente desarrollados, sobre todo por la versatilidad y la selectividad de las

Introducción

reacciones fotoquímicas para generar especies reductoras *in situ*. Este tipo de metodologías están basadas en la reducción de un catión metálico M^{n+} a su estado M^0 mediante fotólisis directa o indirecta. Se han propuesto numerosas metodologías sintéticas de NP basadas en la utilización de fotosensibilizadores.^{183,184} Un fotosensibilizador es un compuesto químico (colorante orgánico, cetona aromática, anión poliatómico) que puede absorber luz UV-visible generando intermediarios reductores, usualmente radicales, que pueden reaccionar con cationes metálicos para formas partículas metálicas.¹⁸⁵

Una estrategia fotoquímica muy estudiada para la fabricación de AuNP y AgNP consiste en la generación *in situ* de radicales cetilo mediante la irradiación con luz UVA/UVB (300 a 360 nm) de cetonas alifáticas o aromáticas, como acetona, benzofenona o acetofenona, que posteriormente reaccionan con los precursores catiónicos correspondientes.^{183,184,186} McGilvray *et al.*,¹⁸³ Alarcon *et al.*,¹⁸⁴ y Stamplecoskie *et al.*,¹⁸⁶ han utilizado el compuesto 2-hidroxi-4'-(2-hidroxi-etoxi)-2-metil-propiofenona (Irgacure-2959®, I-2959), que experimenta una reacción tipo Norrish I, donde ocurre una ruptura α homolítica fotoinducida que conduce a la formación de radicales cetilo (Esquema 1.2.). Este compuesto presenta la ventaja de ser soluble en agua y producir radicales cetilo con un rendimiento cuántico igual a 0,29 mediante una fotorruptura muy rápida desde un estado triplete con un tiempo de vida media de 11 ns.¹⁸⁷



Esquema 1.2. Ruptura α homolítica de I-2959 para la formación de radicales cetilo.

El Irgacure-2959 ® ha sido utilizado para la obtención de AuNP¹⁸³ y AgNP^{186,188} generando nanomateriales “desnudos”, es decir, sin el agregado de agentes estabilizantes extras, mediante una metodología que es limpia y rápida. Uno de los

subproductos de la reacción, el (2-hidroxi)-etoxi-ácido benzoico, actúa como un ligando débil que mantiene la estabilidad coloidal post-síntesis. Resulta importante remarcar que es posible manipular la morfología de los nanomateriales obtenidos variando la longitud de onda de excitación durante el crecimiento de las semillas metálicas.^{186,189} De esta manera, irradiando con láseres, lámparas o diodos emisores de luz (LED) con longitudes de onda entre 400 y 700 nm pequeñas semillas de AuNP o AgNP, se pueden obtener diferentes nanoestructuras con control de forma y tamaño (esferas, dodecaedros, nanoplatos, nanovarillas, etc.).^{186,189}

1.2.3.3. Síntesis de NP anisotrópicas

La introducción de anisotropía de forma en la nanoescala ha emergido en los últimos años como una estrategia de gran importancia para acceder a nuevas funcionalidades y propiedades. Teniendo esto en cuenta, resulta fundamental poder controlar con una alta precisión los procesos sintéticos para acceder a nanopartículas con las formas deseadas (varillas, cubos, triángulos, etc.).

El método más directo para la obtención de nanopartículas anisotrópicas es la cristalización controlada de los bloques de construcción atómicos o moleculares.¹⁹⁰ Dentro de estos métodos, el más simple es la síntesis solvotérmica que se basa en exponer los precursores del nanomaterial en solución a condiciones particulares de crecimiento (concentración de reactivos, temperatura, pH, etc.) que terminan definiendo la anisotropía de forma, sin la incorporación de agentes adicionales que dirijan el crecimiento del nanomaterial. El principal problema que presenta la síntesis solvotérmica radica en su alta dependencia de los parámetros experimentales, observándose que ante mínimas variaciones de las condiciones deseadas se produce una pérdida de control sobre la morfología.¹⁹⁰ Una poderosa alternativa a los métodos solvotérmicos, son los métodos de crecimiento basados en *semillas*, en los cuales se separan los procesos de formación de los centros de nucleación (semillas) del proceso de crecimiento del cristal, permitiendo una optimización independiente de cada uno de los procesos. Estas metodologías requieren que inicialmente se obtengan pequeñas partículas bien definidas, que luego

Introducción

se utilizan como semillas en un segundo paso de crecimiento. La principal ventaja que presentan respecto de los primeros es que el control sobre el tamaño de las partículas resulta más sencillo, ya que fundamentalmente dependerá de la duración de la etapa de crecimiento. Se puede adquirir un mayor control sobre el crecimiento de los nanomateriales si los métodos anteriormente descritos se combinan con un enfoque basado en el ensamblaje de los bloques de construcción mediante “plantillas” o “moldes”.¹⁹⁰ Esta metodología sintética usualmente se basa en el recubrimiento de la superficies metálicas con otras especies químicas o materiales (surfactantes, polímeros, otros nanomateriales, etc.) que dirigen el crecimiento del cristal, o bien en la utilización de otras nanoestructuras de morfologías definidas dentro de las cuales se produce la síntesis del nanomaterial que adquiere la forma del “molde”. Esta es una de las estrategias más empleadas en la síntesis de AuNP y AgNP anisotrópicas.^{191–196}

Los surfactantes han demostrado ser capaces de dirigir las síntesis de los NM hacia la formación de nanopartículas de diferente morfología, como consecuencia de su adsorción preferencial sobre diferentes planos cristalinos de las semillas formadas durante el crecimiento de las partículas.¹⁹⁷ Por ejemplo, se observó que mediante la utilización de tosilato de cetiltrimetilamonio (CTAT) durante la fase de crecimiento es posible sintetizar nanovarillas de plata (AgNR) (figura 1.9).¹⁹⁸ Este surfactante posee mayor afinidad por el plano cristalino {100} de las semillas de plata, por lo que se encuentra favorecido el crecimiento diferencial por el plano {111} para formar las AgNR.

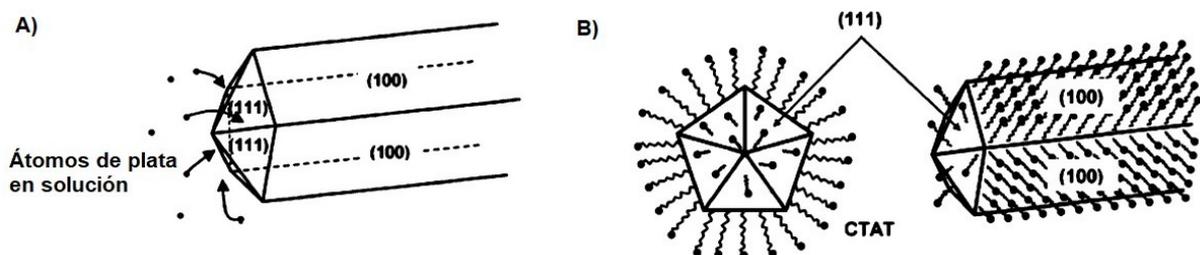


Figura 1.9. A) Crecimiento de AgNR por transferencia preferencial de átomos de plata sobre la cara cristalina {111} en los extremos de la nanopartícula. **B)** Adsorción preferencial de CTAT a las caras laterales {100} de la nanovarilla.¹⁹⁸

1.2.4. Propiedades ópticas de los nanomateriales

Las propiedades únicas de los NM en general se atribuyen a efectos cuánticos, a la mayor área superficial que poseen en comparación con sus análogos macroscópicos, y a los fenómenos de auto-ensamblado.¹⁹⁹ Los efectos cuánticos dominan el comportamiento de cualquier material nanométrico, afectando las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas, principalmente por efecto del confinamiento cuántico electrónico que experimentan y por la modificación de la densidad de estados electrónicos. En segundo lugar, como los NM tienen un gran área superficial total, la mayor cantidad de átomos superficiales incrementa sustancialmente su reactividad por el aumento del número de sitios activos disponibles. El auto-ensamblado permite que los componentes de un sistema se organicen formando patrones o estructuras ordenadas. A nivel de la nanoescala, esto refleja información respecto de la forma, polaridad, carga de los componentes del nanomaterial, que determinan las interacciones atractivas o repulsivas del mismo.

Si bien los nanomateriales presentan numerosas y asombrosas propiedades,^{110,199} las ópticas son una de las más importantes en NP metálicas, y las de mayor relevancia para esta tesis doctoral. Las propiedades ópticas, como la reflexión, transmisión, absorción y emisión de luz de los nanomateriales son completamente dependientes de su estructura electrónica, que puede ser muy diferente para distintas morfologías o tipos de nanomaterial, e incluso dependen del microambiente que lo rodea. A escala nanométrica, los electrones de las NP no tienen la misma libertad que poseen en el material macroscópico. Como consecuencia, las NP interactúan de forma muy particular con la radiación electromagnética, presentando propiedades peculiares como coloración, luminiscencia y de óptica no lineal. Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas, en general se encuentran dominadas por los efectos de plasmón de superficie, mientras que en otro tipo de nanomateriales, como los *quantum dots*, están gobernadas por el confinamiento cuántico.¹⁹⁹

Las nanopartículas de metales de transición, como oro y plata, usualmente exhiben una banda de extinción en la región visible del espectro electromagnético.

Introducción

Esta banda espectral observada es consecuencia del fenómeno denominado resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés).²⁰⁰ Cuando una nanopartícula pequeña es irradiada con luz el campo eléctrico produce la oscilación coherente de los electrones de conducción del metal (Figura 1.10.). Esta oscilación colectiva de los electrones superficiales de una partícula metálica es característica de cada tipo de átomo y se conoce como plasmón de resonancia dipolar.²⁰¹ Como consecuencia de este fenómeno, las AuNP y AgNP presentan coloraciones intensas, mientras que las de Pb, In, Hg, Sn y Cd presentan absorciones del plasmón en la región UV del espectro y no son coloreadas.²⁰²

Generalmente, la frecuencia de esta oscilación plasmónica depende de cuatro factores: (1) la densidad electrónica, (2) la masa efectiva de los electrones, y (3) la forma y tamaño de la distribución de carga, que a su vez están influenciados por el tamaño y la forma de la partícula y el entorno fisicoquímico de la misma.^{201,203}

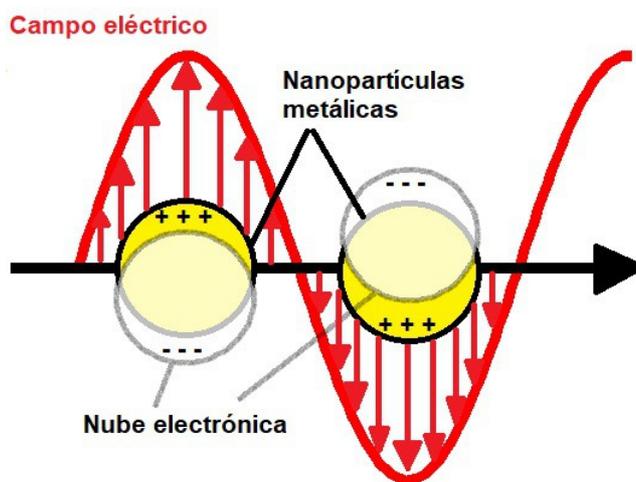


Figura 1.10. Representación esquemática de la oscilación plasmónica de una partícula esférica, mostrando el desplazamiento relativo de la nube electrónica respecto del núcleo. Adaptado de la Ref. 201.

Respecto de la influencia del tamaño de las partículas sobre la SPR, existen efectos extrínsecos e intrínsecos. El efecto de tamaño extrínseco es un efecto de retardo debido a la excitación de modos plasmónicos multipolares que surgen cuando el tamaño de una NP aumenta respecto de la longitud de onda de la radiación

electromagnética resonante, es decir, cuando el diámetro de la partícula $d \approx \lambda$. Cuando el tamaño de la partícula es mucho menor a la longitud de onda de la luz, la distribución del campo eléctrico incidente a lo largo de la partícula es uniforme, por lo que la oscilación electrónica producida es coherente y el plasmón de resonancia es dipolar. Lo opuesto sucede cuando los tamaños son comparables a la longitud de onda resonante, produciendo ensanchamientos de las bandas de extinción de las NP y corrimientos batocrómicos de los máximos a mayores tamaños de partícula.²⁰⁴ Por su parte, el efecto de tamaño intrínseco se debe principalmente a la modificación que experimentan las constantes ópticas del metal cuando se reduce su tamaño, como consecuencia de contribuciones adicionales a la tasa de relajación de los electrones libres. Cuando el camino libre medio de los electrones de conducción se vuelven comparables al tamaño de la partícula, ya no se puede despreciar la dispersión de los electrones libres a nivel de la superficie. Por lo tanto, estos efectos intrínsecos son responsables del incremento de la frecuencia de relajación dependiente del tamaño de los electrones superficiales y, consecuentemente, una disminución del factor de calidad plasmónico, lo que se manifiesta como una amortiguación (o *damping*) de la banda SPR a medida que disminuye el tamaño de la partícula.²⁰⁴

La forma de las partículas también afecta la posición, ancho y número de bandas SPR. Mientras que las partículas esféricas solo presentan una sola banda SPR, en nanopartículas con morfologías anisotrópicas, como nanovarillas por ejemplo, se observan dos bandas de extinción en los espectros UV-visible (Figura 1.11.). Estas bandas corresponden a dos modos plasmónicos, análogos a lo comentado para partículas esféricas (Figura 1.10.), que se denominan resonancia de plasmón longitudinal (LSPR, por sus siglas en inglés), relacionada con la oscilación colectiva de electrones a lo largo de la nanopartícula, y resonancia de plasmón transversal (TSPR), originada por la oscilación de electrones a lo ancho de la nanoestructura. La posición de las bandas de la LSPR y la TSPR puede ajustarse con mucha precisión mediante el control de la relación de aspecto de las nanovarillas.^{205,206} Por ejemplo, Rehka *et al.* observaron que a medida que el largo de las nanovarillas se incrementaba (o las relaciones de aspecto), se producía un corrimiento batocrómico

Introducción

de la banda LSPR (Figura 1.11.).²⁰⁷ En términos generales, al disminuir la simetría de la partícula comienzan a surgir nuevos modos plasmónicos.²⁰⁸

Como se mencionó anteriormente, el entorno fisicoquímico que rodea las nanopartículas también influye sobre la frecuencia de la SPR. Respecto de los efectos químicos, el principal mecanismo involucrado corresponde al *damping* de la interfaz química.^{204,209} Este mecanismo involucra la interacción superficial por quimisorción o fisisorción de la nanopartícula con diferentes especies químicas, según corresponda, y produce un ensanchamiento de la banda SPR y un corrimiento batocrómico del máximo de extinción. Este efecto se puede explicar considerando que los adsorbatos ofrecen nueva vías de relajación tanto para los electrones como para los fonones excitados en el metal. Cálculos mediante la teoría del funcional de densidad (DFT)²⁰⁹ demostraron que los estados de densidad electrónicos cerca del nivel de Fermi de la NP cambian en presencia de adsorbatos dando lugar a diferentes anchos y posiciones de la banda SPR.

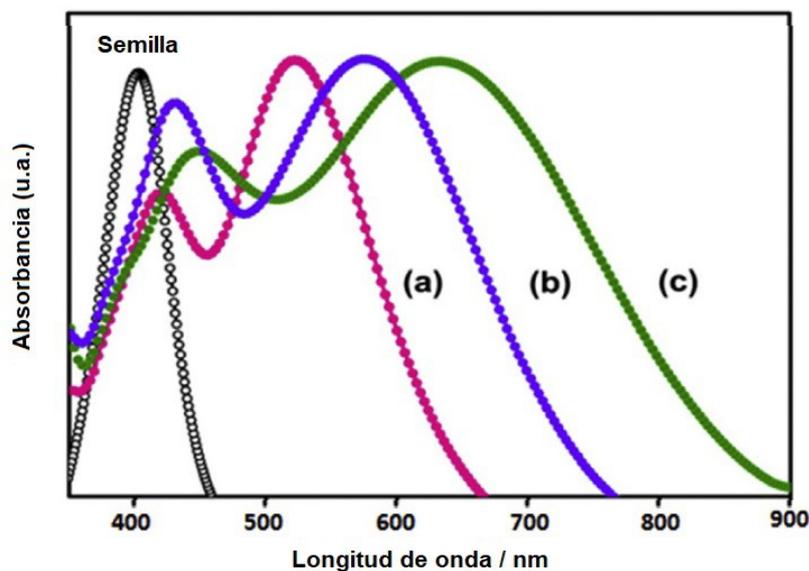


Figura 1.11. Espectros de absorción de nanovarillas de plata con relaciones de aspecto: (a) 6, (b) 11, y (c) 15. Adaptado de la Ref. 205.

Por otra parte, las propiedades dieléctricas del medio (ϵ_m) que rodea la nanopartícula es otro factor a tener en cuenta. En este sentido, se ha observado que la

variación de la constante dieléctrica de un entorno no absorbente produce variaciones en la posición de la banda SPR, con corrimientos hacia el rojo a mayores constantes dieléctricas del medio, y corrimientos hacia el azul cuando ϵ_m disminuye.²¹⁰ Este comportamiento está relacionado con la variación de la sección eficaz de extinción de una partícula metálica con el cambio de la función dieléctrica del medio.²¹¹

1.3. Caracterización de nanopartículas metálicas

Como se ha discutido en las secciones anteriores, las nanoestructuras han atraído un enorme interés por sus variadas e importantes propiedades y potenciales aplicaciones. El entendimiento de los factores que afectan estas propiedades requiere que los nanomateriales sean objeto de numerosos estudios enfocados en la determinación de sus características físicas y químicas, a fin de poder correlacionarlas con respuestas específicas de la nanoestructura.⁶

Actualmente existen múltiples técnicas de caracterización disponibles, entre las que se incluyen a aquellas que emplean haces de electrones como fuente de iluminación, como es el caso del TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión) y del SEM (Microscopio Electrónico de Barrido). A lo largo de los años, los avances científico-tecnológicos han permitido actualizar dichas metodologías para lograr una caracterización más completa de los NM. Estas innovaciones permitieron desarrollar el microscopio electrónico de alta resolución (HRTEM), que permite evaluar la composición cristalográfica del material,²¹² y el TEM de fase líquida, que permite estudiar el crecimiento dinámico y oscilatorio de nanopartículas.²¹³ Usualmente, estas metodologías de visualización pueden estar acopladas a distintos métodos espectroscópicos de alta energía 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), para obtener simultáneamente información sobre la estructura electrónica, la composición química elemental y el estado de oxidación superficial de los nanomateriales.^{214,215} Por otro lado, es muy común la

utilización de técnicas espectroscópicas más tradicionales, que permiten completar la caracterización de las NP, como las espectroscopias de absorción UV-visible y de Infrarrojo cercano (NIR), FT-IR (Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier), RMN (Resonancia Magnética Nuclear), espectroscopia Raman, etc. Estas técnicas facilitan el estudio integral de los nanomateriales sintéticos, y nos proveen la información necesaria para describir sus propiedades fisicoquímicas.¹⁹⁹ A continuación, se describirán algunas generalidades de las metodologías empleadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

1.3.1. Técnicas microscópicas

Las técnicas microscópicas son las más empleadas durante la caracterización de un nanomaterial, ya que permiten obtener una imagen superficial de la muestra. La microscopía electrónica 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.¹⁹⁹

La microscopía TEM es la técnica más común para analizar el tamaño y la morfología de las NP y se basa en la interacción entre un haz de electrones uniforme (con energías alrededor de 60 a 150 keV) con una muestra delgada. Cuando los electrones llegan a la muestra, una parte es transmitida, mientras que el resto es dispersado elástica o inelásticamente.²¹⁶ A partir de los electrones transmitidos, se puede construir una imagen del nanomaterial analizado. TEM no solo ofrece imágenes de la muestra, sino que también da idea de su homogeneidad.⁶ 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.⁶ Las muestras que pueden analizarse por esta técnica deben ser estables en condiciones de alto vacío y lo suficientemente delgadas para que el haz de electrones pueda atravesarlas.²¹⁷

Por su parte, la microscopía SEM es una técnica utilizada ampliamente para la obtención de imágenes de alta resolución de superficies que puede ser empleada en la caracterización de materiales en la nanoescala. La técnica SEM permite obtener información referida a la topografía superficial de las muestras, a la morfología, tamaño y ordenamiento de las partículas, la composición química si el microscopio está acoplado a otros detectores que permitan caracterización elemental, e información cristalográfica.⁴ A diferencia de TEM, la microscopía de barrido se vale de los electrones secundarios emitidos al interaccionar el haz incidente con la superficie de la muestra.¹⁹⁹ Las muestras para SEM pueden analizarse en su forma macroscópica, 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 por lo que 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.¹⁹⁹

1.3.2. Técnicas espectroscópicas

La espectroscopia estudia la interacción de la materia con la radiación electromagnética. La absorción, transmisión y dispersión de la luz son los procesos en los que se basan las diferentes técnicas de caracterización espectroscópica. La absorción de luz en el espectro UV-visible (UV-vis) es un método espectroscópico muy utilizado para detectar la presencia de cromóforos en pequeñas moléculas y macromoléculas. Anteriormente, se describieron las propiedades ópticas de los NM, mencionando que las mismas son particularmente sensibles a variaciones de forma, tamaño, y del microambiente que rodea al nanomaterial. Como se mencionó anteriormente, la interacción entre NP y la radiación electromagnética da lugar al fenómeno SPR. Las bandas SPR permiten caracterizar las NP mediante espectroscopia UV-visible.²¹⁸ La posición (longitud de onda) de la banda SPR de una NP, su intensidad y el ancho de la banda, brindan importante información a partir de

la cual es posible inferir algunas propiedades de las NP, como su forma, tamaño e incluso si el nanomaterial a experimentado alguna transformación física, como la agregación (que permite estudiar la estabilidad coloidal), o química, como la modificación de los ligandos superficiales. En la figura 1.12. se muestra como las variaciones del tamaño y forma de nanopartículas de plata producen variación del color de la muestra coloidal y, por lo tanto, del espectro UV-visible observado.²¹⁹

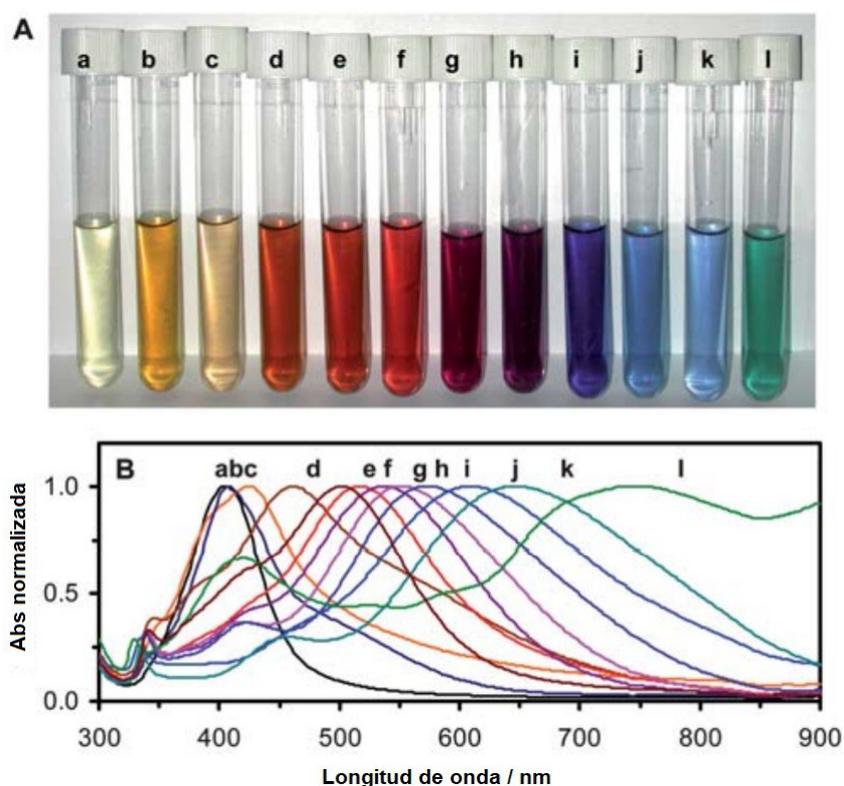


Figura 1.12. A) Fotos de coloides de AgNP de diferente coloración con diferentes tamaños y formas. **B)** Espectros UV-visible de absorbanza normalizada de las muestras presentadas en A. Adaptado de la Ref. 216.

Las ventajas de esta técnica incluyen la simplicidad y rapidez de las mediciones, la selectividad hacia nanopartículas en ausencia de otros compuestos que absorban luz en la región de la SPR, la sensibilidad, y su bajo costo. La preparación de las muestras es simple y consiste en diluir suspensiones coloidales de las NP a analizar y efectuar la medición en el rango de longitudes de onda seleccionado.

1.3.3. Técnicas de dispersión

Las técnicas de dispersión son muy variadas, y dependen de la fuente de radiación utilizada (rayos X, neutrones, electrones, luz visible, etc.). Dentro de ellas se pueden mencionar la dispersión dinámica de luz (DLS), el potencial zeta (ζ), 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.¹⁹⁹ A continuación, solo se describirán las técnicas DLS y potencial zeta.

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, y su distribución, en solución en la escala nano- y submicrométrica.¹⁹⁹ Las NP en una dispersión coloidal están sujetas a un continuo movimiento browniano, que ocurre más lentamente para partículas de mayor tamaño. DLS mide la dispersión de un haz laser (fuente monocromática y coherente de radiación) ocasionada por las NP en movimiento como una función del tiempo, a partir de lo que se puede determinar el tamaño hidrodinámico de las mismas, es decir, del diámetro de la nanopartícula junto a la contribución de las moléculas de solvente y ligandos que difunden a la misma velocidad que el coloide.⁶ Por lo tanto, el tamaño de las NP medido por DLS suele ser ligeramente más grande que el determinado por microscopía electrónica. Por otro lado, DLS tiene mucho potencial para el análisis de los procesos de agregación de sistemas nanoparticulados en tiempo real, ya que mide cuantitativamente el tamaño de los agregados de partículas formados. DLS como método de caracterización ofrece varias ventajas, la capacidad de determinar con alta exactitud el tamaño hidrodinámico de muestras monodispersas, medir muestras a bajas concentraciones, permitir el análisis de muestras en un amplio rango de concentraciones, y la capacidad de obtener mediciones reproducibles en tiempos cortos (minutos) a comparación de otras metodologías, y con bajos costos.¹⁹⁹

1.3.3.2. Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta corresponde al potencial electrocinético de un sistema coloidal.¹⁹⁹ En una dispersión coloidal las NP se encuentran rodeadas de una doble capa eléctrica: una capa interna o *capa compacta* donde los iones están fuertemente unidos a la superficie, y una capa externa o *capa difusa*, en la cual los iones interactúan más débilmente. En la región difusa, existe un cierto límite dentro del cual la partícula actúa como una entidad única, y el potencial eléctrico en este límite es el potencial zeta. 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.¹⁹⁹

La magnitud del potencial zeta puede relacionarse con la estabilidad coloidal del sistema, debido a que este potencial indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes con la misma carga en la dispersión coloidal. Un valor alto de potencial zeta (en valor absoluto) indica mayor resistencia a la floculación en solución. Cuando el módulo del potencial es bajo, la atracción excede la repulsión y las nanopartículas tenderán a flocular.⁶ En general, sistemas coloidales con potenciales zeta en el rango de 20-30 mV o mayores, son considerados cinéticamente estables.⁶ Esta propiedad puede ser manipulada mediante la modificación superficial de las NP, ya que se puede obtener una alta estabilidad coloidal a través de repulsión electrostática. Usualmente, el potencial zeta se determina simultáneamente con mediciones de DLS para una caracterización más completa. A su vez, ζ es sensible a cambios en el ambiente de la partícula, como el pH o la fuerza iónica, por lo que hay que prestar especial atención a la preparación de las muestras. A comparación de otras metodologías, el potencial zeta tiene la ventaja de medirse en solución, por lo que normalmente no se exponen las muestras a condiciones que pueden conducir a la agregación por evaporación del solvente, lo que sí sucede en microscopía electrónica.²²⁰

1.4. Observaciones finales

A lo largo de este capítulo se han introducido algunos conceptos generales que resultan necesarios para la comprensión del trabajo de tesis, que será presentado metódicamente en los capítulos subsiguientes. Fundamentalmente, se presentó información respecto de los nanomateriales sintéticos, que constituyen el eje central del trabajo realizado. Los nanomateriales fueron descritos desde las metodologías de síntesis hasta sus aplicaciones, exponiendo también brevemente sus características principales, propiedades y métodos de caracterización. Además, se ha presentado brevemente la situación actual referida a la utilización de nanomateriales sintéticos y su destino final como desechos y contaminantes emergentes. Si bien en los últimos años se han desarrollado métodos analíticos para estos analitos especiales, aún queda mucho camino por recorrer.

1.5. Referencias

- (1) ISO. ISO/TS 27687:2008 <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/04/42/44278.html> (accessed 2021 -07 -18).
- (2) Hornyak, G. L.; Dutta, J.; Tibbals, H. F.; Rao, A. *Introduction to Nanoscience*; CRC Press: Boca Raton, 2012. <https://doi.org/10.1201/b12835>.
- (3) Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>.
- (4) Murty, B. S.; Shankar, P.; Raj, B.; Rath, B. B.; Murday, J. *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-28030-6>.
- (5) Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1857**, *14*, 145–181.
- (6) Mourdikoudis, S.; Pallares, R. M.; Thanh, N. T. K. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale* **2018**, *10* (27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>.
- (7) Michael Faraday's gold colloids <https://www.rigb.org/our-history/iconic-objects/iconic-objects-list/faraday-gold-colloids> (accessed 2021 -10 -28).
- (8) 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.* **2008**, *108* (2),

- 494–521. <https://doi.org/10.1021/cr068126n>.
- (9) He, X.; Xue, J.; Shi, L.; Kong, Y.; Zhan, Q.; Sun, Y.; Zhang, Q.; Ramakrishna, S.; Dai, Y. Recent Antioxidative Nanomaterials toward Wound Dressing and Disease Treatment via ROS Scavenging. *Mater. Today Nano* **2021**, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2021.100149>.
- (10) Kailasa, S. K.; Vajubhai, G. N.; Koduru, J. R.; Park, T. J.; Hussain, C. M. Recent Progress on the Modifications of Ultra-Small Perovskite Nanomaterials for Sensing Applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, 144, 116432. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116432>.
- (11) Dindar, C. K.; Erkmen, C.; Uslu, B. Electroanalytical Methods Based on Bimetallic Nanomaterials for Determination of Pesticides: Past, Present, and Future. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2021**, 32, e00145. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00145>.
- (12) Ang, M. J. Y.; Chan, S. Y.; Goh, Y.-Y.; Luo, Z.; Lau, J. W.; Liu, X. Emerging Strategies in Developing Multifunctional Nanomaterials for Cancer Nanotheranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, 178, 113907. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113907>.
- (13) Dey, A.; Pandey, G.; Rawtani, D. Functionalized Nanomaterials Driven Antimicrobial Food Packaging: A Technological Advancement in Food Science. *Food Control* **2022**, 131, 108469. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108469>.
- (14) Gabris, M. A.; Ping, J. Carbon Nanomaterial-Based Nanogenerators for Harvesting Energy from Environment. *Nano Energy* **2021**, 90, 106494. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2021.106494>.
- (15) Wu, L.; Dong, Y. Recent Progress of Carbon Nanomaterials for High-Performance Cathodes and Anodes in Aqueous Zinc Ion Batteries. *Energy Storage Mater.* **2021**, 41, 715–737. <https://doi.org/10.1016/j.ensm.2021.07.004>.
- (16) Sayyed, A. J.; Pinjari, D. V.; Sonawane, S. H.; Bhanvase, B. A.; Sheikh, J.; Sillanpää, M. Cellulose-Based Nanomaterials for Water and Wastewater Treatments: A Review. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, 9 (6), 106626. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106626>.
- (17) Liu, D.; Gu, W.; Zhou, L.; Wang, L.; Zhang, J.; Liu, Y.; Lei, J. Recent Advances in MOF-Derived Carbon-Based Nanomaterials for Environmental Applications in Adsorption and Catalytic Degradation. *Chem. Eng. J.* **2022**, 427, 131503. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131503>.
- (18) Murali, A.; Lokhande, G.; Deo, K. A.; Brokesh, A.; Gaharwar, A. K. Emerging 2D Nanomaterials for Biomedical Applications. *Mater. Today* **2021**, S1369702121001528. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2021.04.020>.
- (19) Gottardo, S.; Mech, A.; Drbohlavová, J.; Małyska, A.; Bøwadt, S.; Riego Sintes, J.; Rauscher, H. Towards Safe and Sustainable Innovation in Nanotechnology: State-of-Play for Smart Nanomaterials. *NanoImpact* **2021**, 21, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100297>.
- (20) Salvioni, L.; Morelli, L.; Ochoa, E.; Labra, M.; Fiandra, L.; Palugan, L.; Prosperi,

- D.; Colombo, M. The Emerging Role of Nanotechnology in Skincare. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *293*, 102437. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102437>.
- (21) Project of Emerging Nanotechnologies. Consumer Product Information <http://www.nanotechproject.tech/cpi/> (accessed 2021-10-28).
- (22) Vance, M. E.; Kuiken, T.; Vejerano, E. P.; McGinnis, S. P.; Hochella, M. F.; Rejeski, D.; Hull, M. S. Nanotechnology in the Real World: Redeveloping the Nanomaterial Consumer Products Inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.
- (23) The Nanodatabase <https://nanodb.dk/> (accessed 2021-10-28).
- (24) Foss Hansen, S.; Heggelund, L. R.; Revilla Besora, P.; Mackevica, A.; Boldrin, A.; Baun, A. Nanoproducts – What Is Actually Available to European Consumers? *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (1), 169–180. <https://doi.org/10.1039/C5EN00182J>.
- (25) Gubitosa, J.; Rizzi, V.; Fini, P.; Cosma, P. Nanomaterials in Sun-Care Products. In *Nanocosmetics*; Elsevier, 2020; pp 349–373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822286-7.00022-X>.
- (26) Chaki Borrás, M.; Sluyter, R.; Barker, P. J.; Konstantinov, K.; Bakand, S. Y₂O₃ Decorated TiO₂ Nanoparticles: Enhanced UV Attenuation and Suppressed Photocatalytic Activity with Promise for Cosmetic and Sunscreen Applications. *J. Photochem. Photobiol. B* **2020**, *207*, 111883. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111883>.
- (27) Shende, P.; Patel, D.; Takke, A. Nanomaterial-Based Cosmeceuticals. In *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*; Elsevier, 2020; pp 775–791. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816787-8.00024-7>.
- (28) Singh, S.; Pandey, S. K.; Vishwakarma, N. Functional Nanomaterials for the Cosmetics Industry. In *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications*; Elsevier, 2020; pp 717–730. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816787-8.00022-3>.
- (29) Roopashree, S.; Anitha, J.; Rashmi, S. Advent of Nanomaterial in Modern Health Science and Ayurveda. *Mater. Today Proc.* **2021**, *46*, 9096–9101. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.397>.
- (30) Wang, M.; Huang, X.; Zheng, H.; Tang, Y.; Zeng, K.; Shao, L.; Li, L. Nanomaterials Applied in Wound Healing: Mechanisms, Limitations and Perspectives. *J. Controlled Release* **2021**, *337*, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.017>.
- (31) Tu, X.; Xu, H.; Li, C.; Liu, X.; Fan, G.; Sun, W. Adsorption Performance of Boron Nitride Nanomaterials as Effective Drug Delivery Carriers for Anticancer Drugs Based on Density Functional Theory. *Comput. Theor. Chem.* **2021**, *1203*, 113360. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2021.113360>.
- (32) Khorsandi, Z.; Borjian-Boroujeni, M.; Yekani, R.; Varma, R. S. Carbon Nanomaterials with Chitosan: A Winning Combination for Drug Delivery Systems. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, 102847.

- <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102847>.
- (33) Dutta, B.; Barick, K. C.; Hassan, P. A. Recent Advances in Active Targeting of Nanomaterials for Anticancer Drug Delivery. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *296*, 102509. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102509>.
- (34) Majeed, M.; Hakeem, K. R.; Rehman, R. U. Synergistic Effect of Plant Extract Coupled Silver Nanoparticles in Various Therapeutic Applications- Present Insights and Bottlenecks. *Chemosphere* **2022**, *288*, 132527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132527>.
- (35) Ma, Z.; Liu, J.; Liu, Y.; Zheng, X.; Tang, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Soluble Soybean Polysaccharide and Their Application in Antibacterial Coatings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *166*, 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.214>.
- (36) Yang, Y.; Ding, Y.; Fan, Y.; Ren, L.; Tang, X.; Meng, X. Application of Silver Nanoparticles in Situ Synthesized in Dental Adhesive Resin. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2021**, *108*, 102890. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2021.102890>.
- (37) Gaviria, J.; Alcudia, A.; Begines, B.; Beltrán, A. M.; Villarraga, J.; Moriche, R.; Rodríguez-Ortiz, J. A.; Torres, Y. Synthesis and Deposition of Silver Nanoparticles on Porous Titanium Substrates for Biomedical Applications. *Surf. Coat. Technol.* **2021**, *406*, 126667. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.126667>.
- (38) Poon, T. K. C.; Iyengar, K. P.; Jain, V. K. Silver Nanoparticle (AgNP) Technology Applications in Trauma and Orthopaedics. *J. Clin. Orthop. Trauma* **2021**, *21*, 101536. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2021.101536>.
- (39) Gul, H.; Khan, F. S.; Afzal, U.; Batool, S.; Saddick, S.; Awais, M.; Irum, S.; Malik, M. Y.; Ijaz Khan, M.; Alhazmi, A.; Khan, S. U. Rumex Hastatus Derived Silver Nanoparticles Development and Their Potential Applications as Hepatic-Protection Agent along with Antimicrobial Activity. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2021**, *33* (7), 101587. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101587>.
- (40) Atacan, K.; Güy, N.; Ozmen, M.; Özacar, M. Fabrication of Silver Doped Different Metal Oxide Nanoparticles and Evaluation of Their Antibacterial and Catalytic Applications. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **2021**, *6*, 100156. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2021.100156>.
- (41) Narciso, A. M.; da Rosa, C. G.; Nunes, M. R.; Sganzerla, W. G.; Hansen, C. M.; de Melo, A. P. Z.; Paes, J. V.; Bertoldi, F. C.; Barreto, P. L. M.; Masiero, A. V. Antimicrobial Green Silver Nanoparticles in Bone Grafts Functionalization for Biomedical Applications. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, *35*, 102074. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102074>.
- (42) Nikolopoulou, S. G.; Boukos, N.; Sakellis, E.; Efthimiadou, E. K. Synthesis of Biocompatible Silver Nanoparticles by a Modified Polyol Method for Theranostic Applications: Studies on Red Blood Cells, Internalization Ability and Antibacterial Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *211*, 111177. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111177>.
- (43) Das, P.; Dutta, T.; Manna, S.; Loganathan, S.; Basak, P. Facile Green Synthesis of Non-Genotoxic, Non-Hemolytic Organometallic Silver Nanoparticles Using

- Extract of Crushed, Wasted, and Spent *Humulus Lupulus* (Hops): Characterization, Anti-Bacterial, and Anti-Cancer Studies. *Environ. Res.* **2022**, *204*, 111962. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111962>.
- (44) Balan, L.; Chandrasekaran, S.; Gajendiran, M.; Nanjian, R. Synthesis of Silver Nanoparticles from *Petalium Murex* L. and Its Antiproliferative Activity against Breast Cancer (MCF-7) Cells. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1242*, 130695. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130695>.
- (45) Adel, A. M.; Al-Shemy, M. T.; Diab, M. A.; El-Sakhawy, M.; Toro, R. G.; Montanari, R.; de Caro, T.; Caschera, D. Fabrication of Packaging Paper Sheets Decorated with Alginate/Oxidized Nanocellulose-silver Nanoparticles Bio-Nanocomposite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *181*, 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.182>.
- (46) Zhao, X.; Wang, K.; Ai, C.; Yan, L.; Jiang, C.; Shi, J. Improvement of Antifungal and Antibacterial Activities of Food Packages Using Silver Nanoparticles Synthesized by Iturin A. *Food Packag. Shelf Life* **2021**, *28*, 100669. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100669>.
- (47) Hasan, K. M. F.; Horváth, P. G.; Horváth, A.; Alpár, T. Coloration of Woven Glass Fabric Using Biosynthesized Silver Nanoparticles from *Fraxinus Excelsior* Tree Flower. *Inorg. Chem. Commun.* **2021**, *126*, 108477. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108477>.
- (48) Abdelghaffar, F.; Mahmoud, M. G.; Asker, M. S.; Mohamed, S. S. Facile Green Silver Nanoparticles Synthesis to Promote the Antibacterial Activity of Cellulosic Fabric. *J. Ind. Eng. Chem.* **2021**, *99*, 224–234. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.04.030>.
- (49) Veeraraghavan, V. P.; Periadurai, N. D.; Karunakaran, T.; Hussain, S.; Surapaneni, K. M.; Jiao, X. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Aqueous Extract of *Scutellaria Barbata* and Coating on the Cotton Fabric for Antimicrobial Applications and Wound Healing Activity in Fibroblast Cells (L929). *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28* (7), 3633–3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.007>.
- (50) Kumar, A.; Nath, K.; Parekh, Y.; Enayathullah, M. G.; Bokara, K. K.; Sinhamahapatra, A. Antimicrobial Silver Nanoparticle-Photodeposited Fabrics for SARS-Cov-2 Destruction. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2021**, 100542. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100542>.
- (51) Wang, X.; Yan, H.; Hang, R.; Shi, H.; Wang, L.; Ma, J.; Liu, X.; Yao, X. Enhanced Anticorrosive and Antibacterial Performances of Silver Nanoparticles/Polyethyleneimine/MAO Composite Coating on Magnesium Alloys. *J. Mater. Res. Technol.* **2021**, *11*, 2354–2364. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.02.053>.
- (52) Giraldo Mejía, H. F.; Herrera Seitz, K.; Valdés, M.; Uheida, A.; Procaccini, R. A.; Pellice, S. A. Antibacterial Performance of Hybrid Nanocomposite Coatings Containing Clay and Silver Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, *628*, 127354. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127354>.
- (53) Ali Asaad, M.; Bothi Raja, P.; Fahim Huseien, G.; Fediuk, R.; Ismail, M.;

- Alyousef, R. Self-Healing Epoxy Coating Doped with *Elaeisis Guineensis*/Silver Nanoparticles: A Robust Corrosion Inhibitor. *Constr. Build. Mater.* **2021**, *312*, 125396. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.125396>.
- (54) Jiang, H.; Tang, C.; Wang, Y.; Mao, L.; Sun, Q.; Zhang, L.; Song, H.; Huang, F.; Zuo, C. Low Content and Low-Temperature Cured Silver Nanoparticles/Silver Ion Composite Ink for Flexible Electronic Applications with Robust Mechanical Performance. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *564*, 150447. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.150447>.
- (55) Natsuki, J.; Abe, T. Synthesis of Pure Colloidal Silver Nanoparticles with High Electroconductivity for Printed Electronic Circuits: The Effect of Amines on Their Formation in Aqueous Media. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *359* (1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.079>.
- (56) Salabat, A.; Mirhoseini, F. A Novel and Simple Microemulsion Method for Synthesis of Biocompatible Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **2018**, *268*, 849–853. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.112>.
- (57) Kadhim, R. J.; Karsh, E. H.; Taqi, Z. J.; Jabir, M. S. Biocompatibility of Gold Nanoparticles: In-Vitro and In-Vivo Study. *Mater. Today Proc.* **2021**, *42*, 3041–3045. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.826>.
- (58) Chellapandian, C.; Ramkumar, B.; Puja, P.; Shanmuganathan, R.; Pugazhendhi, A.; Kumar, P. Gold Nanoparticles Using Red Seaweed *Gracilaria Verrucosa*: Green Synthesis, Characterization and Biocompatibility Studies. *Process Biochem.* **2019**, *80*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.009>.
- (59) Ozcicek, I.; Aysit, N.; Cakici, C.; Aydeger, A. The Effects of Surface Functionality and Size of Gold Nanoparticles on Neuronal Toxicity, Apoptosis, ROS Production and Cellular/Suborgan Biodistribution. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *128*, 112308. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112308>.
- (60) Samani, M. T.; Hashemianzadeh, S. M. The Effect of Functionalization on Solubility and Plasmonic Features of Gold Nanoparticles. *J. Mol. Graph. Model.* **2020**, *101*, 107749. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107749>.
- (61) Liu, H.; Yu, J.; Liu, Y.; Liu, Y. Plasmonic Acceleration of Nitrophenol Reduction upon Catalysis by Robust Gold Nanoparticle Donut Assemblies. *Catal. Commun.* **2020**, *146*, 106137. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2020.106137>.
- (62) Tan, X.; Xu, Y.; Lin, S.; Dai, G.; Zhang, X.; Xia, F.; Dai, Y. Peptide-Anchored Gold Nanoparticles with Bicatlytic Sites for Photo-Switchable Cascade Catalysis. *J. Catal.* **2021**, *402*, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2021.08.023>.
- (63) Mishra, B.; Kumar, A.; Tripathi, B. P. Polydopamine Mediated in Situ Synthesis of Highly Dispersed Gold Nanoparticles for Continuous Flow Catalysis and Environmental Remediation. *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8* (5), 104397. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104397>.
- (64) Poupard, R.; Guerrouache, M.; Grande, D.; Le Droumaguet, B.; Carbonnier, B. Gold Nanoparticles Supported onto Amine-Functionalized in-Capillary Monoliths Meant for Flow-through Catalysis: A Comparative Study. *Polymer* **2021**, *230*, 124014. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124014>.

- (65) Zhao, Y.; Jia, R.; Liu, Y.; Shen, X.; Wang, H.; Yuan, L. Specific Photothermal Killing of Cancer Cells by RNase-Conjugated Glyco-Gold Nanoparticles. *Mater. Today Commun.* **2021**, *28*, 102640. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102640>.
- (66) Essa, N.; O'Connell, F.; Prina-Mello, A.; O'Sullivan, J.; Marcone, S. Gold Nanoparticles and Obese Adipose Tissue Microenvironment in Cancer Treatment. *Cancer Lett.* **2022**, *525*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.10.017>.
- (67) Virgili, A. H.; Laranja, D. C.; Malheiros, P. S.; Pereira, M. B.; Costa, T. M. H.; de Menezes, E. W. Nanocomposite Film with Antimicrobial Activity Based on Gold Nanoparticles, Chitosan and Aminopropylsilane. *Surf. Coat. Technol.* **2021**, *415*, 127086. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2021.127086>.
- (68) Varghese, B. A.; Nair, R. V. R.; Jude, S.; Varma, K.; Amalraj, A.; Kuttappan, S. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using Kaempferia Parviflora Rhizome Extract and Their Characterization and Application as an Antimicrobial, Antioxidant and Catalytic Degradation Agent. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2021**, *126*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.07.016>.
- (69) Chen, L.; Liu, J.; Cao, C.; Tang, S.; Lv, C.; Xiao, X.; Yang, S.; Liu, L.; Sun, L.; Zhu, B.; Li, L. Dual-Signal Amplification Electrochemical Sensing for the Sensitive Detection of Uranyl Ion Based on Gold Nanoparticles and Hybridization Chain Reaction-Assisted Synthesis of Silver Nanoclusters. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1184*, 338986. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338986>.
- (70) Cai, Z.; Goo, E.; Park, S. Synthesis of Tin Dioxide (SnO₂) Hollow Nanospheres and Its Ethanol-Sensing Performance Augmented by Gold Nanoparticle Decoration. *J. Alloys Compd.* **2021**, *883*, 160868. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.160868>.
- (71) Zou, L.; Mai, C.; Li, M.; Lai, Y. Smartphone-Assisted Colorimetric Sensing of Enzyme-Substrate System Using PH-Responsive Gold Nanoparticle Assembly. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1178*, 338804. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338804>.
- (72) EPA. Technical Fact Sheet – Nanomaterials. **2017**. https://doi.org/www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf.
- (73) Howard, A. G. On the Challenge of Quantifying Man-Made Nanoparticles in the Aquatic Environment. *J. Env. Monit* **2010**, *12* (1), 135–142. <https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- (74) You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7840–7892. <https://doi.org/10.1021/cr5005524>.
- (75) Advanced Environmental Analysis. In *Detection Science*; Hussain, C. M., Kharisov, B., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; Vol. 2, pp P001–P004. <https://doi.org/10.1039/9781782629139-FP001>.
- (76) 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* **2016**, *904*, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
- (77) Lowry, G. V.; Gregory, K. B.; Apte, S. C.; Lead, J. R. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (13), 6893–6899. <https://doi.org/10.1021/es300839e>.
- (78) Kühnel, D.; Nickel, C. The OECD Expert Meeting on Ecotoxicology and Environmental Fate – Towards the Development of Improved OECD Guidelines for the Testing of Nanomaterials. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.055>.
- (79) Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, Eighth edition.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, 2013.
- (80) Gardiner, W. P.; Gettinby, G. *Experimental Design Techniques in Statistical Practice: A Practical Software-Based Approach*; Horwood series in mathematics & applications; Horwood Pub: Chichester, W. Sussex, England, 1998.
- (81) Wang, H.-C.; Wu, C.-Y.; Chung, C.-C.; Lai, M.-H.; Chung, T.-W. Analysis of Parameters and Interaction between Parameters in Preparation of Uniform Silicon Dioxide Nanoparticles Using Response Surface Methodology. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45* (24), 8043–8048. <https://doi.org/10.1021/ie060299f>.
- (82) Eising, R.; Signori, A. M.; Fort, S.; Domingos, J. B. Development of Catalytically Active Silver Colloid Nanoparticles Stabilized by Dextran. *Langmuir* **2011**, *27* (19), 11860–11866. <https://doi.org/10.1021/la2029164>.
- (83) Núñez, R. N.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. Improving Reproducibility between Batches of Silver Nanoparticles Using an Experimental Design Approach. *Microchem. J.* **2018**, *141*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.017>.
- (84) Ke, L.; Yang, D.; Gao, G.; Wang, H.; Yu, Z.; Rao, P.; Zhou, J.; Wang, Q. Rapid Separation and Quantification of Self-Assembled Nanoparticles from a Liquid Food System by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126579>.
- (85) Oszwałdowski, S. Capillary Electrophoresis Study on Segment/Segment System and Its Role in Characterization of Nanoparticles. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1601*, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.049>.
- (86) Mudalige, T. K.; Qu, H.; Van Haute, D.; Ansar, S. M.; Linder, S. W. Capillary Electrophoresis and Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation for Size-Based Separation of Engineered Metallic Nanoparticles: A Critical Comparative Review. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *106*, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.008>.
- (87) Wang, M.; Chen, Z.; Jing, X.; Zhou, H.; Wang, Y.; Ye, J.; Chu, Q. Tween 20-Capped Gold Nanoparticles for Selective Extraction of Free Low-Molecular-Weight Thiols in Saliva Followed by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection. *J. Chromatogr. B* **2021**, *1176*, 122756.

- <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122756>.
- (88) Wimmer, A.; Urstoeger, A.; Hinke, T.; Aust, M.; Altmann, P. J.; Schuster, M. Separating Dissolved Silver from Nanoparticulate Silver Is the Key: Improved Cloud-Point-Extraction Hyphenated to Single Particle ICP-MS for Comprehensive Analysis of Silver-Based Nanoparticles in Real Environmental Samples down to Single-Digit Nm Particle Sizes. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1150*, 238198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.01.001>.
- (89) Bahadir, Z.; Torrent, L.; Hidalgo, M.; Marguá, E. Simultaneous Determination of Silver and Gold Nanoparticles by Cloud Point Extraction and Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2018**, *149*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.07.016>.
- (90) Nazar, M. F.; Shah, S. S.; Eastoe, J.; Khan, A. M.; Shah, A. Separation and Recycling of Nanoparticles Using Cloud Point Extraction with Non-Ionic Surfactant Mixtures. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363* (2), 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.070>.
- (91) 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.* **2017**, *323*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.039>.
- (92) Kazemi, E.; Dadfarnia, S.; Haji Shabani, A. M.; Fattahi, M. R.; Khodaveisi, J. Indirect Spectrophotometric Determination of Sulfadiazine Based on Localized Surface Plasmon Resonance Peak of Silver Nanoparticles after Cloud Point Extraction. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *187*, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.023>.
- (93) 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* **2017**, *1511*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.064>.
- (94) Pitkänen, L.; Striegel, A. M. Size-Exclusion Chromatography of Metal Nanoparticles and Quantum Dots. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.013>.
- (95) Zhou, X.-X.; Liu, J.-F.; Geng, F.-L. Determination of Metal Oxide Nanoparticles and Their Ionic Counterparts in Environmental Waters by Size Exclusion Chromatography Coupled to ICP-MS. *NanoImpact* **2016**, *1*, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2016.02.002>.
- (96) Süß, S.; Metzger, C.; Damm, C.; Segets, D.; Peukert, W. Quantitative Evaluation of Nanoparticle Classification by Size-Exclusion Chromatography. *Powder Technol.* **2018**, *339*, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.008>.
- (97) Borovinskaya, O.; Gschwind, S.; Hattendorf, B.; Tanner, M.; Günther, D. Simultaneous Mass Quantification of Nanoparticles of Different Composition in a Mixture by Microdroplet Generator-ICPTOFMS. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (16), 8142–8148. <https://doi.org/10.1021/ac501150c>.

- (98) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the Analysis of Inorganic Engineered Nanoparticles in Environmental Samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001>.
- (99) Lum, J. T.-S.; Leung, K. S.-Y. Quantifying Silver Nanoparticle Association and Elemental Content in Single Cells Using Dual Mass Mode in Quadrupole-Based Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1061*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.042>.
- (100) Xu, L.; Wang, Z.; Zhao, J.; Lin, M.; Xing, B. Accumulation of Metal-Based Nanoparticles in Marine Bivalve Mollusks from Offshore Aquaculture as Detected by Single Particle ICP-MS. *Environ. Pollut.* **2020**, *260*, 114043. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114043>.
- (101) Bocca, B.; Battistini, B.; Petrucci, F. Silver and Gold Nanoparticles Characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALS-UV-ICP-MS in Human Samples Used for Biomonitoring. *Talanta* **2020**, *220*, 121404. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121404>.
- (102) Urstoeger, A.; Zacherl, L.; Muhr, M.; Selic, Y.; Wensch, M.; Klotz, M.; Schuster, M. Magnetic Solid Phase Extraction of Silver-Based Nanoparticles in Aqueous Samples: Influence of Particle Composition and Matrix Effects on Its Application to Environmental Samples and Species-Selective Elution and Determination of Silver Sulphide Nanoparticles with Sp-ICP-MS. *Talanta* **2021**, *225*, 122028. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122028>.
- (103) Taboada-López, M. V.; Bartczak, D.; Cuello-Núñez, S.; Goenaga-Infante, H.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A. AF4-UV-ICP-MS for Detection and Quantification of Silver Nanoparticles in Seafood after Enzymatic Hydrolysis. *Talanta* **2021**, *232*, 122504. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122504>.
- (104) Hulanicki, A.; Geab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors: Definitions and Classification. *4*.
- (105) Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantequi, 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* **2016**, *904*, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
- (106) 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. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *227*, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.044>.
- (107) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (108) Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M. R. Towards a Definition of Inorganic Nanoparticles from an Environmental, Health and Safety Perspective. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (10), 634–641.

- <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>.
- (109) Wiesner, M. R.; Lowry, G. V.; Jones, K. L.; Hochella, Jr., M. F.; Di Giulio, R. T.; Casman, E.; Bernhardt, E. S. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (17), 6458–6462. <https://doi.org/10.1021/es803621k>.
- (110) Asha, A. B.; Narain, R. Nanomaterials Properties. In *Polymer Science and Nanotechnology*; Elsevier, 2020; pp 343–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00015-7>.
- (111) March 23, nanoscale |; Reply, 2015 at 5:12 pm |. Nanotechnology and the Ancient Romans: A Breakthrough 1,600 Years in the Making. *AntiquityNOW*, 2014.
- (112) *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*; Tadros, T., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8>.
- (113) Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, *330* (3), 377–445. <https://doi.org/10.1002/andp.19083300302>.
- (114) Nasrollahzadeh, M.; Issaabadi, Z.; Sajjadi, M.; Sajadi, S. M.; Atarod, M. Types of Nanostructures. In *Interface Science and Technology*; Elsevier, 2019; Vol. 28, pp 29–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X>.
- (115) Sathiyaraj, S.; Suriyakala, G.; Dhanesh Gandhi, A.; Babujanathanam, R.; Almaary, K. S.; Chen, T.-W.; Kaviyarasu, K. Biosynthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Gold Nanoparticles. *J. Infect. Public Health* **2021**, *S1876034121003282*. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.007>.
- (116) Susan Punnoose, M.; Bijimol, D.; Mathew, B. Microwave Assisted Green Synthesis of Gold Nanoparticles for Catalytic Degradation of Environmental Pollutants. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* **2021**, *16*, 100525. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100525>.
- (117) González-Ballesteros, N.; Flórez-Fernández, N.; Torres, M. D.; Domínguez, H.; Rodríguez-Argüelles, M. C. Synthesis, Process Optimization and Characterization of Gold Nanoparticles Using Crude Fucoidan from the Invasive Brown Seaweed *Sargassum Muticum*. *Algal Res.* **2021**, *58*, 102377. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102377>.
- (118) da Silva, R. L. C. G.; de Oliveira Gonçalves, K.; Courrol, L. C.; Caseli, L. Study of the Interactions of Gold Nanoparticles Functionalized with Aminolevulinic Acid in Membrane Models. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, *205*, 111849. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111849>.
- (119) Rezaie Amale, F.; Ferdowsian, S.; Hajrasouliha, S.; Kazempoor, R.; Mirzaie, A.; Sedigh Dakkali, M.; Akbarzadeh, I.; Mohammadmahdi Meybodi, S.; Mirghafouri, M. Gold Nanoparticles Loaded into Niosomes: A Novel Approach for Enhanced Antitumor Activity against Human Ovarian Cancer. *Adv. Powder Technol.* **2021**, *S0921883121005045*. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2021.10.019>.
- (120) Khasanova, R. R.; Zhavoronok, E. S.; Urjupina, O. Ya.; Safonov, A. V.;

- Urodkova, E. K.; Senchikhin, I. N. Synthesis of Silver Nanoparticles in Liquid Reactive Oligomers for the Development of Biocidal Composites. *Mater. Today Commun.* **2021**, *28*, 102476. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102476>.
- (121) Kanniah, P.; Chelliah, P.; Thangapandi, J. R.; Gnanadhas, G.; Mahendran, V.; Robert, M. Green Synthesis of Antibacterial and Cytotoxic Silver Nanoparticles by Piper Nigrum Seed Extract and Development of Antibacterial Silver Based Chitosan Nanocomposite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *189*, 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.056>.
- (122) Zanjage, A.; Khan, S. A. Ultra-Fast Synthesis of Antibacterial and Photo Catalyst Silver Nanoparticles Using Neem Leaves. *JCIS Open* **2021**, *3*, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.jciso.2021.100015>.
- (123) Ittiachen, L.; Babu, S. M. Evaluation of Antibacterial Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles Coated Low Density Polyethylene Films. *Mater. Today Proc.* **2021**, S2214785321044862. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.131>.
- (124) Ammar, H. A.; Alghazaly, M. S.; Assem, Y.; Abou Zeid, A. A. Bioengineering and Optimization of PEGylated Zinc Nanoparticles by Simple Green Method Using *Monascus Purpureus*, and Their Powerful Antifungal Activity against the Most Famous Plant Pathogenic Fungi, Causing Food Spoilage. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* **2021**, *16*, 100543. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100543>.
- (125) Awais; Ali, N.; Khan, A.; Asiri, A. M.; Kamal, T. Potential Application of In-Situ Synthesized Cobalt Nanoparticles on Chitosan-Coated Cotton Cloth Substrate as Catalyst for the Reduction of Pollutants. *Environ. Technol. Innov.* **2021**, *23*, 101675. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101675>.
- (126) Samadi, Z.; Yaghmaeian, K.; Mortazavi-Derazkola, S.; Khosravi, R.; Nabizadeh, R.; Alimohammadi, M. Facile Green Synthesis of Zero-Valent Iron Nanoparticles Using Barberry Leaf Extract (GnZVI@BLE) for Photocatalytic Reduction of Hexavalent Chromium. *Bioorganic Chem.* **2021**, *114*, 105051. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105051>.
- (127) Hongfeng, Z.; El-Kott, A.; Ezzat Ahmed, A.; Khames, A. Synthesis of Chitosan-Stabilized Copper Nanoparticles (CS-Cu NPs): Its Catalytic Activity for C-N and C-O Cross-Coupling Reactions and Treatment of Bladder Cancer. *Arab. J. Chem.* **2021**, *14* (10), 103259. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103259>.
- (128) Martins, T. A. G.; Falconi, I. B. A.; Pavoski, G.; de Moraes, V. T.; Galluzzi Baltazar, M. dos P.; Espinosa, D. C. R. Green Synthesis, Characterization, and Application of Copper Nanoparticles Obtained from Printed Circuit Boards to Degrade Mining Surfactant by Fenton Process. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9* (6), 106576. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106576>.
- (129) Iqbal, M.; Khan, S. A.; Ivanov, D. S.; Ganeev, R. A.; Kim, V. V.; Boltaev, G. S.; Sapaev, I.; Abbasi, N. A.; Shaju, S.; Garcia, M. E.; Rethfeld, B.; Alnaser, A. S. The Mechanism of Laser-Assisted Generation of Aluminum Nanoparticles, Their Wettability and Nonlinearity Properties. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *527*, 146702. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146702>.
- (130) Alomayri, T.; Raza, A.; Shaikh, F. Effect of Nano SiO₂ on Mechanical Properties

- of Micro-Steel Fibers Reinforced Geopolymer Composites. *Ceram. Int.* **2021**, *47* (23), 33444–33453. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.251>.
- (131) Giner-Casares, J. J.; Henriksen-Lacey, M.; Coronado-Puchau, M.; Liz-Marzán, L. M. Inorganic Nanoparticles for Biomedicine: Where Materials Scientists Meet Medical Research. *Mater. Today* **2016**, *19* (1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.07.004>.
- (132) Nikzamid, M.; Akbarzadeh, A.; Panahi, Y. An Overview on Nanoparticles Used in Biomedicine and Their Cytotoxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *61*, 102316. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102316>.
- (133) Lou, Y.; Xu, J.; Zhang, Y.; Pan, C.; Dong, Y.; Zhu, Y. Metal-Support Interaction for Heterogeneous Catalysis: From Nanoparticles to Single Atoms. *Mater. Today Nano* **2020**, *12*, 100093. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2020.100093>.
- (134) Li, Y.-H.; Li, J.-Y.; Xu, Y.-J. Bimetallic Nanoparticles as Cocatalysts for Versatile Photoredox Catalysis. *EnergyChem* **2021**, *3* (1), 100047. <https://doi.org/10.1016/j.enchem.2020.100047>.
- (135) Amiri, M.; Eskandari, K.; Salavati-Niasari, M. Magnetically Retrievable Ferrite Nanoparticles in the Catalysis Application. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *271*, 101982. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.003>.
- (136) Aljaerani, H. A.; Samykano, M.; Saidur, R.; Pandey, A. K.; Kadirgama, K. Nanoparticles as Molten Salts Thermophysical Properties Enhancer for Concentrated Solar Power: A Critical Review. *J. Energy Storage* **2021**, *44*, 103280. <https://doi.org/10.1016/j.est.2021.103280>.
- (137) Ike, J. N.; Hamed, M. S. G.; Mola, G. T. Effective Energy Harvesting in Thin Film Organic Solar Cells Using Ni:Zn as Bimetallic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids* **2022**, *161*, 110405. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2021.110405>.
- (138) Sami, S.; Etesami, N. Heat Transfer Enhancement of Microencapsulated Phase Change Material by Addition of Nanoparticles for a Latent Heat Thermal Energy Storage System. *Energy Rep.* **2021**, *7*, 4930–4940. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.07.080>.
- (139) Li, G.-N.; An, X.-Y.; Zhang, L.-X.; Xing, Y.; Bie, L.-J. Doubly Ionized Oxygen Vacancies Dominated Co₃O₄ Nanoparticles for Highly Selective NH₃ Sensing Application at Room Temperature. *Mater. Lett.* **2022**, *307*, 131026. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131026>.
- (140) Manusha, P.; Yadav, S.; Satija, J.; Senthilkumar, S. Designing Electrochemical NADH Sensor Using Silver Nanoparticles/Phenothiazine Nanohybrid and Investigation on the Shape Dependent Sensing Behavior. *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, *347*, 130649. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130649>.
- (141) Zafar, A. M.; Javed, M. A.; Hassan, A. A.; Mohamed, M. M. Groundwater Remediation Using Zero-Valent Iron Nanoparticles (NZVI). *Groundw. Sustain. Dev.* **2021**, 100694. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2021.100694>.
- (142) de Jesus, R. A.; de Assis, G. C.; de Oliveira, R. J.; Costa, J. A. S.; da Silva, C. M. P.; Bilal, M.; Iqbal, H. M. N.; Ferreira, L. F. R.; Figueiredo, R. T. Environmental Remediation Potentialities of Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Mechanistic

- Biosynthesis, Influencing Factors, and Application Standpoint. *Environ. Technol. Innov.* **2021**, *24*, 101851. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101851>.
- (143) Thakre, S.; Shaikh, A.; Bodas, D.; Gajbhiye, V. Application of Dendrimer-Based Nanosensors in Immunodiagnosis. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2021**, 112174. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112174>.
- (144) Liu, L.; Zeng, R.; Jiang, J.; Wu, T.; Zhang, P.; Zhang, C.; Cui, J.; Chen, J. Preparation and Application of Multi-Wavelength-Regulated Multi-State Photoswitchable Fluorescent Polymer Nanoparticles. *Dyes Pigments* **2021**, 109919. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109919>.
- (145) Moghassemi, S.; Dadashzadeh, A.; Azevedo, R. B.; Feron, O.; Amorim, C. A. Photodynamic Cancer Therapy Using Liposomes as an Advanced Vesicular Photosensitizer Delivery System. *J. Controlled Release* **2021**, *339*, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.09.024>.
- (146) Anirudhan, T. S.; Varghese, S.; Manjusha, V. Hyaluronic Acid Coated Pluronic F127/Pluronic P123 Mixed Micelle for Targeted Delivery of Paclitaxel and Curcumin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *192*, 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.061>.
- (147) Noskov, B. A.; Isakov, N. A.; Gochev, G.; Loglio, G.; Miller, R. Interaction of Fullerene C60 with Bovine Serum Albumin at the Water – Air Interface. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, *631*, 127702. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127702>.
- (148) Thakur, A.; Bharti, R.; Sharma, R. Carbon Nanotubes: Types, Synthesis, Cytotoxicity and Applications in Biomedical. *Mater. Today Proc.* **2021**, S2214785321064658. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.10.002>.
- (149) Safian, M. T.; Umar, K.; Mohamad Ibrahim, M. N. Synthesis and Scalability of Graphene and Its Derivatives: A Journey towards Sustainable and Commercial Material. *J. Clean. Prod.* **2021**, *318*, 128603. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128603>.
- (150) Wang, X.; Zhang, X.; Fu, G.; Tang, Y. Recent Progress of Electrospun Porous Carbon-Based Nanofibers for Oxygen Electrocatalysis. *Mater. Today Energy* **2021**, *22*, 100850. <https://doi.org/10.1016/j.mtener.2021.100850>.
- (151) Chauhan, S.; Jain, N.; Nagaich, U. Nanodiamonds with Powerful Ability for Drug Delivery and Biomedical Applications: Recent Updates on in Vivo Study and Patents. *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.09.003>.
- (152) Wang, K.; Xu, X.; Li, Y.; Rong, M.; Wang, L.; Lu, L.; Wang, J.; Zhao, F.; Sun, B.; Jiang, Y. Preparation Fe₃O₄@chitosan-Graphene Quantum Dots Nanocomposites for Fluorescence and Magnetic Resonance Imaging. *Chem. Phys. Lett.* **2021**, *783*, 139060. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.139060>.
- (153) Gupta, N.; Behere, R. P.; Layek, R. K.; Kuila, B. K. Polymer Nanocomposite Membranes and Their Application for Flow Catalysis and Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants. *Mater. Today Chem.* **2021**, *20*.
- (154) Pinakidou, F. Influence of Composition and Growth Conditions on TiN Nanocrystallite Formation in TiN-Metal Films. *Thin Solid Films* **2021**, 727,

138645. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2021.138645>.
- (155) Malin, T. V.; Mansurov, V. G.; Galitsyn, Yu. G.; Milakhin, D. S.; Protasov, D. Yu.; Ber, B. Ya.; Kazantsev, D. Yu.; Ratnikov, V. V.; Shcheglov, M. P.; Smirnov, A. N.; Davydov, V. Yu.; Zhuravlev, K. S. Mg₃N₂ Nanocrystallites Formation during the GaN:Mg Layers Growth by the NH₃-MBE Technique. *J. Cryst. Growth* **2021**, *554*, 125963. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2020.125963>.
- (156) Wang, C.; Wang, T.; Li, B.; Yu, S.; Cao, L.; Zhang, G. Improving Ductility of Al_{0.74}Mn_{0.26} Alloy Films through Synergy of Phase Fraction and Morphology of Nanocrystallites Dispersed in Amorphous Matrix. *Mater. Sci. Eng. A* **2021**, *799*, 140146. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2020.140146>.
- (157) Grigoryeva, O.; Fainleib, A.; Starostenko, O.; Guskova, K.; Sakhno, V.; Borzakovskiy, A.; Kovalinska, T.; Youssef, B.; Gouanve, F.; Espuche, E.; Grande, D. Thermally Stable Nanoporous Cyanate Ester Resin/Linear Polyurethane Hybrid Networks Created by Nuclear Technologies. *Polymer* **2021**, *228*, 123831. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.123831>.
- (158) Wang, L.; Xie, H.; Shao, J.-C.; Yang, H.; Feng, P.-Z.; Jin, H.-J. High-Strength Hierarchical-Structured Bulk Nanoporous Cu Prepared by Dealloying and Spark Plasma Sintering. *Scr. Mater.* **2021**, *203*, 114114. <https://doi.org/10.1016/j.scriptamat.2021.114114>.
- (159) Hu, W.; Quang, N. D.; Majumder, S.; Jeong, M. J.; Park, J. H.; Cho, Y. J.; Kim, S. B.; Lee, K.; Kim, D.; Chang, H. S. Three-Dimensional Nanoporous SnO₂/CdS Heterojunction for High-Performance Photoelectrochemical Water Splitting. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *560*, 149904. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149904>.
- (160) Rabanian, A.; Neghabi, M.; Zadsar, M.; Jafari, M. Theoretical Studies of Energy States of CdSe/ZnS/CdSe and ZnS/CdSe/ZnS Quantum Dots with an Impurity. *Mater. Sci. Eng. B* **2021**, *274*, 115489. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115489>.
- (161) Rwaimi, M.; Bailey, C. G.; Shaw, P. J.; Mercier, T. M.; Krishnan, C.; Rahman, T.; Lagoudakis, P. G.; Horng, R.-H.; Boden, S. A.; Charlton, M. D. B. FAPbBr₃ Perovskite Quantum Dots as a Multifunctional Luminescent-Downshifting Passivation Layer for GaAs Solar Cells. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2022**, *234*, 111406. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2021.111406>.
- (162) Irani, E.; Yazdani, E.; Bayat, A. Enhancement and Tuning of Optical Properties of CdTe/CdS Core/Shell Quantum Dots by Tuning Shell Thickness. *Optik* **2021**, *168198*. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2021.168198>.
- (163) Pokropivny, V. V.; Skorokhod, V. V. Classification of Nanostructures by Dimensionality and Concept of Surface Forms Engineering in Nanomaterial Science. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27* (5–8), 990–993. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.09.023>.
- (164) Tawfik Abdo Saleh, Vinod Kumar Gupta. *Nanomaterial and Polymer Membranes. Chapter 4 - Synthesis, Classification, and Properties of Nanomaterials*, Elsevier.; 2016.
- (165) *Silver Nanoparticle Applications*; Alarcon, E. I., Griffith, M., Udekwu, K. I.,

- Eds.; Engineering Materials; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6>.
- (166) Koch, C. C.; Langdon, T. G.; Lavernia, E. J. Bulk Nanostructured Materials. *Metall. Mater. Trans. A* **2017**, *48* (11), 5181–5199. <https://doi.org/10.1007/s11661-017-4298-0>.
- (167) Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; O'Connor, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3893–3946. <https://doi.org/10.1021/cro30027b>.
- (168) Vanysek, P. Electrochemical Series. In: Lide, D.R. (Ed) CRC Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press 2004 2003.
- (169) Rúa, J.; de Arriaga, D.; García-Armesto, M. R.; Busto, F.; del Valle, P. Binary Combinations of Natural Phenolic Compounds with Gallic Acid or with Its Alkyl Esters: An Approach to Understand the Antioxidant Interactions. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243* (7), 1211–1217. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2838-2>.
- (170) Đurović, M. D.; Puchta, R.; Bugarčić, Ž. D.; van Eldik, R. Studies on the Reactions of $[\text{AuCl}_4]^-$ with Different Nucleophiles in Aqueous Solution. *Dalton Trans* **2014**, *43* (23), 8620–8632. <https://doi.org/10.1039/C4DT00247D>.
- (171) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>.
- (172) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (173) 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* **2004**, *108* (3), 945–951. <https://doi.org/10.1021/jp037018r>.
- (174) 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.* **2010**, *132* (4), 1296–1301. <https://doi.org/10.1021/ja906506j>.
- (175) Polte, J.; Tuae, 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* **2012**, *6* (7), 5791–5802. <https://doi.org/10.1021/nn301724z>.
- (176) 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* **2010**, *4* (2), 1076–1082. <https://doi.org/10.1021/nn901499c>.
- (177) AL Zahrani, N. A.; El-Shishtawy, R. M.; Asiri, A. M. Recent Developments of Gallic Acid Derivatives and Their Hybrids in Medicinal Chemistry: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *204*, 112609.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>.
- (178) Lone, S.; Rehman, S.; Bhat, K. Synthesis of Gallic-Acid-1-Phenyl-1H-[1,2,3]Triazol-4-Yl Methyl Esters as Effective Antioxidants. *Drug Res.* **2016**, *67* (02), 111–118. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118860>.
- (179) Amir, M.; Saifullah, K.; Akhter, W. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Azole Derivatives of Aryl Acetic Acid as Anti-Inflammatory and Analgesic Agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26* (1), 141–148. <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.481622>.
- (180) Kubo, I.; Fujita, K.; Nihei, K.; Masuoka, N. Non-Antibiotic Antibacterial Activity of Dodecyl Gallate. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (4), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00436-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00436-4).
- (181) Sharma, A.; Gautam, S. P.; Gupta, A. K. Surface Modified Dendrimers: Synthesis and Characterization for Cancer Targeted Drug Delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (11), 3341–3346. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.046>.
- (182) Yoosaf, K.; Ipe, B. I.; Suresh, C. H.; Thomas, K. G. In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (34), 12839–12847. <https://doi.org/10.1021/jp073923q>.
- (183) McGilvray, K. L.; Decan, M. R.; Wang, D.; Scaiano, J. C. Facile Photochemical Synthesis of Unprotected Aqueous Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 15980–15981. <https://doi.org/10.1021/ja066522h>.
- (184) Alarcon, E. I.; Bueno-Alejo, C. J.; Noel, C. W.; Stamplecoskie, K. G.; Pacioni, N. L.; Poblete, H.; Scaiano, J. C. Human Serum Albumin as Protecting Agent of Silver Nanoparticles: Role of the Protein Conformation and Amine Groups in the Nanoparticle Stabilization. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15* (1), 1374. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1374-7>.
- (185) Sakamoto, M.; Fujistuka, M.; Majima, T. Light as a Construction Tool of Metal Nanoparticles: Synthesis and Mechanism. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2009**, *10* (1), 33–56. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2008.11.002>.
- (186) Stamplecoskie, K. G.; Scaiano, J. C. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (6), 1825–1827. <https://doi.org/10.1021/ja910010b>.
- (187) Jockusch, S.; Landis, M. S.; Freiermuth, B.; Turro, N. J. Photochemistry and Photophysics of α -Hydroxy Ketones. *Macromolecules* **2001**, *34* (6), 1619–1626. <https://doi.org/10.1021/ma001836p>.
- (188) Alarcon, E. I.; Udekwu, K.; Skog, M.; Pacioni, N. L.; Stamplecoskie, K. G.; González-Béjar, M.; Poliseti, N.; Wickham, A.; Richter-Dahlfors, A.; Griffith, M.; Scaiano, J. C. The Biocompatibility and Antibacterial Properties of Collagen-Stabilized, Photochemically Prepared Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33* (19), 4947–4956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.033>.
- (189) 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* **2012**, *28* (46), 16148–16155.

- <https://doi.org/10.1021/la302814v>.
- (190) Pearce, A. K.; Wilks, T. R.; Arno, M. C.; O'Reilly, R. K. Synthesis and Applications of Anisotropic Nanoparticles with Precisely Defined Dimensions. *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5* (1), 21–45. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00232-7>.
- (191) Zhuo, X.; Zhu, X.; Li, Q.; Yang, Z.; Wang, J. Gold Nanobipyramid-Directed Growth of Length-Variable Silver Nanorods with Multipolar Plasmon Resonances. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 7523–7535. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02622>.
- (192) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of Silver Nanorods and Nanowires of Controllable Aspect Ratio. *Chem. Commun.* **2001**, No. 7, 617–618. <https://doi.org/10.1039/b100521i>.
- (193) Dong, R.-X.; Tsai, W.-C.; Lin, J.-J. Tandem Synthesis of Silver Nanoparticles and Nanorods in the Presence of Poly(Oxyethylene)-Amidoacid Template. *Eur. Polym. J.* **2011**, *47* (7), 1383–1389. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.04.003>.
- (194) Alinejad, Z.; Khakzad, F.; Mahdavian, A. R. Efficient Approach to In-Situ Preparation of Anisotropic and Assemblable Gold Nanoparticles Mediated by Stimuli-Responsive PDMAEMA. *Eur. Polym. J.* **2018**, *104*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.006>.
- (195) Ortiz-Castillo, J. E.; Gallo-Villanueva, R. C.; Madou, M. J.; Perez-Gonzalez, V. H. Anisotropic Gold Nanoparticles: A Survey of Recent Synthetic Methodologies. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *425*, 213489. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213489>.
- (196) Al-Sagheer, L. A. M.; Alshahrie, A.; Mahmoud, W. E. Facile Approach for Developing Gold Nanorods with Various Aspect Ratios for an Efficient Photothermal Treatment of Cancer. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, *618*, 126394. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126394>.
- (197) Bakshi, M. S. How Surfactants Control Crystal Growth of Nanomaterials. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (2), 1104–1133. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01465>.
- (198) Ni, C.; Hassan, P. A.; Kaler, E. W. Structural Characteristics and Growth of Pentagonal Silver Nanorods Prepared by a Surfactant Method. *Langmuir* **2005**, *21* (8), 3334–3337. <https://doi.org/10.1021/la046807c>.
- (199) Kumar, N.; Kumbhat, S. *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, 1st ed.; Wiley, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119096122>.
- (200) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1025–1102. <https://doi.org/10.1021/cr030063a>.
- (201) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (3), 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- (202) Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797–4862. <https://doi.org/10.1021/cr0680282>.

- (203) Amendola, V.; Meneghetti, M.; Stener, M.; Guo, Y.; Chen, S.; Crespo, P.; García, M. A.; Hernando, A.; Pengo, P.; Pasquato, L. Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2014; Vol. 66, pp 81–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63285-2.00003-1>.
- (204) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O. M.; Iatì, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- (205) Xu, H.; Kan, C.; Miao, C.; Wang, C.; Wei, J.; Ni, Y.; Lu, B.; Shi, D. Synthesis of High-Purity Silver Nanorods with Tunable Plasmonic Properties and Sensor Behavior. *Photonics Res.* **2017**, *5* (1), 27. <https://doi.org/10.1364/PRJ.5.000027>.
- (206) Shajari, D.; Bahari, A.; Gill, P.; Mohseni, M. Synthesis and Tuning of Gold Nanorods with Surface Plasmon Resonance. *Opt. Mater.* **2017**, *64*, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2017.01.004>.
- (207) 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* **2018**, *3* (2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.03.003>.
- (208) Xia, Y.; Halas, N. J. Shape-Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures. *MRS Bull.* **2005**, *30* (5), 338–348. <https://doi.org/10.1557/mrs2005.96>.
- (209) Aruda, K. O.; Tagliazucchi, M.; Sweeney, C. M.; Hannah, D. C.; Weiss, E. A. The Role of Interfacial Charge Transfer-Type Interactions in the Decay of Plasmon Excitations in Metal Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (20), 7441. <https://doi.org/10.1039/c3cp51005k>.
- (210) Mayer, K. M.; Hafner, J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3828–3857. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>.
- (211) Blaber, M. G.; Arnold, M. D.; Ford, M. J. A Review of the Optical Properties of Alloys and Intermetallics for Plasmonics. *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, *22* (14), 143201. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/14/143201>.
- (212) Zhang, H.; Zhang, R.; Geng, Y.; Ji, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Meng, D. Strain Mapping in Symmetrical Core-Shell Gold Nanorods from HRTEM Images. *Vacuum* **2021**, *193*, 110509. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2021.110509>.
- (213) Zhu, G.; Reiner, H.; Cölfen, H.; De Yoreo, J. J. Addressing Some of the Technical Challenges Associated with Liquid Phase S/TEM Studies of Particle Nucleation, Growth and Assembly. *Micron* **2019**, *118*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.12.001>.
- (214) Yang, X.; Jiang, C.; Hsu-Kim, H.; Badireddy, A. R.; Dykstra, M.; Wiesner, M.; Hinton, D. E.; Meyer, J. N. Silver Nanoparticle Behavior, Uptake, and Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*: Effects of Natural Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (6), 3486–3495. <https://doi.org/10.1021/es404444n>.
- (215) Abdolahpur Monikh, F.; Chupani, L.; Vijver, M. G.; Vancová, M.; Peijnenburg, W. J. G. M. Analytical Approaches for Characterizing and Quantifying Engineered Nanoparticles in Biological Matrices from an (Eco)Toxicological

- Perspective: Old Challenges, New Methods and Techniques. *Sci. Total Environ.* **2019**, *660*, 1283–1293. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.105>.
- (216) Ludwig Reimer; Helmut Kohl. *Introduction*. In: *Transmission Electron Microscopy*; Springer Series in Optical Sciences; Springer International Publishing: New York, NY, 2008; Vol. 36.
- (217) de Jonge, N.; Ross, F. M. Electron Microscopy of Specimens in Liquid. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (11), 695–704. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.161>.
- (218) López-Serrano, A.; Olivas, R. M.; Landaluze, J. S.; Cámara, C. Nanoparticles: A Global Vision. Characterization, Separation, and Quantification Methods. Potential Environmental and Health Impact. *Anal Methods* **2014**, *6* (1), 38–56. <https://doi.org/10.1039/C3AY40517F>.
- (219) Huang, T.; Xu, X.-H. N. Synthesis and Characterization of Tunable Rainbow Colored Colloidal Silver Nanoparticles Using Single-Nanoparticle Plasmonic Microscopy and Spectroscopy. *J Mater Chem* **2010**, *20* (44), 9867–9876. <https://doi.org/10.1039/CoJM01990A>.
- (220) Branda, F.; Silvestri, B.; Costantini, A.; Luciani, G. Effect of Exposure to Growth Media on Size and Surface Charge of Silica Based Stöber Nanoparticles: A DLS and ζ -Potential Study. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2015**, *73* (1), 54–61. <https://doi.org/10.1007/s10971-014-3494-2>.

2

Hipótesis y objetivos

2.1. Problemática

Los NM sintéticos y, en particular, las NP continúan atrayendo un interés creciente en diferentes áreas de investigación e innovación tecnológica, como resultado de sus propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, en comparación a sus análogos de mayor tamaño, convirtiéndolas en excelentes candidatas para aplicaciones biomédicas, electrónicas, ópticas y catalíticas, entre otras.¹⁻³ El incremento en la producción, usos y desechos de estos nanomateriales sintéticos pronostica un aumento en la probabilidad de su acumulación en aire, agua, suelos y en diversos organismos.⁴ Existen varios caminos a través de los cuales las NP sintéticas pueden ser liberadas al 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 y la gestión de residuos de NM también deben considerarse como vías para la introducción de NP en el ambiente, así como los productos comerciales a los cuales se les adicionan NM. Los efectos que estos desechos pueden producir en el ambiente están aun siendo estudiados, pero a largo plazo pueden significar un daño acumulativo. En varios organismos se ha observado que la exposición a algunos NM sintéticos (por inhalación, inyección intravenosa o dermal, e ingestión) produce efectos tóxicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, que incluyen daño físico, estrés oxidativo, daño al ADN y mutaciones, alteraciones del plegamiento proteico, inflamación, fibrosis y alergias.⁵⁻⁸

Toda sustancia química o material que represente una amenaza, potencial o real, para la salud humana o para el ambiente y de la cual se carece de datos estandarizados relacionados a la salud se denomina “contaminante emergente”.⁹ En esta categoría se encuadran las NP, dado que las consecuencias que estos nuevos materiales pueden desencadenar, tanto desde el punto de vista ambiental como el de la salud humana, siguen actualmente en constante indagación.^{10,11} El éxito de la investigación relacionada a los

efectos de NM, así como la generación de regulaciones para estos contaminantes emergentes se encuentran estrechamente relacionados a la existencia de métodos analíticos confiables que permitan la diferenciación y cuantificación de las diferentes NP.¹¹⁻¹⁶ Es necesario considerar también todas las transformaciones fisicoquímicas que experimentan los nanomateriales al ingresar al ambiente (Figura 2.1.), y que pueden influir desde el punto de vista analítico, dificultando su detección, y desde el punto de vista ambiental, ya que estas nuevas especies pueden significar nuevos riesgos asociados.¹⁷

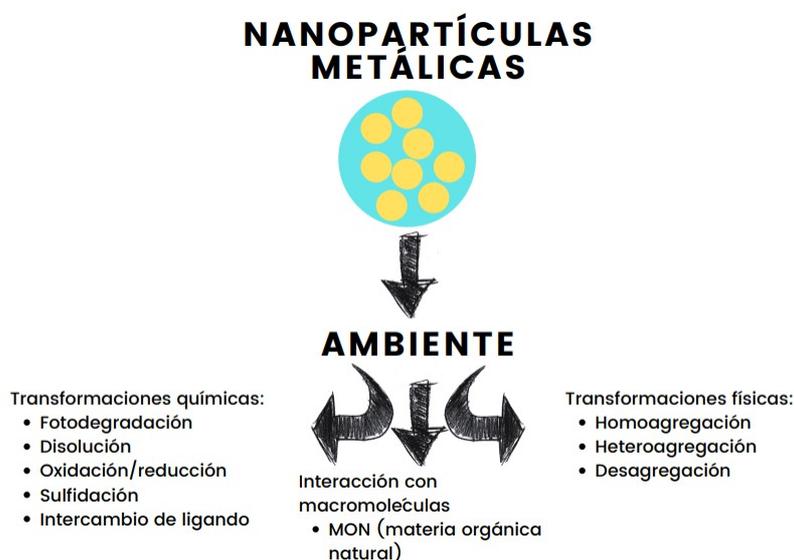


Figura 2.1. Interacciones, reacciones químicas y transformaciones posibles para las nanopartículas metálicas en el ambiente.

Por lo expuesto anteriormente, la detección de NM sintéticos en el ambiente constituye un gran desafío para la química analítica. En los últimos años, se han propuesto algunas técnicas analíticas cuantitativas para el análisis de muestras que contienen nanopartículas, pero éstas están usualmente limitadas a la utilización de costosos instrumentos y procesos de separación y pre-concentración.^{16,18-22} Sin embargo, aún no se encuentran métodos analíticos estandarizados simples que permitan detectar y evaluar NP en el ambiente.¹¹

Como se mencionó en el capítulo 1, una de las características principales de

Hipótesis y objetivos

algunas NP (ej.: AuNP y AgNP) es el efecto de su interacción con la radiación electromagnética. Cuando estas NP son irradiadas con luz, se genera una absorción y/o dispersión de la luz a determinadas longitudes de ondas de resonancia que es altamente dependiente de la morfología, tamaño, distancia entre partículas y del entorno dieléctrico del medio.²³⁻²⁵ Al mismo tiempo, las NP pueden inducir cambios fotofísicos al interactuar con moléculas orgánicas, como sondas moleculares fluorescentes, dependiendo estos cambios de la ubicación relativa del fluoróforo a la superficie.²⁶ Estas propiedades espectroscópicas pueden ser explotadas para la resolución de los analitos en mezclas complejas y proveer los fundamentos para su cuantificación.¹⁵

2.2. Hipótesis

Partiendo desde la problemática planteada, se propuso el desarrollo de diferentes estrategias analíticas para la diferenciación, detección y cuantificación de NP a partir del estudio de sistemas híbridos NP-sensores moleculares/supramoleculares.

La principal hipótesis de este trabajo es que la interacción entre los componentes de estos sistemas da lugar a cambios significativos de sus propiedades físicoquímicas, que permiten la diferenciación y la detección de NP en mezclas acuosas, de forma análoga a otros trabajos realizados recientemente en el laboratorio.^{27,28} La interacción entre los componentes puede ser evaluada mediante el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas (UV-visible y de fluorescencia) y de microscopía electrónica. Las interacciones establecidas entre las moléculas sensoras y analitos deberían depender de las características particulares de cada tipo de NP estudiada (tipo de metal, morfología, tamaños, ligando superficial), permitiendo encontrar condiciones adecuadas para lograr la diferenciación entre distintas clases de NP presentes en mezclas acuosas. La intensidad de las variaciones espectroscópicas observadas deberían ser proporcionales a la concentración del analito, permitiendo la obtención de curvas de calibración para cada NP en particular.

Los métodos analíticos requieren consistencia de las propiedades de los analitos

durante su desarrollo para obtener resultados adecuados para una posterior validación de la metodología. Una mayor reproducibilidad de las propiedades fisicoquímicas de analitos complejos, como lo son las NP, podría alcanzarse mediante el empleo de metodologías quimiométricas que permiten optimizar procesos químicos, como la síntesis del nanomaterial.

2.3. Objetivos del trabajo de tesis

2.3.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis de doctorado fue desarrollar novedosas metodologías analíticas que permitan detectar, cuantificar y diferenciar AuNP y AgNP, en busca de métodos estandarizados para el análisis de este tipo de contaminantes emergentes en muestras ambientales, principalmente de agua.

2.3.2. Objetivos específicos

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

- Diseñar, obtener y caracterizar AgNP altamente reproducibles mediante diseño de experimentos (DOE).
- Diseñar, obtener y caracterizar nanovarillas de plata sin el empleo de surfactantes.
- Derivar un algoritmo para determinar la concentración de cualquier conjunto de nanopartículas, independientemente de su forma o grado de polidispersidad, a partir de imágenes de microscopía electrónica de transmisión.
- Explorar la interacción de sensores fluorescentes con diferentes tipos de nanopartículas metálicas (AuNP, AgNP) por técnicas espectroscópicas.
- Determinar la sensibilidad de los cambios espectroscópicos, generados en los sistemas estudiados, a la concentración de las diferentes NP.
- Analizar individualmente AuNP y AgNP, con diferentes tamaños y ligandos para desarrollar metodologías analíticas univariadas que permitan detectar y

cuantificar estos NM en muestras de agua.

- Analizar mezclas de NP y desarrollar metodologías de calibración multivariada para la detección y cuantificación diferenciada de los diferentes NM.
- Determinar los parámetros analíticos que contribuyan a la validación de los métodos propuestos.

En los siguientes capítulos se desarrollarán las metodologías empleadas y los resultados obtenidos para lograr los objetivos propuestos para esta tesis doctoral.

2.4. Referencias

- (1) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (4), 1025–1102. <https://doi.org/10.1021/cr030063a>.
- (2) Goesmann, H.; Feldmann, C. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (8), 1362–1395. <https://doi.org/10.1002/anie.200903053>.
- (3) Kinge, S.; Crego-Calama, M.; Reinhoudt, D. N. Self-Assembling Nanoparticles at Surfaces and Interfaces. *ChemPhysChem* **2008**, *9* (1), 20–42. <https://doi.org/10.1002/cphc.200700475>.
- (4) Wagner, S.; Gondikas, A.; Neubauer, E.; Hofmann, T.; von der Kammer, F. Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment—Release, Behavior, and Fate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/anie.201405050>.
- (5) Liu, Y.; Zhao, Y.; Sun, B.; Chen, C. Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (3), 702–713. <https://doi.org/10.1021/ar300028m>.
- (6) 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.* **2011**, *39* (2), 301–324. <https://doi.org/10.1177/0192623310390705>.
- (7) 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.* **2013**, *46* (3), 607–621. <https://doi.org/10.1021/ar300022h>.
- (8) 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. *WIREs*

- Nanomedicine Nanobiotechnology* **2010**, *2* (5), 544–568. <https://doi.org/10.1002/wnan.103>.
- (9) EPA. Technical Fact Sheet – Nanomaterials. **2017**. https://doi.org//www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/ffrrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf.
- (10) Miseljic, M.; Olsen, S. I. Life-Cycle Assessment of Engineered Nanomaterials: A Literature Review of Assessment Status. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, *16* (6), 2427. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2427-x>.
- (11) Kühnel, D.; Nickel, C. The OECD Expert Meeting on Ecotoxicology and Environmental Fate – Towards the Development of Improved OECD Guidelines for the Testing of Nanomaterials. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.055>.
- (12) Wiesner, M. R.; Lowry, G. V.; Jones, K. L.; Hochella, Jr., M. F.; Di Giulio, R. T.; Casman, E.; Bernhardt, E. S. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (17), 6458–6462. <https://doi.org/10.1021/es803621k>.
- (13) von der Kammer, F.; Ferguson, P. L.; Holden, P. A.; Masion, A.; Rogers, K. R.; Klaine, S. J.; Koelmans, A. A.; Horne, N.; Unrine, J. M. Analysis of Engineered Nanomaterials in Complex Matrices (Environment and Biota): General Considerations and Conceptual Case Studies: Analysis of Engineered Nanomaterials in Complex Samples. *Environ. Toxicol. Chem.* **2012**, *31* (1), 32–49. <https://doi.org/10.1002/etc.723>.
- (14) Montaña, M. D.; Lowry, G. V.; von der Kammer, F.; Blue, J.; Ranville, J. F. Current Status and Future Direction for Examining Engineered Nanoparticles in Natural Systems. *Environ. Chem.* **2014**, *11* (4), 351. <https://doi.org/10.1071/EN14037>.
- (15) Howard, A. G. On the Challenge of Quantifying Man-Made Nanoparticles in the Aquatic Environment. *J. Env. Monit* **2010**, *12* (1), 135–142. <https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- (16) Zänker, H.; Schierz, A. Engineered Nanoparticles and Their Identification Among Natural Nanoparticles. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5* (1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143130>.
- (17) Lowry, G. V.; Gregory, K. B.; Apte, S. C.; Lead, J. R. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (13), 6893–6899. <https://doi.org/10.1021/es300839e>.
- (18) Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J.; Laborda, F.; Abad-Álvarez, I.; Bladé, C.; Arola, L.; Castillo, J. R. Detection and Characterization of Silver Nanoparticles and Dissolved Species of Silver in Culture Medium and Cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: Application to Nanotoxicity Tests. *The Analyst* **2014**, *139* (5), 914–922. <https://doi.org/10.1039/C3AN01443F>.
- (19) Rakcheev, D.; Philippe, A.; Schaumann, G. E. Hydrodynamic Chromatography Coupled with Single Particle-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for

- Investigating Nanoparticles Agglomerates. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (22), 10643–10647. <https://doi.org/10.1021/ac4019395>.
- (20) 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.* **2013**, *28* (4), 567. <https://doi.org/10.1039/c3ja30365a>.
- (21) Hartmann, G.; Schuster, M. Species Selective Preconcentration and Quantification of Gold Nanoparticles Using Cloud Point Extraction and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *761*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.050>.
- (22) Borovinskaya, O.; Hattendorf, B.; Tanner, M.; Gschwind, S.; Günther, D. A Prototype of a New Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometer Providing Temporally Resolved, Multi-Element Detection of Short Signals Generated by Single Particles and Droplets. *J Anal Spectrom* **2013**, *28* (2), 226–233. <https://doi.org/10.1039/C2JA30227F>.
- (23) Klajn, R.; Stoddart, J. F.; Grzybowski, B. A. Nanoparticles Functionalised with Reversible Molecular and Supramolecular Switches. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2203. <https://doi.org/10.1039/b920377j>.
- (24) 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.* **2008**, *108* (2), 494–521. <https://doi.org/10.1021/cr068126n>.
- (25) 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* **2011**, *40* (1), 44–56. <https://doi.org/10.1039/B821763G>.
- (26) Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96* (11), 113002. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.113002>.
- (27) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (28) Torres, M. A. M.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. The Fluorescence Quenching of Rhodamine 6G as an Alternative Sensing Strategy for the Quantification of Silver and Gold Nanoparticles. *Microchem. J.* **2021**, *160*, 105645. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105645>.

3

Síntesis de nanopartículas de plata asistida por diseño experimental

3.1. Introducción

Actualmente, está bien establecido que las propiedades de los nanomateriales dependen de su tamaño, que usualmente es reportado como el diámetro promedio (para esferas) obtenido desde el histograma de distribución de tamaño de nanopartículas.¹ Sin embargo, obtener lotes de nanopartículas metálicas con propiedades idénticas es una tarea complicada a escala del trabajo de laboratorio. Las diferencias entre lotes impactan en la determinación exacta y precisa de las propiedades asociadas a estas nanopartículas, por ejemplo, en el análisis de su interacción con otras moléculas.²

Desde hace algunos años, las AgNP están entre las más empleadas en diversas aplicaciones como en catálisis,³ plasmónica,⁴⁻⁶ impresión de inyección de tinta,⁷ biomateriales^{8,9} y como sensores ópticos.¹⁰ Si bien estos nanomateriales han sido ampliamente investigados, la reproducibilidad de los resultados suele ser una tarea complicada debido a la variabilidad morfológica y funcional de los lotes obtenidos.

Las AgNP para investigación son sintetizadas a escala de laboratorio usando diferentes metodologías como reducción química, fotoquímica y métodos sonoquímicos, entre otras alternativas.¹¹ El resultado de la síntesis por reducción química, una de los métodos más frecuentemente utilizados, depende en gran medida de la identidad de los reactivos así también como de su concentración, del tiempo de reacción y de la temperatura.¹¹⁻¹³ Tener conocimiento acerca de como influye cada una de estas variables sobre el producto final es

fundamental para optimizar el proceso sintético y obtener lotes reproducibles.

Entre otros métodos químicos, la reducción de Ag^+ mediante la utilización de ácido gálico presenta una alternativa sintética simple para obtener AgNP usando una molécula biocompatible, con condiciones de reacción suaves (temperatura ambiente y agua como solvente) y tiempos relativamente cortos (30 minutos).¹⁴ Sin embargo, la síntesis bajo las condiciones experimentales reportadas da lugar a NP con distribuciones de tamaño diferentes entre distintos lotes: ~32 nm de diámetro en el artículo original, ~5 nm y ~29 nm en trabajos previos de nuestro laboratorio (en las mismas condiciones de síntesis);¹⁵ y utilizando procedimientos ligeramente modificados las distribuciones de tamaño también resultan variables: ~7 nm,¹⁶ ~29 nm¹⁶ y ~14 nm.¹⁷ Las condiciones de síntesis de las NP mencionadas se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Condiciones de síntesis y tamaños medios reportados en procesos de obtención de AgNP con ácido gálico.

Referencia	Condiciones de síntesis	Diámetro medio / nm
14	[Ác. Gálico] 10 μM [AgNO ₃] 74 μM [NaOH] 740 μM 30 minutos a T° ambiente	32
15	Mismas condiciones que Ref. 14	5 - 29
16	[Ác. Gálico] 2,1 mM [AgNO ₃] 400 μM [NaOH] 1 mM No reporta tiempo ni temperatura	7 - 29
17	[Ác. Gálico] 350 μM [AgNO ₃] 150 μM [NaOH] 1 mM 2 horas a 80,0 °C	14

El diseño experimental (DOE, por sus siglas en inglés) empleando metodologías de superficies de respuesta (RSM),^{18,19} ha demostrado proveer un mayor entendimiento de los factores que interactúan y como optimizarlos durante la síntesis de los NM.^{20,21} Por ejemplo, Domingos *et al.*^{22,23} utilizaron DOE para elegir las mejores estructuras poliméricas basadas en dextrano o polietilenimina para obtener AgNP

con actividad altamente catalítica; Lim *et al.*²⁴ analizaron las interacciones entre diferentes factores experimentales para la síntesis de AgNP usando ácido ascórbico como agente reductor; y Liu *et al.*²⁵ optimizaron un procedimiento sintético para obtener nanopartículas bimetálicas de Ag-Cu. Sin embargo, ninguno de estos trabajos se enfocó en mejorar la reproducibilidad entre lotes y solo están enfocados en la optimización de su funcionalidad en diferentes aplicaciones.

3.1.1. DOE: Diseño factorial fraccional, diseño Box-Behnken y optimización mediante función deseabilidad

A nivel de la nanoescala, existen a menudo interacciones muy complejas entre los parámetros experimentales de diseño y los procesos o productos obtenidos. Llevar a cabo todas las combinaciones posibles de experimentos en un determinado estudio sistematizado demandaría un tiempo excesivo y resultaría prácticamente imposible. Sin embargo, el diseño estadístico de experimentos es una metodología que permite explorar de manera eficiente las relaciones entre diferentes factores en un determinado proceso, logrando un gran entendimiento de los sistemas bajo estudio.

El DOE ha sido aplicado de manera exitosa en numerosas áreas, desde la agricultura,²⁶ hasta la industria farmacéutica,²⁷ en ensayos clínicos,²⁸ e incluso en estudios económicos.²⁹ Los químicos pueden beneficiarse enormemente de la aplicación de los conceptos básicos de diseño experimental, ya que permiten realizar experimentos de *screening* para determinar factores significativos para el éxito de un proceso químico, llevar a cabo protocolos de optimización de los procesos estudiados para lograr condiciones favorables de acuerdo a la funcionalidad deseada, ahorrar tiempo y modelar cuantitativamente la o las respuestas estudiadas en función de las variables analizadas.^{30,31}

La terminología de DOE puede resultar diferente a la utilizada de forma cotidiana en el ámbito químico. A fin de establecer una base sólida para la discusión de este capítulo, se introducen a continuación algunos términos empleados en DOE:³¹

- Los *factores* son las variables controlables de interés. Estos puede ser tanto cuantitativos como cualitativos. Ejemplos de factores cuantitativos son la

concentración de un reactivo, la temperatura, etc. Ejemplos de factores cualitativos son el tipo de material, la marca de un reactivo, el operador que lleva a cabo la tarea, etc.

- Los *niveles de los factores* son los diferentes valores que pueden tomar los factores en un rango de interés.
- El *tratamiento* es una de las posibles combinaciones entre todos los niveles de factores que se pueden aplicar en un experimento individual.
- La *corrida (run)* es la implementación de un cierto tratamiento en un experimento individual.
- La *respuesta* es una característica cuantitativa o cualitativa de un experimento individual que puede medirse luego de aplicar un cierto tratamiento. El análisis de la respuesta es usualmente el objetivo de DOE.

En DOE es normal describir los datos experimentales como formando parte de una relación matemática entre los factores y las respuestas, es decir, que se puede modelar la respuesta en función de los factores analizados.³⁰ Una ecuación genérica de un experimento con tres factores sería de la siguiente forma, donde \hat{y} es igual a la respuesta estudiada, x_i son los factores bajo estudio, y b son coeficientes que deben ser estimados o calculados a partir de la respuesta y los factores:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & \\ & b_0 + \\ & b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + \\ & b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 + \\ & b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{123} x_1 x_2 x_3 \end{aligned} \quad \text{Ec. 3.1.}$$

En la ecuación 3.1. la segunda fila mostrada corresponde al término independiente del modelo (ordenada al origen o promedio), la tercer fila muestra los términos con dependencia lineal de la respuesta respecto de los factores analizados, la cuarta fila presenta los términos de dependencia cuadrática y la última fila de la ecuación tiene los términos de interacción entre factores (de segundo orden y de

tercer orden). La respuesta \hat{y} solo corresponde a un estimado del valor real, ya que es poco probable que tome el valor exacto debido al error asociado al experimento. La relación entre la respuesta, los coeficientes b y las condiciones experimentales (factores) también puede expresarse en una ecuación matricial, como se muestra en la ecuación 3.2.

$$\hat{y} = \beta \cdot D \quad \text{Ec. 3.2.}$$

En la Ec. 3.2. D es una matriz de experimentos con los factores a evaluar en las columnas, y los experimentos individuales en filas, y β es un vector que contiene todos los coeficientes de regresión b .³² Las ecuaciones 3.1 y 3.2 son análogas, y la estimación de los coeficientes individuales b de cada término se puede lograr mediante alguna metodología de regresión lineal múltiple si se conoce la matriz D y la respuesta \hat{y} . Una vez que los coeficientes b son determinados, es posible predecir y (nótese que es diferente de \hat{y} , ya que no se refiere a la respuesta experimental sino al predicho por el modelo) y calcular el error asociado a la estimación, la suma de cuadrados y otros parámetros estadísticos relacionados, como el error total, el error de regresión, el error de los residuales, la falta de ajuste, la curvatura, etc., de acuerdo a un modelo de la forma:

$$y = \beta \cdot D + \varepsilon \quad \text{Ec. 3.3.}$$

donde ε corresponde al valor de los residuales o *error*, ya que $\varepsilon = y - \hat{y}$. Normalmente, el cálculo de los parámetros estadísticos y la significancia estadística de los efectos estudiados se hace computacionalmente con algún tipo de programa informático, como Minitab, a través de análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de la varianza es un conjunto de modelos y procedimientos estadísticos que permite evaluar el efecto de un cierto tratamiento sobre la variabilidad de una determinada respuesta.³² Información adicional sobre ANOVA en diseño de experimentos puede encontrarse en el anexo A de esta tesis.

Determinar la significancia de los diferentes coeficientes estimados para un diseño experimental específico no puede lograrse fácilmente mediante una simple

inspección de los valores obtenidos ya que la escala física para cada una de las variables estudiadas puede ser diferente. Para que la comparación sea válida, es usual poner todas las variables en una escala comparable, lo que normalmente se denomina *codificar* los datos experimentales.^{30,32} Para cada factor, se asigna al máximo nivel un valor codificado igual a +1, y al mínimo nivel un valor codificado -1. Los valores codificados simplifican mucho las matrices de diseño D , y los coeficientes estimados toman valores aproximadamente en la misma escala.

Existen múltiples DOE disponibles, y la aplicación de uno u otro depende de la finalidad del experimento y de las condiciones experimentales del proceso que se esté evaluando. Para obtener el método de síntesis de AgNPg optimizado que se presenta en este capítulo se utilizaron dos tipos de diseño:

- diseño factorial fraccional (FrFD) de dos niveles, como *screening* inicial para determinar factores significativos y no significativos entre todos aquellos factores involucrados en la síntesis de las NP;^{33,34}
- diseño Box-Behnken (BBD), una metodología de superficies de respuesta, que permite obtener modelos matemáticos cuadráticos empíricos de las respuestas analizadas.^{35,36}

A continuación se describirán fundamentos básicos de estos tipos de diseño.

FrFD

Los diseños factoriales fraccionales^{30,32-34} se constituyen a partir de una reducción sistemática de diseños factoriales completos (FFD) en una determinada fracción que, en diseños de dos niveles, suelen ser iguales a 1/2, 1/4, 1/8, y así sucesivamente. En FFD de dos niveles, el número de experimentos a realizar es igual a 2^k , con k igual al número de factores analizados, ya que se analizan todas las combinaciones posibles entre los dos niveles. Cuando se evalúan sistemas con un gran número de factores, el número de experimentos a realizar puede ser abrumador y prácticamente imposible de llevar a cabo. Por lo tanto, el menor número de experimentos de un FrFD resulta muy atractivo por el ahorro en tiempo y recursos. Por otro lado, la información provista por los experimentos adicionales en un FFD usualmente no es de utilidad o

de interés, ya que sólo se refiere a interacciones de orden superior (tercer orden o mayores) que usualmente no son significativas.³⁴ Por lo anteriormente expuesto, los diseños factoriales fraccionales de dos niveles son los diseños más comúnmente utilizados en la práctica, sobre todo en estudios iniciales para determinar factores significativos.³⁴

En FrFD, la selección de la fracción de experimentos no puede realizarse al azar, ya que esto podría llevar a perder información sobre la variación de alguno de los factores estudiados y de su influencia sobre la respuesta analizada. La construcción de las matrices experimentales en FrFD requiere definir los niveles de los experimentos individuales de alguno de los factores a partir de los niveles de otros factores.³² Este proceso se denomina *confundir* los factores, y se puede comprender más fácilmente a partir de un ejemplo. Si consideramos un experimento con tres factores (A, B y C) y dos niveles (+1 y -1), se puede construir la Tabla 3.2. con todos los factores principales e interacciones en las diferentes columnas de dicha tabla. Un FFD para tres factores requiere un total de 8 experimentos. Las interacciones se obtienen multiplicando los niveles de los efectos principales.

Tabla 3.2. Matriz de diseño de un conjunto de 8 experimentos de 3 factores.

Corrida	Efectos principales			Interacciones de segundo orden			Interacción de tercer orden
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Si se asume que las interacciones de tercer orden o mayores son despreciables,

uno puede utilizar la columna de interacción ABC para generar los parámetros de un nuevo factor D, es decir, es posible estudiar cuatro factores en sólo 8 experimentos al *confundir* deliberadamente el factor principal D con la interacción de tercer orden ABC. De esta manera, un FFD que hubiese requerido 2^4 experimentos (ya que si se incorpora D ahora se analizan cuatro factores) se redujo a una fracción $1/2$ de tan solo $2^{(4-1)}$ experimentos. De forma general, en un FrFD, el número de experimentos resulta igual a $2^{(k-p)}$, donde p corresponde al número de “generadores de diseño”.³² En el caso particular ejemplificado, la relación $D=ABC$ es lo que se denomina generador del diseño y determina como se selecciona la fracción de experimentos de un conjunto de corridas de un FFD. A partir del generador, se puede obtener la relación de definición, que es el conjunto total de términos que se mantienen constantes para definir la fracción en un FrFD. Esta relación de definición se utiliza para construir la estructura de alias que describe la *confusión* en los diseños fraccionales.³² Para el caso ejemplificado, la relación de definición está dada por $D.D=D^2=ABCD=I$, donde I es el elemento identidad. A partir de la relación de definición se pueden obtener la estructura de alias de todos los términos de la matriz de diseño. Para el caso ejemplificado, $I=ABCD$, y determinar el alias del factor principal A requiere multiplicar la relación de definición por A, de la siguiente manera: $AxI=A=AxABCD=A^2BCD=BCD$, ya que $A^2=1$. Del mismo modo, se podría obtener el alias de los factores principales B y C; de los términos de interacción AB, AC, AD, BC, BD, CD; y de los terminos de interacción de tercer orden ABC, ABD, ACD y BCD. Al obtener los alias de todos los términos del diseño involucrados, se obtiene el patrón de alias (o patrón de confusión) del diseño.³² Usualmente los programas informáticos generan patrones de confusión definidos para varios tipos de diseños de dos niveles. Los patrones de alias definen la resolución de un FrFD. Esta resolución describe en que medida los efectos en un diseño fraccional estan confundidos con otros efectos. Cuando dos efectos están confundidos, no es posible estimarl de forma independiente uno de otro. Desde el punto de vista práctico se desea usar un FrFD con la mayor resolución posible para el fraccionamiento requerido. Las resoluciones más empleadas son III, IV y V:³²

- Resolución III, los efectos principales están confundidos con interacciones de segundo orden.
- Resolución IV, algunas interacciones de segundo orden están confundidas con otras interacciones de segundo orden y los efectos principales están confundidos con interacciones de tercer orden.
- Resolución V, las interacciones de segundo orden están confundidas con interacciones de tercer orden y los efectos principales están confundidos con las interacciones de cuarto orden.

El caso que ha sido ejemplificado a lo largo de esta sección presenta una resolución IV, ya que $D=ABC$.

A partir de todo lo descrito anteriormente se puede construir la matriz D de la ecuación 3.2. para un FrFD y, conociendo las respuestas, se pueden estimar los coeficientes b del modelo y analizar la significancia de los factores estudiados mediante ANOVA.

Como en FrFD de dos niveles solo se aplican dos condiciones experimentales para cada factor analizado, este tipo de diseño no permiten la estimación de términos cuadráticos de los factores principales, a menos que se incorporen deliberadamente puntos centrales. La estimación de estos términos y la generación de un modelo matemático predictivo puede lograrse con métodos de superficie de respuesta, como el BBD.

BBD

Luego de determinar los factores significativos, es usual aplicar diseños experimentales más complejos para lograr la optimización de un proceso, como el diseño de Box-Behnken.^{30,35,36} Los BBD están basados en diseños fraccionales incompletos de tres niveles, y fueron desarrollados específicamente para permitir una estimación eficiente de polinomios de segundo grado de la forma

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i}^k b_{ij} x_i x_j \quad \text{Ec. 3.4.}$$

donde b son los coeficientes del modelo, \hat{y} es la respuesta estudiada, x los diferentes factores individuales y k el número de factores analizados.

De forma análoga a otros diseños, en BBD es usual codificar los tres niveles para cada factor como -1, 0 y +1 para el valor mínimo, medio y máximo, respectivamente. Los BBD están diseñados para ser rotables, o casi rotables en algunos casos, a fin de asegurar la generación de información simétrica en el espacio k -dimensional definido. Un diseño rotable es aquel donde la varianza de la respuesta \hat{y} es constante para todos los puntos equidistantes desde el centro del diseño.³⁵

La generación de la matriz de experimentos requiere la combinación de diseños factoriales de dos niveles con diseños en bloque incompletos en una forma particular. Para comprender esto, es útil el siguiente ejemplo. La tabla 3.3. muestra un diseño en bloque balanceado incompleto para analizar $k=3$ factores, en $B= 3$ bloques de tamaño $s=1$.

Tabla 3.3. Diseño en bloque incompleto para 3 factores en 3 bloques.

Bloque	x_1	x_2	x_3
1	*	*	
2	*		*
3		*	*

En diseños en bloque, únicamente los factores x_1 y x_2 se evaluarían en el bloque 1, x_1 y x_3 en el bloque 2, y x_2 y x_3 en el bloque 3. En BBD, se logra un diseño de 3 niveles al combinar este tipo de diseño con un diseño factorial 2^2 . Los asteriscos del diseño mostrado en la tabla 3.3. son reemplazados por los niveles de un diseño factorial completo de dos niveles, agregando ceros en las casillas sin asteriscos. El diseño se completa por la adición de un cierto número de puntos centrales (0, 0, 0) para la estimación de la curvatura y términos cuadráticos de los factores evaluados. El diseño resultante se muestra en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Diseño factorial incompleto 3^3 (BBD).

Bloques	X ₁	X ₂	X ₃
1	+1	+1	0
	+1	-1	0
	-1	+1	0
	-1	-1	0
2	+1	0	+1
	+1	0	-1
	-1	0	+1
	-1	0	-1
3	0	+1	+1
	0	+1	-1
	0	-1	+1
	0	-1	-1
Punto central	0	0	0

El diseño obtenido es un diseño rotatable de segundo orden que permite estudiar 3 variables y estimar hasta 10 coeficientes en al menos 13 corridas, lo que hace a BBD uno de los diseño de superficie de respuesta más eficientes, a comparación de otros como el diseño central compuesto. En el espacio tridimensional, un BBD de 3 factores tiene la representación gráfica que se muestra en la figura 3.1. Como se puede observar en la Fig. 3.1. la disposición espacial de los experimentos en un BBD de 3 factores se puede representar como un cubo con puntos medios en cada eje (círculos negros) y un punto central (estrella roja).

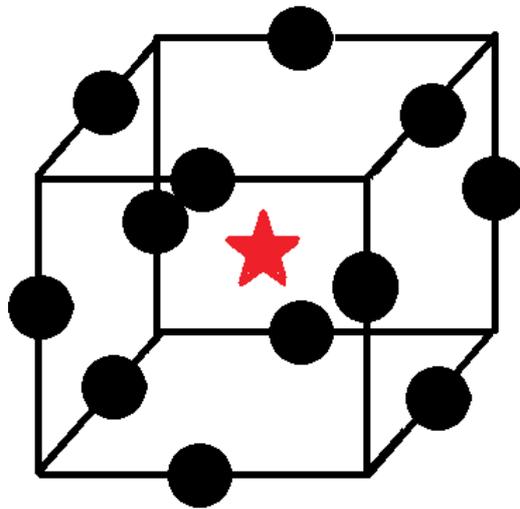


Fig. 3.1. Representación gráfica de la disposición en el espacio de diseño de los experimentos de un BBD de 3 factores.

El número de experimentos requeridos (N) en un BBD resulta igual a $2k(k-1) + C_o$, con k igual al número de factores evaluados y C_o el número de puntos centrales utilizados. Usualmente el número de puntos centrales no es crítico, pero debe elegirse de forma tal que los perfiles de varianza sean razonablemente uniformes dentro del espacio del diseño experimental.³⁶

Una ventaja particular de los BBD, es que no contiene en su construcción combinaciones en las cuales todos los factores están simultáneamente en sus niveles más altos o más bajos. Así se evita realizar experimentos en condiciones extremas que puedan arrojar resultados insatisfactorios o poco reproducibles.

Con el diseño experimental construido, la estimación de la significancia de los coeficientes y de su valor numérico se puede realizar del mismo modo que para otros diseños mediante regresión múltiple, al resolver la ecuación 3.2. que relaciona la matriz de diseño con las respuestas obtenidas, y ANOVA.

Optimización: Función deseabilidad

Uno de los problemas más comunes en el desarrollo de productos o de procesos, es la selección de un conjunto de condiciones experimentales que lleven, simultáneamente, a producir una combinación deseable de propiedades (o

respuestas). Con el objetivo de ofrecer una solución, en 1980 Derringer y Suich presentaron su Función Deseabilidad (DF) para la optimización simultánea de múltiples respuestas.³⁷ La DF requiere la transformación de cada una de las respuestas \hat{y}_i , a un valor de deseabilidad d_i , que puede tomar valores $0 \leq d_i \leq 1$. El valor de d_i es mayor mientras más deseable sea la correspondiente respuesta. Para múltiples respuestas, las deseabilidades individuales d_i se combinan usando la media geométrica (Ec. 3.5.) generando D , que es igual al valor global de deseabilidad del sistema evaluado.

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_i)^{1/i} \quad \text{Ec. 3.5.}$$

Al igual que para las respuestas individuales, la deseabilidad global D también toma valores entre 0 y 1, y su valor incrementa a medida que la combinación de las diferentes propiedades se hace más favorable. Otra característica de D es que si cualquiera de las respuestas individuales d_i toma el valor 0, entonces $D=0$, evitando totalmente alguna condición desfavorable.³⁷

La transformación de una respuesta \hat{y}_i a d_i puede darse de dos formas diferentes: deseabilidad a una cola y deseabilidad a dos colas.³⁷ En el caso de una cola, el valor de d_i se incrementa a medida que la respuesta \hat{y}_i aumenta, y se emplea cuando se desea maximizar \hat{y}_i (o minimizarla, considerando que este proceso es igual a maximizar la respuesta $-\hat{y}_i$). La transformación usualmente empleada es la que se muestra en la Ec. 3.6.

$$d_i = \begin{cases} 0 & \forall \hat{y}_i \leq y_{i*} \\ \left[\frac{\hat{y}_i - y_{i*}}{y_i^* - y_{i*}} \right]^r & \forall y_{i*} < \hat{y}_i < y_i^* \\ 1 & \forall \hat{y}_i \geq y_i^* \end{cases} \quad \text{Ec. 3.6.}$$

En la Ec. 3.6. el valor de y_{i*} es el mínimo valor aceptable de \hat{y}_i , y es especificado por el usuario, considerando que valores de \hat{y}_i por debajo de y_{i*} van a conducir a una D inaceptable. Al contrario, y_i^* es el máximo valor de \hat{y}_i , aunque técnicamente no hay

valor máximo ya que el objetivo es maximizar la respuesta. y_i^* es un valor de \hat{y}_i por encima del cual todos los \hat{y}_i tienen poca influencia en la deseabilidad, ya que siempre vale 1. El valor del exponente r es definido arbitrariamente por el usuario dependiendo de los objetivos de la optimización. De forma general, mayores valores de r se especifican si es muy deseable que el valor de \hat{y}_i incremente rápidamente sobre y_i^* . La transformación de dos colas surge cuando las respuestas \hat{y}_i tienen simultáneamente restricciones de máximos y mínimos.³⁷ Este caso usualmente es menos común y no será considerado para la discusión de este capítulo ya que no resulta de utilidad de acuerdo a los objetivos planteados.

Al ser \hat{y}_i una función continua de los x_i factores del diseño experimental, la función d_i una función continua de \hat{y}_i , y D una función continua de d_i , resulta que D es una función continua de los factores x_i . Como resultado, métodos univariados pueden ser utilizados para maximizar la función D sobre el dominio de la variable independiente. De esta forma, la DF condensa un problema de optimización multivariada en un problema univariado.³⁷

En este capítulo, se presenta una estrategia sintética para obtener lotes reproducibles de nanopartículas sintetizadas por reducción química utilizando ácido gálico (AgNPg) basada en una metodología de DOE. En una primera instancia se utilizó un FrFD^{18,33,38} para seleccionar los factores significativos que afectan la síntesis de AgNPg y, posteriormente, se empleó un BBD^{35,36,38} para modelar la superficie de respuesta de segundo orden de los factores significativos seleccionados en la primera etapa. Finalmente, se utilizó la función deseabilidad³⁷⁻³⁹ para llevar a cabo la optimización de las múltiples respuestas. Además, se llevaron a cabo los análisis estadísticos intra-ensayo, de precisión intermedia y reproducibilidad, junto a la evaluación de la vida útil y la estabilidad de las AgNPg sintetizadas bajo las condiciones experimentales optimizadas.

3.2. Objetivos específicos

- Mejorar la reproducibilidad de las propiedades fisicoquímicas de AgNPg mediante la utilización de diseño experimental para optimizar el procedimiento sintético.
- Caracterizar y evaluar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas obtenidas.
- Evaluar la reproducibilidad de AgNPg respecto de sus propiedades ópticas por espectroscopia UV-visible, y de su distribución de tamaño obtenida a partir de imágenes TEM.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos de grado analítico como se recibieron, sin ningún protocolo de purificación previo: ácido gálico monohidrato (AG, Merck), hidróxido de sodio (Merck), nitrato de plata (BioPack). El solvente en las diferentes reacciones llevadas a cabo y soluciones preparadas fue agua de calidad MilliQ de resistividad $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^1$ a 25° C (Merk-Millipore).

3.3.2. Instrumentación y software

Todos los espectros de absorción fueron determinados en un espectrofotómetro UV-vis Shimadzu 1800 conectado a un baño termostático a $25,0^\circ \text{ C}$, en el rango de longitudes de onda comprendido entre 200 nm y 800 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico. Las imágenes de TEM se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico TEM-Jeol 1120 de 80 kV de voltaje de aceleración; las muestras se prepararon sobre grillas de cobre recubiertas de carbono recubiertas de carbono de 300 mallas, depositando $10 \mu\text{L}$ de dispersión de NP sobre las mismas y dejando secar al aire a temperatura ambiente. Para obtener la distribución de tamaños se empleó el programa ImageJ®. Las imágenes TEM empleadas se

convirtieron a color binario (blanco y negro) para mejorar el contraste, llevando a cabo el conteo y medición de diámetros de forma automática mediante la herramienta *análisis de partículas*, considerando una circularidad entre 0,9 y 1,0 para las partículas esféricas. Se analizaron en total cuatro muestras de NP, contando >500 partículas por muestra para obtener los correspondientes histogramas. Las determinaciones de potencial zeta e índice de polidispersidad se realizaron mediante DLS en un analizador de partículas Delsa Nano S (Beckman Coulter) a temperatura ambiente. Los protocolos de centrifugación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Eppendorf 5804, con un rotor de 11,5 cm.

El análisis de datos se realizó utilizando el software Design Expert ® 10 (Stat-ease, Inc.) y Minitab ® 17 (Minitab, Inc.). Todos los gráficos se realizaron usando OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

3.3.3. Diseño experimental para la síntesis de AgNPg

Sobre la base del procedimiento sintético publicado por Yoosaf *et al.*¹⁴ que emplea 10 μM AG, 74 μM AgNO_3 , 740 μM NaOH, agitación durante 30 minutos, temperatura ambiente y a resguardo de la luz, se decidió emplear un diseño factorial fraccional de dos niveles para poder identificar cuales de los siguientes factores de síntesis: concentraciones de AG, NaOH y AgNO_3 , tiempo de reacción y velocidad de agitación son los más críticos y tienen un efecto significativo sobre la respuesta seleccionada ψ , cuya definición se muestra en la Ec. 3.7. En la ecuación 3.7., A_{max} , λ_{max} y FWHM corresponden a la absorbancia máxima, la longitud de onda de máxima absorbancia y la anchura a media altura de la banda SPR, respectivamente. En la figura 3.2. se muestra un espectro UV-visible modelo de AgNP, y se indica como se toman los valores para la determinación del valor de las respuestas evaluadas. Estos parámetros fueron seleccionados para definir ψ ya que están estrechamente relacionados con la concentración de AgNP (absorbancia depende de la cantidad de partículas que interaccionan con la luz), su tamaño (la posición de la banda de plasmón característica del nanomaterial depende, entre otras cosas, de las dimensiones de la partícula) y su polidispersidad (la dispersión de tamaños afecta el ancho de la banda

de plasmón debido a las contribuciones individuales de las diferentes poblaciones de NP, con distribuciones más anchas en muestras más polidispersas).²²

$$\psi = \frac{A_{\text{máx}}}{\lambda_{\text{máx}} \text{FWHM}} \quad \text{Ec. 3.7.}$$

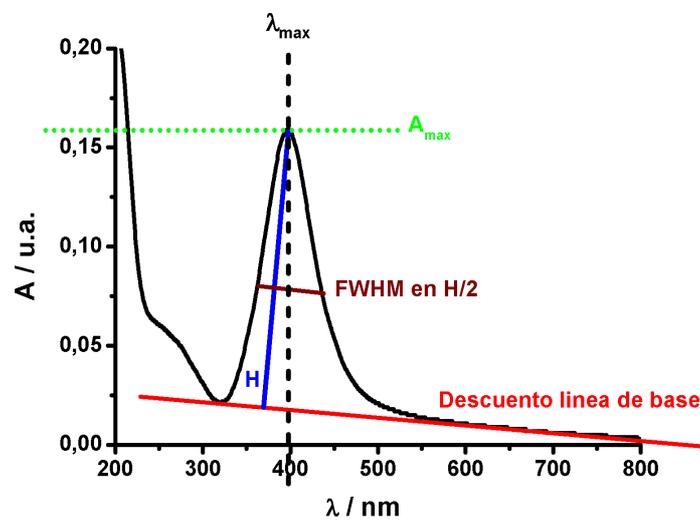


Fig. 3.2. Espectro UV-visible modelo de AgNPg. En el mismo se indica como se toman los valores de $A_{\text{máx}}$, $\lambda_{\text{máx}}$ y FWHM. La altura de la banda del plasmón se toma de manera perpendicular a la línea de base definida por los mínimos locales a ambos lados del máximo. FWHM se toma perpendicularmente a la mitad de la altura definida por el segmento H (en azul). $A_{\text{máx}}$, $\lambda_{\text{máx}}$ se toman directamente de los valores de absorbancia y la posición del máximo.

Para el análisis inicial de la síntesis del nanomaterial y la selección de los factores principales significativos, se empleó un diseño factorial fraccional de dos niveles. El diseño seleccionado consistió en $2^{(5-1)}$ experimentos, a través del cual se evaluaron cinco factores (A: [NaOH], B: [AgNO₃], C: [AG], D: tiempo de reacción y E: velocidad de agitación) aplicando un único generador de diseño, con la relación de definición I=ABCDE. Así, el FrFD resultante fue una fracción 1/2 de un diseño factorial completo

de resolución V, que permitió estimar los efectos principales y las interacciones entre dos factores, siempre que todas las interacciones entre tres o más factores sean despreciables.¹⁸ Cada factor se analizó a dos niveles, - y +, pero se evaluaron también puntos centrales (nivel 0) para comprobar si existe dependencia cuadrática (curvatura) de la respuesta ψ con los factores estudiados. Los niveles seleccionados para cada factor estudiado se asignaron para estar centrados alrededor de los niveles empleados en la síntesis original publicada por Yoosaf *et al.*¹⁴ que se mostraron previamente en la tabla 3.1. Este diseño involucró 32 experimentos (16 definidos por el diseño, por duplicado), más 12 puntos centrales (6, por duplicado). La matriz de experimentos correspondiente se muestra en la tabla 3.5. Los experimentos se aleatorizaron para evitar errores sistemáticos.

La evaluación de los resultados del FrFD se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, y para el análisis gráfico se utilizó el diagrama de Pareto correspondiente. El diagrama de Pareto es un tipo de gráfico de barras donde los t-valores absolutos de cada efecto estandarizado evaluado que surgen del ANOVA correspondiente se ordenan de forma descendiente, es decir, desde el efecto más grande al más pequeño. En este mismo gráfico se remarca una línea vertical de referencia que indica cuales efectos son estadísticamente significativos. En el diagrama de Pareto, todos aquellos efectos con valores mayores al indicado en la línea de referencia resultan significativos al nivel de confianza estudiado.

Tabla 3.5. Factores y niveles codificados considerados para las corridas del diseño 2^{5-1} con dos replicados (I y II). Matriz de experimentos y respuestas obtenidas.

Factor	Símbolo	Nivel bajo (-)	Punto central (o)	Nivel alto (+)
[NaOH] (μM)	A	500	750	1000
[AgNO ₃] (μM)	B	50	75	100
[AG] (μM)	C	5	12,5	20
Tiempo (min)	D	10	30	50
Vel. Agitación (u.a.)	E	1 (mínima)	5,5 (media)	10 (máxima)

Estándar	Corrida	A	B	C	D	E	ψ (10^{-8} nm^{-2})	
							I	II
1	5	-	-	-	-	-	60,1	66,2
2	20	+	-	-	-	+	64,3	75,1
3	14	-	-	+	-	+	151,8	146,9
4	10	+	-	+	-	-	153,7	149,6
5	4	-	+	-	-	+	113,2	118,5
6	12	+	+	-	-	-	109,6	113,9
7	18	-	+	+	-	-	246,9	231,8
8	3	+	+	+	-	+	259,8	240,9
9	15	-	-	-	+	-	196,2	182,7
10	9	+	-	-	+	+	190,6	203,1
11	6	-	-	+	+	+	276,9	289,6
12	16	+	-	+	+	-	255,4	276,6
13	21	-	+	-	+	+	175,3	181,3
14	1	+	+	-	+	-	169,8	159,6
15	2	-	+	+	+	-	336	343,5
16	17	+	+	+	+	+	386,1	345,7
17	7	o	o	o	o	o	153	146,7
18	19	o	o	o	o	o	143,5	126,3
19	11	o	o	o	o	o	171,1	162,4
20	8	o	o	o	o	o	136,6	148,1
21	13	o	o	o	o	o	156,6	143,4
22	22	o	o	o	o	o	139,6	120,3

Una vez determinados los factores principales, la optimización multivariada se continuó mediante un modelo de superficies de respuesta de segundo orden, el

diseño Box-Behnken. El BBD de tres factores (B: [AgNO₃], C: [AG] y D: tiempo de reacción) consistió en 17 experimentos en los que se estudiaron de forma independiente las respuestas A_{max} , λ_{max} y FWHM, de acuerdo a los niveles indicados en la tabla 3.6. y la matriz de experimentos de la tabla 3.7.

Tabla 3.6. Factores y niveles codificados empleados para el BBD.

Factor	Símbolo	Nivel bajo (-)	Punto central (o)	Nivel alto (+)
[AgNO ₃] (μM)	B	20	110	200
[AG] (μM)	C	5	27,5	50
Tiempo (min)	D	5	27,5	50

Tabla 3.7. Matriz de experimentos del diseño Box-Behnken y resultados obtenidos.

Estándar	Corrida	Factores			Respuestas		
		B	C	D	$A_{max}/u.a.$	λ_{max}/nm	FWHM/nm
1	16	-	-	0	0,016	405,5	74,5
2	5	+	-	0	0,030	391,5	70,0
3	9	-	+	0	0,031	413,0	94,5
4	14	+	+	0	0,159	397,0	66,0
5	17	-	0	-	0,021	406,5	79,0
6	15	+	0	-	0,166	393,5	58,5
7	6	-	0	+	0,023	420,5	96,0
8	12	+	0	+	0,149	396,0	60,5
9	8	0	-	-	0,042	396,0	68,0
10	7	0	+	-	0,086	401,5	75,0
11	1	0	-	+	0,042	397,5	68,5
12	13	0	+	+	0,090	400,5	71,5
13	2 (C)	0	0	0	0,082	399,5	71,0
14	3 (C)	0	0	0	0,084	402,0	74,0
15	11 (C)	0	0	0	0,085	399,0	72,5
16	10 (C)	0	0	0	0,089	400,5	70,5
17	4 (C)	0	0	0	0,080	400,0	71,5

Para el caso del BBD, el espacio de diseño definido por los niveles – y + se amplió

respecto del empleado en FrFD para poder realizar predicciones en un mayor rango de condiciones experimentales, ya que los modelos matemáticos empíricos sólo son predictivos dentro del espacio definido por el diseño. Sin embargo, los niveles del BBD contienen a los empleados en FrFD. El análisis del diseño mediante ANOVA permitió obtener la significancia estadística ($\alpha=0,05$) y los coeficientes de regresión de los factores principales, los factores de interacción y los términos de segundo orden para cada respuesta. A partir de los coeficientes calculados para cada efecto, se construyeron los modelos matemáticos de cada respuesta y se graficaron las diferentes superficies de respuesta tridimensionales.

3.3.3.1. Optimización de la síntesis de AgNPg

Las condiciones óptimas de la metodología sintética investigada se determinaron mediante la aplicación de la función deseabilidad, descrita en la introducción de este capítulo, para cada respuesta evaluada en el BBD. Brevemente, usando el programa estadístico indicado en la sección 3.3.2. cada respuesta individual se transformó, de acuerdo a lo arrojado por el análisis del BBD, en una función deseabilidad particular que va desde 0 (no deseable) a 1 (totalmente deseable) utilizando la Ec. 3.6., obteniendo en el proceso los perfiles de deseabilidad correspondientes a las respuestas A_{\max} , λ_{\max} y FWHM. Las condiciones de optimización fueron designadas con la finalidad de obtener AgNPg con una alta concentración (maximizar A_{\max}), de menor tamaño (minimizar λ_{\max}) y relativamente monodispersas (minimizar FWHM), manteniendo las condiciones de agitación y [NaOH] constantes en su nivel medio.

3.3.4. Optimización del protocolo post-síntesis

Usualmente, el lavado y la pre-concentración de las AgNPg es llevada a cabo mediante la técnica de centrifugación. Para poder evaluar si la velocidad de centrifugación tiene algún efecto en la respuesta ψ , se decidió optimizar este parámetro. Usando un diseño univariado, se llevaron a cabo ocho experimentos empleando las condiciones experimentales óptimas determinadas previamente mediante el BBD y la función deseabilidad para analizar el efecto de la velocidad de centrifugación en el rango de 1000 rpm (129 rcf, relative centrifugal force) a

8000 rpm (8228 rfc). Una vez optimizado este parámetro, se realizó una prueba de predicción usando seis muestras centrifugadas al nivel óptimo.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Optimización multivariada para la síntesis de AgNPg

En primer lugar se decidió evaluar mediante un FrFD 2^{v-1} cuáles de los siguientes factores: [NaOH], [AG], [AgNO₃], tiempo de reacción y velocidad de agitación, afectaban significativamente la respuesta ψ . La significancia de los efectos principales y las interacciones entre factores de dos niveles se determinaron mediante ANOVA, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.8. El modelo de ANOVA para el FrFD es igual al mostrado en la ecuación 3.3., considerando únicamente los siguientes términos: efectos principales (A, B, C, D y E) e interacciones de segundo orden (AB, AC, AD, AE, BC, BD, BE, CD, CE y DE). Los términos cuadráticos y las interacciones de orden superior no pueden estimarse con el FrFD planteado. Al analizar tablas de ANOVA, resulta de interés la inspección del estadístico F a partir del cual se realizan las pruebas de contraste de hipótesis y, particularmente, de la probabilidad (p-valor) de cada efecto analizado. Para los resultados del ANOVA del FrFD, el test de hipótesis se plantea para cada término presente en el modelo, con una hipótesis nula $H_0: \tau_- = \tau_+ = 0$ (no hay efecto del término analizado sobre la respuesta) e hipótesis alternativa $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos un i (hay efecto del término analizado sobre la respuesta), con τ_- igual al efecto en el nivel – del factor analizado y τ_+ el efecto en el nivel +. Para aquellas fuentes de variación en las que se obtengan p-valor menores al nivel de significancia evaluado (que en este caso es igual a 0,05), la hipótesis nula se rechaza y se concluye que el efecto es significativo sobre la respuesta ψ . De acuerdo a las pruebas de hipótesis y los valores informados en la tabla 3.8., resultan significativos con una confianza del 95 % los factores principales [AgNO₃], [AG] y tiempo de reacción, y la interacción de segundo orden [NaOH]*velocidad de agitación.

Tabla 3.8. Análisis de la varianza para el diseño factorial fraccional 2_V^{5-1} .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.*	Cuadrado medio	F	p
Modelo	18,850	12	1,570	18,25	<0,0001
A [NaOH]	0,030	1	0,030	0,35	0,5579
B [AgNO ₃]	1,130	1	1,130	13,09	0,0012
C [AG]	8,940	1	8,940	103,96	<0,0001
D Tiempo de reacción	7,450	1	7,450	86,59	<0,0001
E Velocidad agitación	0,023	1	0,023	0,26	0,6124
AB	0,028	1	0,028	0,33	0,5727
AC	0,001	1	0,001	0,02	0,8982
AD	0,003	1	0,003	0,04	0,8525
AE	0,700	1	0,700	8,08	0,0084
BC	0,000	0			
BD	0,330	1	0,330	3,81	0,0613
BE	0,000	0			
CD	0,036	1	0,036	0,42	0,5231
CE	0,000	0			
DE	0,001	1	0,001	0,01	0,9358
Curvatura	1,920	1	1,920	125,45	<0,0001
Residuales	2,320	27	0,086		
Falta de ajuste	2,120	17	0,120	6,18	0,0029
Error puro	0,200	10	0,020		
Total	21,800	40			

* Grados de libertad

Estos resultados pueden visualizarse mejor mediante un diagrama de Pareto (Fig. 3.3.), donde la línea vertical indica el t-valor crítico (t-valor: 2,059) y las barras horizontales corresponden a las pruebas t-Student para cada efecto analizado. Como se mencionó anteriormente, todos aquellos efectos con valores mayores al crítico resultan significativos al 95 % de confianza.

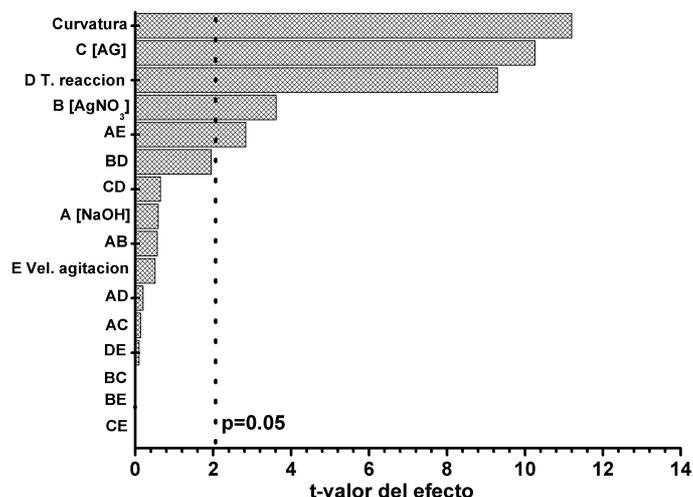


Fig. 3.3. Determinación gráfica de los factores significativos del diseño factorial fraccional mediante un diagrama de Pareto. La línea vertical indica un t-valor igual a 2,059 que es el valor crítico para una confianza del 95 % del diseño FrFD generado.

Sin embargo, en el ANOVA se detectó significancia de la falta de ajuste (LOF, *lack of fit*) en este modelo de primer orden de la respuesta ψ , en consonancia con la presencia de curvatura (efectos de segundo orden o cuadráticos).¹⁹ La falta de ajuste es un parámetro estadístico que indica, cuando es significativa, que los datos experimentales no pueden ser explicados mediante el modelo planteado. Si hay falta de ajuste no es posible estimar correctamente los coeficientes de regresión del modelo. Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta analizada tiene dependencia cuadrática con al menos alguno de los factores. Por este motivo, se procedió a emplear una metodología de superficies de respuestas de segundo orden basada en un BBD (Tabla 3.7.) para obtener funciones matemáticas capaces de modelar las respuestas espectroscópicas objetivo (A_{max} , λ_{max} , FWHM) como una función de los factores principales significativos determinados mediante FrFD: $[AgNO_3]$ (B), $[AG]$ (C) y tiempo de reacción (D). Para poder ajustar los niveles de los factores interactuantes ($[NaOH]$ *velocidad de agitación) en el BBD, se evaluó la interacción entre los factores, y se eligió como combinación óptima aquella usada como punto central (740 μM de $[NaOH]$ y una velocidad de agitación igual a 5,5 en una escala del 1 al 10) ya que, si bien ofrece una respuesta media menor, puede

proveer resultados más precisos, ya que la diferencia entre valor máximo y mínimo de ψ es menor (≈ 50 , Tabla 3.5.) que la obtenida trabajando en condiciones extremas (≈ 300 , Tabla 3.5.).¹⁹

Cada respuesta estudiada pudo ajustarse a los datos experimentales a través regresión múltiple y la metodología de cuadrados mínimos. La validez estadística del modelo del BBD, un polinomio de segundo orden como el de la ecuación 3.4., se confirmó mediante ANOVA, determinando los términos significativos y los p-valores de la LOF para cada respuesta mediante los test de hipótesis correspondientes, análogos a los mostrados para el ANOVA de FrFD. La tabla 3.9. resume estos resultados, y se muestran junto a los valores de R-cuadrado (R^2), R-cuadrado de ajuste (R^2_{adj}) y R-cuadrado de predicción (R^2_{pred}). La tabla de ANOVA completa para el análisis del BBD puede consultarse en el anexo A de la tesis.

Para las respuestas A_{max} y FWHM los efectos significativos fueron los mismos, e incluyen términos lineales ($[\text{AgNO}_3]$, $[\text{AG}]$, tiempo de reacción), cuadráticos ($[\text{AG}]^2$, tiempo de reacción²) y de interacción ($[\text{AgNO}_3] \times [\text{AG}]$ y $[\text{AgNO}_3] \times$ tiempo de reacción). La posición del máximo del plasmón (λ_{max}), solo depende de los términos lineales de $[\text{AgNO}_3]$ y $[\text{AG}]$.

Tabla 3.9. Términos significativos y resumen de los parámetros estadísticos de la RSM para la optimización de la síntesis de AgNPs.

	Términos	R^2	R^2_{adj}	R^2_{pred}	p-valor LOF	Modelo de ajuste
A_{max}	B, C, D, BC, BD, C ² , D ²	0,9928	0,9856	0,8963	0,0714	$A_{\text{max}} = 1,76 \times 10^{-3} + 2,20 \times 10^{-4} B + 2,77 \times 10^{-3} C - 1,02 \times 10^{-3} D + 2,2 \times 10^{-5} BC - 8 \times 10^{-6} BD - 7,6 \times 10^{-5} C^2 + 3,8 \times 10^{-5} D^2$
$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	B, C	0,9123	0,8976	0,8578	0,3936	$\lambda_{\text{max}} = 404,9 - 0,067 B + 0,092 C$
FWHM / nm	B, C, D, BC, BD, C ² , D ²	0,9655	0,9311	0,8173	0,4632	$\text{FWHM} = 73,3 - 0,0478 B + 0,0305 C + 0,317 D - 2,5 \times 10^{-3} BC + 1,17 \times 10^{-3} BD + 6,69 \times 10^{-3} C^2 - 8,95 \times 10^{-3} D^2$

Para todas las respuestas analizadas, los p-valores para la falta de ajuste (LOF) no fueron significativos al nivel de significancia evaluado ($p > 0,05$) indicando que los

modelos de ajuste son adecuados. Los coeficientes de regresión pudieron estimarse mediante la regresión múltiple, y se construyeron los modelos de ajuste de la tabla 3.9., que representan como varía cada respuesta respecto de los tres factores analizados. El modelo para A_{\max} explica la variabilidad de los datos en un 98,56 % ($R^2_{\text{adj}} = 0,9856$) y puede predecir un 89,63 % de variabilidad de los datos futuros ($R^2_{\text{pred}} = 0,8963$), demostrando satisfactoriamente la fiabilidad de los resultados. En el caso del ancho de banda a media altura (FWHM), 93,11 % de la variabilidad de los datos ($R^2_{\text{adj}} = 0,9311$) y 81,73 % ($R^2_{\text{pred}} = 0,8173$) de la variabilidad de datos futuros pueden explicarse a través del modelo matemático y, finalmente, para el caso de λ_{\max} el modelo es capaz de explicar el 89,76 % ($R^2_{\text{adj}} = 0,8976$) de la variabilidad entre los datos y un 85,78 % de datos futuros ($R^2_{\text{pred}} = 0,8578$). En todos los casos los resultados son consistentes, ya que la diferencia entre los valores de R^2_{adj} y R^2_{pred} es menor a 0,2 como se sugiere en bibliografía para modelos válidos.^{40,41}

Para las tres respuestas, se analizaron los gráficos de diagnóstico (distribución de probabilidad normal, residuales vs. predichos, transformación de Box-Cox)³² y se comprobó que los modelos resultantes puedan aplicarse a los sistemas bajo estudio, y que explican apropiadamente los resultados obtenidos. Las gráficas de diagnóstico se presentan en el anexo A de la tesis.

Las superficies de respuesta se construyeron utilizando las ecuaciones presentadas en la tabla 3.9. (Fig. 3.4., 3.5. y 3.6.). Cada gráfico tridimensional muestra el comportamiento de una respuesta en particular en función de dos factores, y la forma de las superficies resultantes refleja las interacciones y las curvaturas de las variables, cuando corresponde.

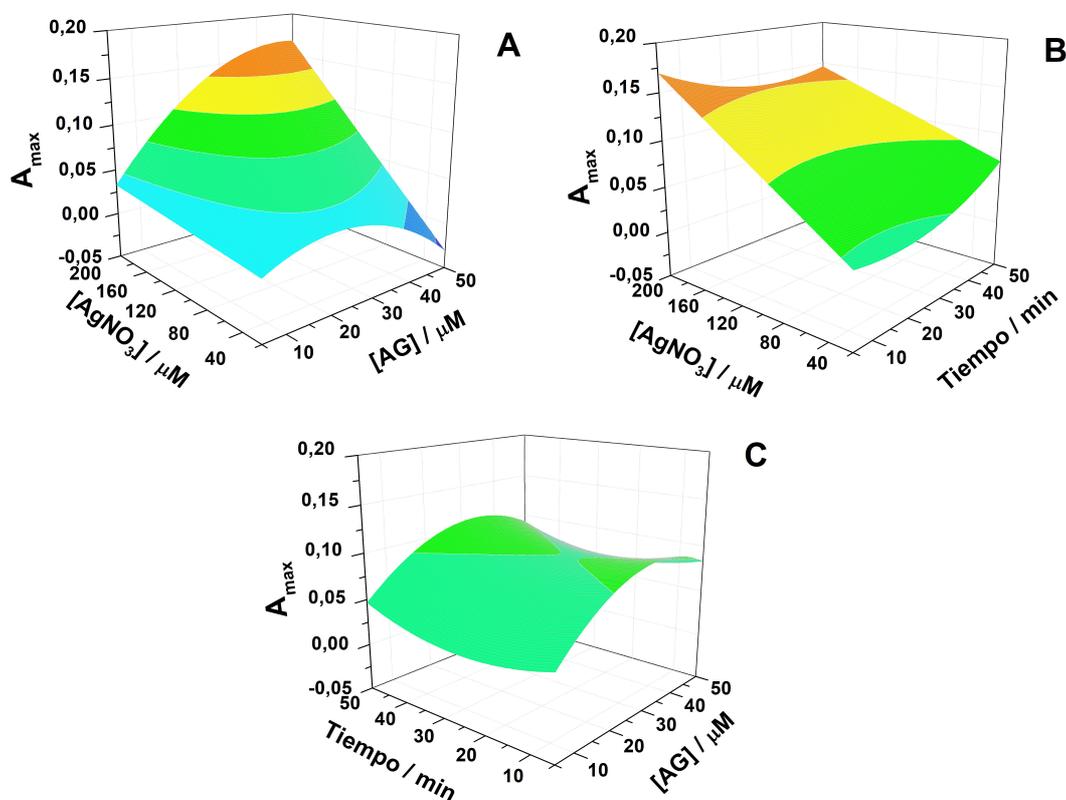


Fig. 3.4. Superficies de respuesta para A_{max} como función de las variables del diseño Box-Behnken: **A)** $[AgNO_3]$ y $[AG]$, **B)** $[AgNO_3]$ y tiempo de reacción y **C)** $[AG]$ y tiempo de reacción.

Las figuras 3.4.A-C representan A_{max} vs. $[AgNO_3]$ y $[AG]$, contra $[AgNO_3]$ y el tiempo de reacción, y finalmente contra $[AG]$ y el tiempo de reacción, respectivamente. Se puede observar que A_{max} aumenta con el incremento de la concentración de Ag^+ (Fig. 3.4.A y 3.4.B), que es lo que se espera ya que esta respuesta está relacionada con la concentración de AgNPg que depende de la concentración del ión metálico precursor. También es evidente la dependencia cuadrática de la respuestas sobre $[AG]$ y el tiempo de reacción (Fig. 3.4.C).

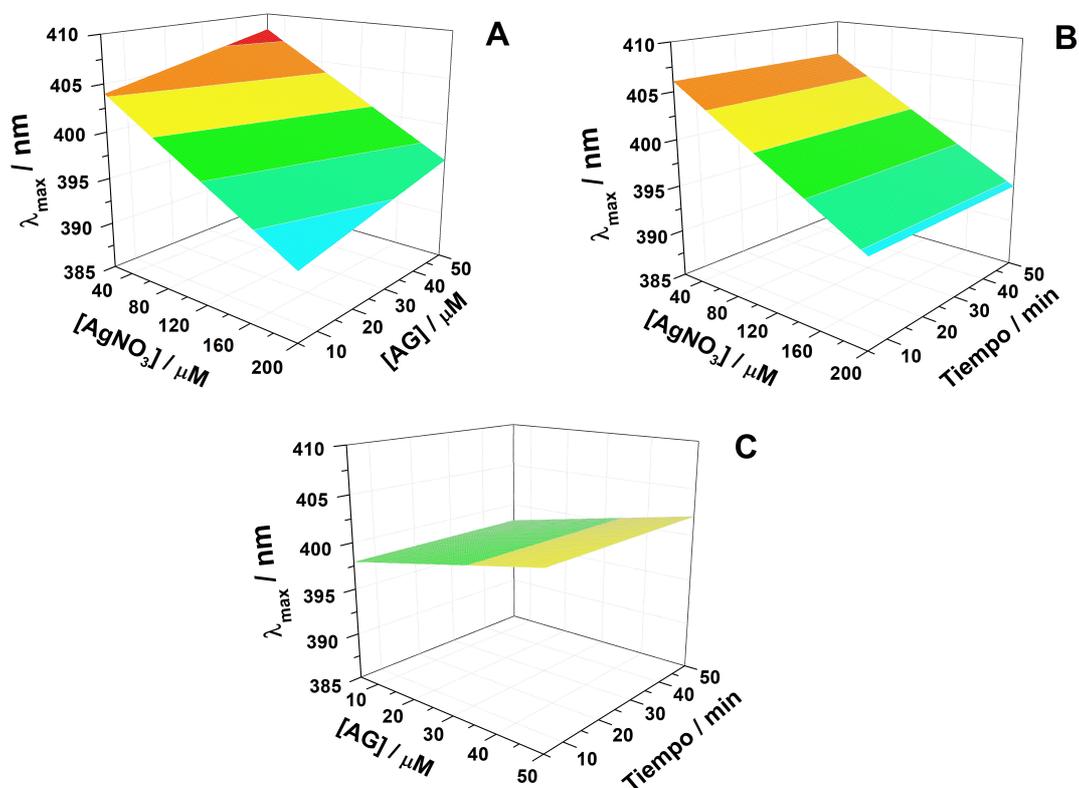


Fig. 3.5. Superficies de respuesta para λ_{max} como función de las variables del diseño Box-Behnken: **A)** $[AgNO_3]$ y $[AG]$, **B)** $[AgNO_3]$ y tiempo de reacción y **C)** $[AG]$ y tiempo de reacción.

Las Fig. 3.5.A-C muestran la variación de λ_{max} con $[AgNO_3]$ y $[AG]$, con $[AgNO_3]$ y el tiempo de reacción, y con $[AG]$ y el tiempo de reacción, respectivamente. Se puede observar claramente en la figura 3.3.A, que la longitud de onda máxima de la banda SPR experimenta un corrimiento batocrómico cuando $[AG]$ aumenta o $[AgNO_3]$ disminuye. Estos resultados principalmente reflejan que las nanopartículas presentaran dimensiones mayores a bajas concentraciones de $AgNO_3$. El tiempo de reacción no tiene una influencia significativa sobre la posición de λ_{max} (Fig. 3.5.B y 3.5.C).

Con respecto al FWHM, parámetro relacionado íntimamente con la polidispersidad de la muestra, las Fig. 3.6.A-C muestran los perfiles de las superficies

de respuesta obtenidos para $[AgNO_3]$ y $[AG]$, $[AgNO_3]$ y el tiempo de reacción, y con $[AG]$ y el tiempo de reacción. Se puede observar que el ancho de banda menor se obtiene con un alta concentración de ión metálico precursor y baja concentración de agente reductor (Fig. 3.6.A), lo que indica que esta combinación puede llevar a la obtención de muestras más monodispersas. Para esta respuesta, nuevamente es evidente la dependencia cuadrática de la misma con los factores $[AG]$ y tiempo de reacción (Fig. 3.6.C), al igual que para la respuesta A_{max} .

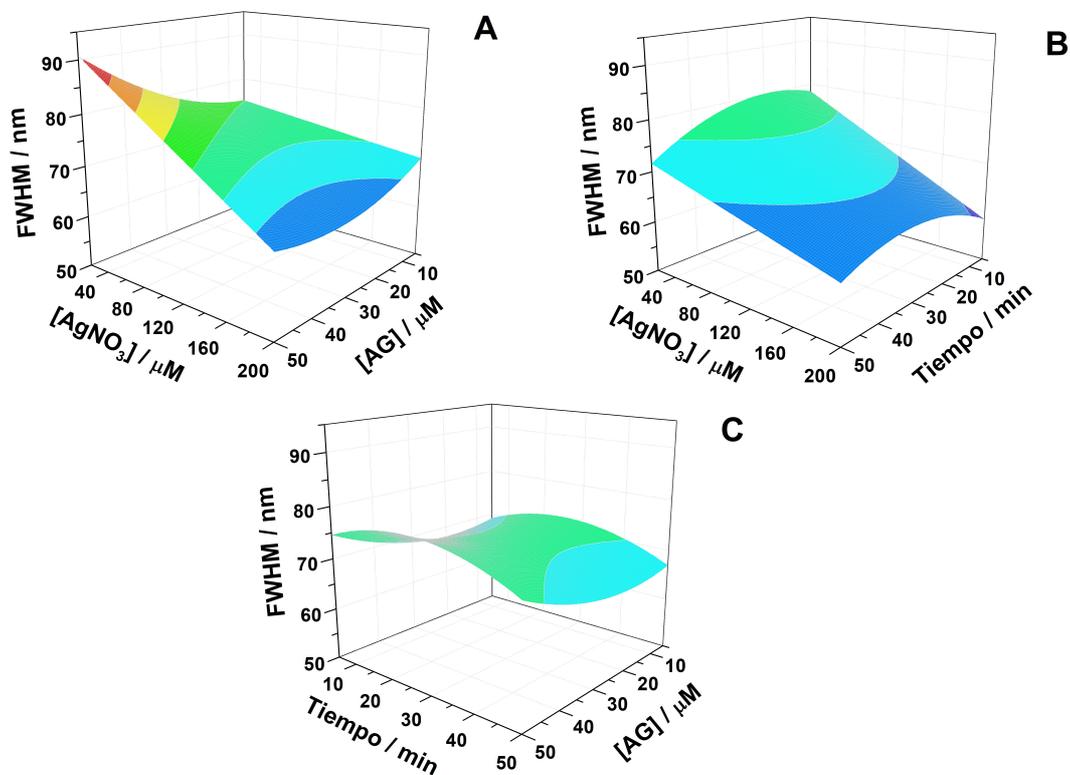


Fig. 3.6. Superficies de respuesta para FWHM como función de las variables del diseño Box-Behnken: **A)** $[AgNO_3]$ y $[AG]$, **B)** $[AgNO_3]$ y tiempo de reacción y **C)** $[AG]$ y tiempo de reacción.

3.4.1.1. Condiciones óptimas en la síntesis de AgNPs

En una optimización de múltiples respuestas, la función deseabilidad (FD) propuesta por Derringer y Suich³⁷ es una de las herramientas quimiométricas más

populares utilizadas para encontrar condiciones experimentales que alcancen simultáneamente, el valor óptimo para todos los factores evaluados.³⁸ En este caso, se propuso como objetivo obtener AgNPg con el menor diámetro medio posible, monodispersas y con una alta concentración. Entonces, se asignó una deseabilidad con un valor de 1 para la mayor respuesta obtenida en el BBD (Tabla 3.3.) para el caso de A_{max} , y la menor respuesta obtenida para el caso de λ_{max} y de FWHM; a la situación inversa (menor respuesta para A_{max} y mayor respuesta para λ_{max} y FWHM) se le asignó una deseabilidad igual a 0. Para lograr este objetivo, cada respuesta fue maximizada o minimizada, según corresponda, con un grado de prioridad +++ (3 de 5). Esta prioridad está relacionada con el exponente r en la Ec. 3.6. Los factores que no resultaron significativos y no se analizaron en el BBD, se mantuvieron en el nivel informado por la literatura, [NaOH] igual a 740 μM y una velocidad de agitación igual a 5,5 (en una escala del 1 al 10). Así, la solución óptima obtenida presentó una deseabilidad igual a 0,959 (Tabla 3.10.).

Tabla 3.10. Restricciones de los factores y respuestas para la optimización y solución obtenida mediante FD.

<i>Restricciones</i>				
Nombre	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia (1-5)
[AgNO ₃] / μM	Dentro del rango	20	200	+++
[AG] / μM	Dentro del rango	5	50	+++
Tiempo de reacción / min	Dentro del rango	5	50	+++
A_{max}	Maximizar	0,016	0,167	+++
λ_{max} / nm	Minimizar	393,5	406,5	+++
FWHM / nm	Minimizar	58,5	96,0	+++
<i>Solución</i>				
[AgNO₃] / μM	[AG] / μM	Tiempo de reacción / min	Deseabilidad	
200	27,250	5	0,959	

Finalmente, se predijeron los valores que las diferentes respuestas pueden tomar

en los niveles óptimos de los factores estudiados, utilizando los modelos de ajuste presentados en la tabla 3.5. Para verificar estas predicciones, se sintetizaron AgNPg utilizando las condiciones óptimas determinadas e indicadas en la tabla 3.10. (6 replicados), y se compararon las respuestas obtenidas con los valores predichos por el modelo de ajuste. La comparación demostró un excelente grado de acuerdo ente los datos predecidos y los datos experimentales dentro del intervalo de predicción (IP) con un 95 % de confianza (Tabla 3.11.).

Tabla 3.11. Prueba de predicción para la síntesis optimizada.

Respuesta	Media de la predicción	Desviación estándar	n	Media experimental (\bar{x})	IP 95 % confianza
A_{\max}	0,167	0,006	6	0,16	$0,150 < \bar{x} < 0,180$
λ_{\max} / nm	394	1	6	395	$392 < \bar{x} < 396$
FWHM / nm	58	1	6	61,5	$54,9 < \bar{x} < 62,1$

3.4.2. Optimización de la centrifugación post-síntesis

Además de encontrar las condiciones de síntesis óptimas que llevan a la producción de las AgNPg deseadas, el protocolo post-síntesis, como la centrifugación, es también una etapa relevante del proceso. La limpieza post-síntesis se lleva a cabo usualmente para pre-concentrar las NP obtenidas, además de favorecer la eliminación de precursores o reactivos que no reaccionaron, así también como el exceso de agentes estabilizantes. En este caso, se seleccionó a la centrifugación como tratamiento post-síntesis. Como el objetivo final es mejorar la reproducibilidad entre diferentes lotes para este tipo particular de AgNP, se decidió evaluar de forma separada como la centrifugación afecta la respuesta ψ . En este caso, se empleó un diseño univariado (Tabla 3.12.), que se analizó mediante ANOVA. El modelo de ajuste (Ec. 3.8.) obtenido por regresión no lineal corresponde a un polinomio de segundo orden donde tanto el término cuadrático (p-valor=0,0049) como el lineal (p-valor<0,0001) resultaron significativos al 95 % de confianza. Para el modelo se obtuvo un p-valor de la falta de ajuste igual a 0,9111 indicando la adecuación del

modelo junto a los coeficientes de regresión ($R^2_{adj} > 0,964$ y $R^2_{pred} > 0,920$) que explican la variabilidad de un 96,4 % de los datos y un 92 % de la variabilidad de datos futuros, respectivamente.

Tabla 3.12. Experimentos del diseño univariado para la centrifugación post-síntesis y respuestas obtenidas.

Estándar	Corrida	Vel. Centrifugación / rpm	Respuestas			
			$A_{max}/u.a.$	λ_{max}/nm	FWHM/nm	$\psi / 10^{-8} nm^{-2}$
1	2	1000	0,041	406,0	94,5	106,86
2	7	1000	0,020	402,5	169,0	29,40
3	3	2750	0,058	415,5	194,0	71,95
4	1	4500	0,163	417,0	136,0	287,42
5	8	4500	0,021	406,5	79,0	179,41
6	6	6250	0,221	410,0	92,0	585,90
7	4	8000	0,301	406,5	68,0	1088,90
8	5	8000	0,257	406,0	70,5	897,80

$$\psi(10^{-6}) = 1,19 - 7,8 \times 10^{-4} x + 2,4 \times 10^{-7} x^2 \quad \text{Ec. 3.8.}$$

En la ecuación 3.8., la velocidad de centrifugación x se expresa en revoluciones por minuto (rpm). De acuerdo a este modelo, aumentar la velocidad de centrifugación maximizará la respuesta ψ , por lo que el límite está definido por el espacio de diseño. En este caso, este límite corresponde a 8000 rpm (o 8228 rcf). Nuevamente, se evaluó la capacidad de predicción comparando el valor predicho por el modelo con el valor experimental obtenido de la preparación de 6 replicados en las condiciones óptimas. La respuesta obtenida tomó un valor igual a $100 \times 10^{-7} nm^{-2}$, que no presenta diferencias significativas al 95 % de confianza con el valor de predicción igual a $103 \times 10^{-7} nm^{-2}$, indicando la validez del modelo cuadrático.

3.4.3. Performance del método de síntesis optimizado

Para evaluar el desempeño del método de síntesis propuesto, se realizaron estudios de precisión intraensayo (repetibilidad) analizando 10 replicados preparados

por el mismo operador bajo idénticas condiciones en el mismo día. El coeficiente de variación obtenido después de evaluar la respuesta ψ fue del 2 %. La figura 3.7. muestra una comparación entre los espectros de absorción medidos para AgNPg sintetizadas utilizando el método optimizado aquí propuesto (AgNPg^{opt}) y aquellas sintetizadas en condiciones no óptimas (síntesis original de literatura), donde el CV % es del 23,2 %.

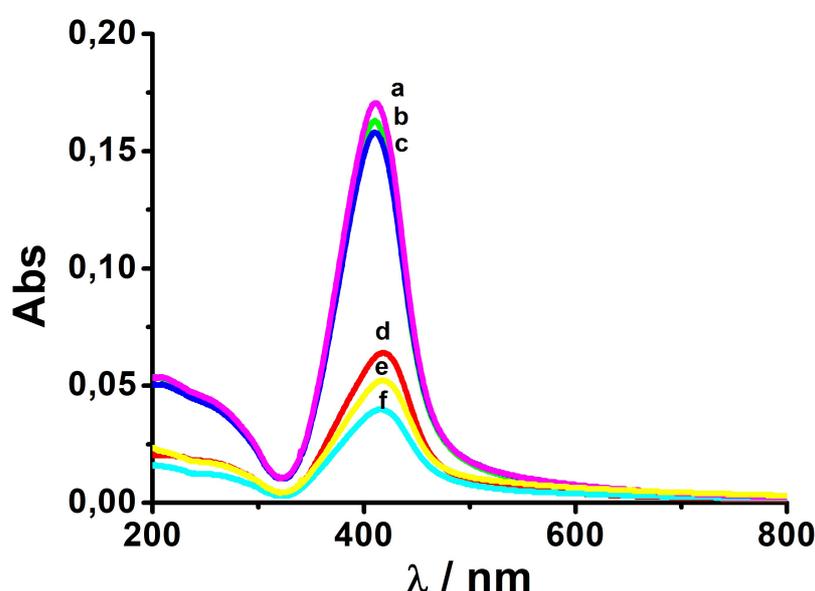


Fig. 3.7. Espectros de absorción para (a-c) tres diferentes lotes de AgNPg^{opt} y (d-f) tres diferentes lotes de AgNPg. Solvente: agua. Temperatura: 25,0 °C.

Además, se determinó la precisión intermedia mediante el análisis de 10 replicados de AgNPg^{opt} sintetizados por el mismo operador bajo idénticas condiciones, pero en tres días diferentes. Los resultados del ANOVA indicaron que no existen diferencias significativas entre las respuestas obtenidas en diferentes días (p -valor=0,438). Un ensayo de reproducibilidad también se llevó a cabo usando muestras ($n=4$) sintetizadas usando diferentes soluciones de reactivos de partida, material de vidrio y dos diferentes operadores en diferentes días. Nuevamente, el ANOVA demostró que no existen diferencias significativas al 95 % de confianza entre

las diferentes respuestas espectroscópicas obtenidas (p -valor=0,598).

También, se determinó el tamaño promedio para cuatro diferentes lotes de AgNPg^{opt} usando los histogramas (Fig. 3.8.) obtenidos a partir de múltiples imágenes de TEM (Fig 3.9.).

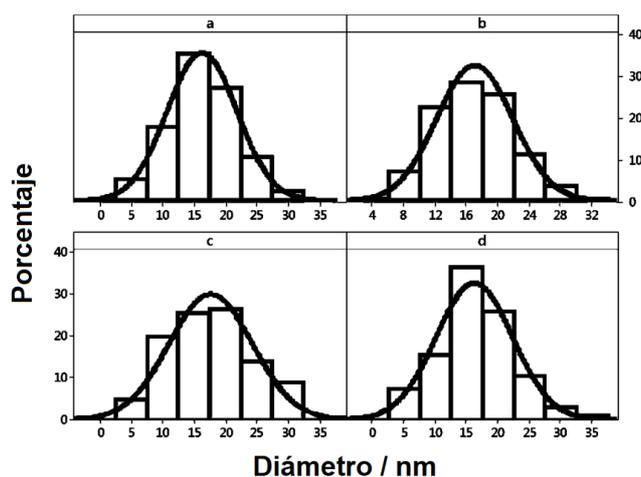


Fig. 3.8. Histogramas de cuatro lotes diferentes de AgNPg^{opt} mostrando la distribución de tamaños de acuerdo a imágenes de TEM. Los diámetros promedio expresados en nm fueron: a- 16,3 (SD=5,6); b- 17,0 (SD=4,9); c- 17,7 (SD=6,6); d- 16,2 (SD=6,1).

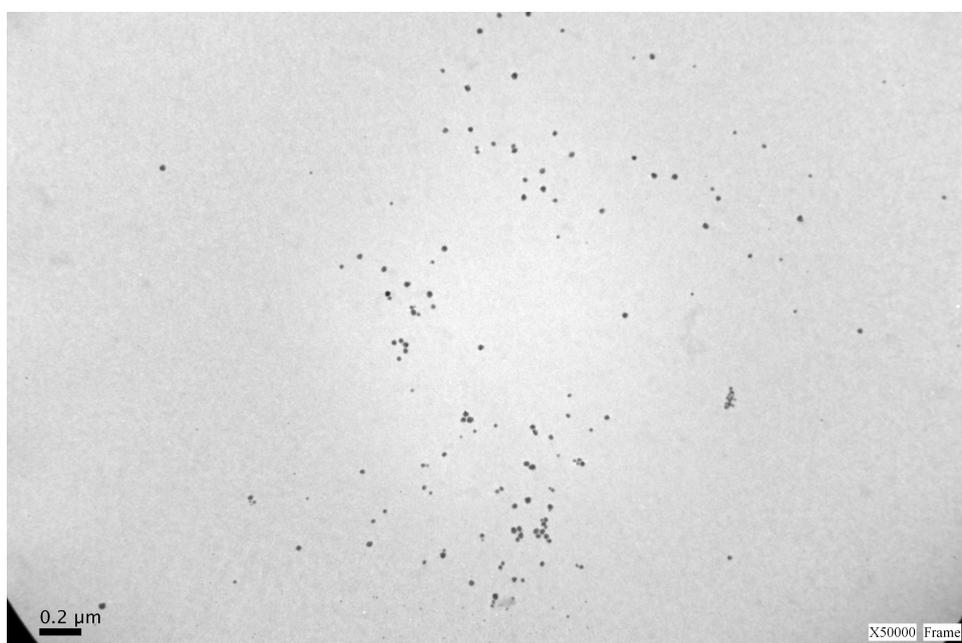


Fig. 3.9. Micrografía TEM representativa de las partículas esféricas de AgNPg^{opt}.

Para poder corroborar que los diámetros medios son iguales con una significancia (α) de 0,05; se llevó a cabo una comparación múltiple mediante el método de Games-Howell.⁴² La comparación múltiple de medias permite examinar cuales medias de un conjunto analizado son diferentes, y estimar en que medida lo son. El test de Games-Howell permite obtener conclusiones estadísticas al comparar, de a pares, las medias de dos o más poblaciones para las cuales no se asume igual varianza. La metodología se basa en la ecuación de grados de libertad de Welch⁴³ y provee un intervalo para la diferencia entre cada par de medias. La comparación múltiple de Games-Howell plantea como hipótesis nula que todas las diferencias de a pares son cero (medias iguales). De este modo, si todos los intervalos de comparación en el análisis gráfico contienen el cero, la hipótesis nula se acepta y se concluye que todas las medias comparadas son iguales al nivel de significancia evaluado. La figura 3.10. muestra los resultados del test de Games-Howell de la comparación de los tamaños medios de las AgNPg^{opt}. Los resultados muestran que todos los intervalos contienen el valor cero, por lo que se puede afirmar que los tamaños medios obtenidos son iguales.⁴⁴

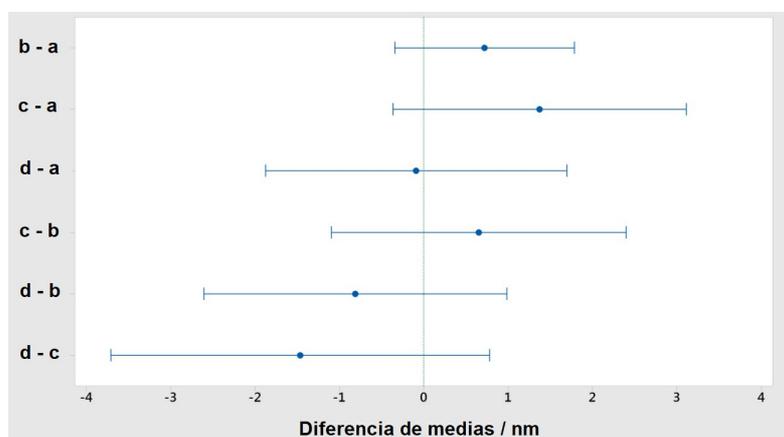


Fig. 3.10. Comparación múltiple de medias mediante el método de Games-Howell para cuatro lotes de AgNPg^{opt} (a, b, c, d). La línea vertical representa una diferencia igual a 0.

Por otro lado, el índice de polidispersidad (IPD) se determinó mediante medidas de dispersión dinámica de luz de los cuatro lotes de AgNPg^{opt}. Los valores obtenidos fueron iguales para los cuatro lotes con una confianza del 95 %, obteniéndose un IPD promedio igual a 0,243, que indica que las nanopartículas son monodispersas, ya que

usualmente un IPD de 0,2 representa una muestra monodispersa.⁴⁵

Usando tres lotes independientes, se llevó a cabo un ensayo para estimar el tiempo de vida útil de las AgNPg^{opt} antes de que la respuesta espectroscópica disminuya un 20 %. Este valor fue asignado arbitrariamente y se consideró que variaciones de ψ por encima del mencionado límite corresponden a AgNPg^{opt} “envejecidas”, que no necesariamente tienen las mismas propiedades que las prístinas. La respuesta ψ se monitoreó para cada lote de síntesis por 25 días, y se ajustaron los datos mediante regresión no lineal (Fig. 3.11).

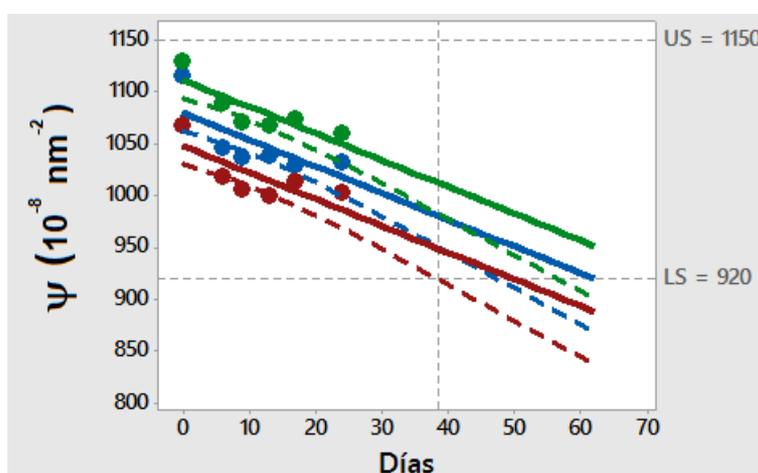


Fig. 3.11. Variación de la respuesta espectroscópica ψ en el tiempo de tres lotes independientes de AgNPg^{opt} (●, ●, ●). Ajustes no lineales en línea sólida coloreada. Banda de confianza inferior en línea punteada coloreada. (US) Límite superior e (LS) inferior de tolerancia. La línea vertical a puntos indica el tiempo de vida útil predicho.

A partir de los comportamientos promedio de los tres lotes analizados y el valor del límite inferior tolerado de ψ igual a $920 \times 10^{-8} \text{ nm}^{-2}$, se obtuvo un tiempo de vida útil estimado de alrededor de 38 días.

Además, se determinaron los potenciales zeta para estos lotes después de 120 días de realizarse la síntesis, obteniéndose un valor promedio igual a -25 mV, lo que indica que incluso después de largos períodos de tiempo estas nanopartículas tienen baja tendencia a flocular.⁴⁶

3.5. Conclusiones

Mediante un enfoque basado en un diseño de experimentos sistemático y utilizando una metodología de superficies de respuesta se encontraron las condiciones óptimas para obtener AgNPg estables con propiedades repetibles y reproducibles entre diferentes lotes (características espectroscópicas, tamaños, índices de polidispersidad, potencial zeta). Esta mejor reproducibilidad entre diferentes lotes de nanopartículas puede impactar disminuyendo los tiempos de caracterización de las mismas (por ejemplo, evitando la toma de múltiples imágenes de TEM) y, en consecuencia, permitiendo su aplicación inmediatamente después de la síntesis.

3.6. Referencias

- (1) Hornyak, G. L.; Dutta, J.; Tibbals, H. F.; Rao, A. *Introduction to Nanoscience*; CRC Press: Boca Raton, 2012. <https://doi.org/10.1201/b12835>.
- (2) Ahumada, M.; Lissi, E.; Montagut, A. M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Pacioni, N. L.; Alarcon, E. I. Association Models for Binding of Molecules to Nanostructures. *The Analyst* **2017**, *142* (12), 2067–2089. <https://doi.org/10.1039/C7AN00288B>.
- (3) Crites, C.-O. L.; Hallett-Tapley, G. L.; Frenette, M.; González-Béjar, M.; Netto-Ferreira, J. C.; Scaiano, J. C. Insights into the Mechanism of Cumene Peroxidation Using Supported Gold and Silver Nanoparticles. *ACS Catal.* **2013**, *3* (9), 2062–2071. <https://doi.org/10.1021/cs400337w>.
- (4) Stampelcoskie, K. G.; Fasciani, C.; Scaiano, J. C. Dual-Stage Lithography from a Light-Driven, Plasmon-Assisted Process: A Hierarchical Approach to Subwavelength Features. *Langmuir* **2012**, *28* (30), 10957–10961. <https://doi.org/10.1021/la301728r>.
- (5) Scaiano, J. C.; Stampelcoskie, K. Can Surface Plasmon Fields Provide a New Way to Photosensitize Organic Photoreactions? From Designer Nanoparticles to Custom Applications. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4* (7), 1177–1187. <https://doi.org/10.1021/jz400002a>.
- (6) Gill, R.; Tian, L.; Somerville, W. R. C.; Le Ru, E. C.; van Amerongen, H.; Subramaniam, V. Silver Nanoparticle Aggregates as Highly Efficient Plasmonic Antennas for Fluorescence Enhancement. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (31), 16687–16693. <https://doi.org/10.1021/jp305720q>.
- (7) Chiolerio, A.; Rajan, K.; Roppolo, I.; Chiappone, A.; Bocchini, S.; Perrone, D. Silver Nanoparticle Ink Technology: State of the Art. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, *1*. <https://doi.org/10.2147/NSA.S68080>.

- (8) Alarcon, E. I.; Vulesevic, B.; Argawal, A.; Ross, A.; Bejjani, P.; Podrebarac, J.; Ravichandran, R.; Phopase, J.; Suuronen, E. J.; Griffith, M. Coloured Cornea Replacements with Anti-Infective Properties: Expanding the Safe Use of Silver Nanoparticles in Regenerative Medicine. *Nanoscale* **2016**, *8* (12), 6484–6489. <https://doi.org/10.1039/C6NR01339B>.
- (9) Mclaughlin, S.; Podrebarac, J.; Ruel, M.; Suuronen, E. J.; McNeill, B.; Alarcon, E. I. Nano-Engineered Biomaterials for Tissue Regeneration: What Has Been Achieved So Far? *Front. Mater.* **2016**, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmats.2016.00027>.
- (10) Wang, C.; Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors. In *Silver Nanoparticles*; Pozo, D., Ed.; InTech, 2010. <https://doi.org/10.5772/8517>.
- (11) Pacioni, N. L.; Borsarelli, C. D.; Rey, V.; Veglia, A. V. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In *Silver Nanoparticle Applications*; Alarcon, E. I., Griffith, M., Udekwu, K. I., Eds.; Engineering Materials; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 13–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6_2.
- (12) Rycenga, M.; Cobley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (6), 3669–3712. <https://doi.org/10.1021/cr100275d>.
- (13) Sun, Y. Controlled Synthesis of Colloidal Silver Nanoparticles in Organic Solutions: Empirical Rules for Nucleation Engineering. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (7), 2497–2511. <https://doi.org/10.1039/C2CS35289C>.
- (14) Yoosaf, K.; Ipe, B. I.; Suresh, C. H.; Thomas, K. G. In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (34), 12839–12847. <https://doi.org/10.1021/jp073923q>.
- (15) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (16) Martinez-Gutierrez, F.; Olive, P. L.; Banuelos, A.; Orrantia, E.; Nino, N.; Sanchez, E. M.; Ruiz, F.; Bach, H.; Av-Gay, Y. Synthesis, Characterization, and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Silver and Titanium Nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, *6* (5), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.001>.
- (17) 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.* **2016**, *18* (6), 166. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3466-2>.
- (18) Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, Eighth edition.; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, 2013.
- (19) Gardiner, W. P.; Gettinby, G. *Experimental Design Techniques in Statistical Practice: A Practical Software-Based Approach*; Horwood series in mathematics

- & applications; Horwood Pub: Chichester, W. Sussex, England, 1998.
- (20) Vasti, C.; Pfaffen, V.; Ambroggio, E.; Galiano, M. R.; Rojas, R.; Giacomelli, C. E. A Systematic Approach to the Synthesis of LDH Nanoparticles by Response Surface Methodology. *Appl. Clay Sci.* **2017**, *137*, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.12.023>.
- (21) Wang, H.-C.; Wu, C.-Y.; Chung, C.-C.; Lai, M.-H.; Chung, T.-W. Analysis of Parameters and Interaction between Parameters in Preparation of Uniform Silicon Dioxide Nanoparticles Using Response Surface Methodology. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45* (24), 8043–8048. <https://doi.org/10.1021/ie060299f>.
- (22) Eising, R.; Signori, A. M.; Fort, S.; Domingos, J. B. Development of Catalytically Active Silver Colloid Nanoparticles Stabilized by Dextran. *Langmuir* **2011**, *27* (19), 11860–11866. <https://doi.org/10.1021/la2029164>.
- (23) 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* **2010**, *26* (22), 17772–17779. <https://doi.org/10.1021/la103408s>.
- (24) Lim, J. H.; Lee, J. S. A Statistical Design and Analysis Illustrating the Interactions between Key Experimental Factors for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *322* (1–3), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.03.014>.
- (25) Liu, X.; Liu, W.; Wang, C.; Zheng, Z. Optimization and Modeling for One-Step Synthesis Process of Ag–Cu Nano-Particles Using DOE Methodology. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2016**, *27* (5), 4265–4274. <https://doi.org/10.1007/s10854-016-4292-0>.
- (26) Sheludchenko, B.; Šarauskis, E.; Kukharets, S.; Zabrodskyi, A. Graphic Analytical Optimization of Design and Operating Parameters of Tires for Drive Wheels of Agricultural Machinery. *Soil Tillage Res.* **2022**, *215*, 105227. <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.105227>.
- (27) Haque, S. M. Box–Behnken Experimental Design for Optimizing the HPLC Method to Determine Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluid. *J. Mol. Liq.* **2022**, *352*, 118708. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118708>.
- (28) Declercq, J.; Van Damme, K. F. A.; De Leeuw, E.; Maes, B.; Bosteels, C.; Tavernier, S. J.; De Buyser, S.; Colman, R.; Hites, M.; Verschelden, G.; Fizez, T.; Moerman, F.; Demedts, I. K.; Dauby, N.; De Schryver, N.; Govaerts, E.; Vandecasteele, S. J.; Van Laethem, J.; Anguille, S.; van der Hilst, J.; Misset, B.; Slabbynck, H.; Wittebole, X.; Liénart, F.; Legrand, C.; Buyse, M.; Stevens, D.; Bauters, F.; Seys, L. J. M.; Aegerter, H.; Smole, U.; Bosteels, V.; Hoste, L.; Naesens, L.; Haerynck, F.; Vandekerckhove, L.; Depuydt, P.; van Braeckel, E.; Rottey, S.; Peene, I.; Van Der Straeten, C.; Hulstaert, F.; Lambrecht, B. N. Effect of Anti-Interleukin Drugs in Patients with COVID-19 and Signs of Cytokine Release Syndrome (COV-AID): A Factorial, Randomised, Controlled Trial. *Lancet Respir. Med.* **2021**, *9* (12), 1427–1438. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00377-5).
- (29) Carboni, O. A.; Medda, G. Forms of Extramural Research Acquisition and

- Product Innovation: Data from Econometric Estimations. *Data Brief* **2021**, *39*, 107567. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107567>.
- (30) Design of Experiments. In *Analytic Methods for Design Practice*; Park, G.-J., Ed.; Springer: London, 2007; pp 309–391. https://doi.org/10.1007/978-1-84628-473-1_6.
- (31) Yuangyai, C.; Nembhard, H. B. Chapter 8 - Design of Experiments: A Key to Innovation in Nanotechnology. In *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing (Second Edition)*; Ahmed, W., Jackson, M. J., Eds.; Micro and Nano Technologies; William Andrew Publishing: Boston, 2015; pp 230–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28990-0.00008-7>.
- (32) Booth, D. E. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. *Technometrics* **2004**, *46* (1), 110–110. <https://doi.org/10.1198/tech.2004.s738>.
- (33) Gunst, R. F.; Mason, R. L. Fractional Factorial Design. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2009**, *1* (2), 234–244. <https://doi.org/10.1002/wics.27>.
- (34) Antony, J. Fractional Factorial Designs. In *Design of Experiments for Engineers and Scientists*; Elsevier, 2014; pp 87–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099417-8.00007-9>.
- (35) Box, G. E. P.; Behnken, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* **1960**, *2* (4), 455–475. <https://doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>.
- (36) Ferreira, S. L. C.; Bruns, R. E.; Ferreira, H. S.; Matos, G. D.; David, J. M.; Brandão, G. C.; da Silva, E. G. P.; Portugal, L. A.; dos Reis, P. S.; Souza, A. S.; dos Santos, W. N. L. Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *597* (2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- (37) Derringer, G.; Suich, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* **1980**, *12* (4), 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>.
- (38) Vera Candioti, L.; De Zan, M. M.; Cámara, M. S.; Goicoechea, H. C. Experimental Design and Multiple Response Optimization. Using the Desirability Function in Analytical Methods Development. *Talanta* **2014**, *124*, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>.
- (39) Costa, N. R.; Lourenço, J.; Pereira, Z. L. Desirability Function Approach: A Review and Performance Evaluation in Adverse Conditions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, *107* (2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.004>.
- (40) Cuéllar, M.; Pfaffen, V.; Ortiz, P. I. Application of Multi-Factorial Experimental Design to Successfully Model and Optimize Inorganic Chromium Speciation by Square Wave Voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* **2016**, *765*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.07.050>.
- (41) Stat-Ease » v11 » General Sequence of Analysis » ANOVA Output » Interpretation of R-squared <https://www.statease.com/docs/v11/contents/analysis/interpretation-of-r-squared/> (accessed 2021 -11 -05).
- (42) Hsu, J. *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; CRC Press, 1996.

- (43) Welch, B. L. The Generalization of `Student's' Problem When Several Different Population Variances Are Involved. *Biometrika* **1947**, *34* (1/2), 28–35. <https://doi.org/10.2307/2332510>.
- (44) Rand R. Wilcox. *Applying Contemporary Statistical Techniques*; Academic Press, 2003.
- (45) Dynamic Light Scattering (DLS) | Common Terms Defined | Malvern Panalytical <https://www.malvernpanalytical.com/es/learn/knowledge-center/whitepapers/WP111214DLSTermsDefined> (accessed 2021 -11 -05).
- (46) Hunter, R. J. Chapter 2 - Charge and Potential Distribution at Interfaces. In *Zeta Potential in Colloid Science*; Hunter, R. J., Ed.; Academic Press, 1981; pp 11–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-361961-7.50006-7>.

4

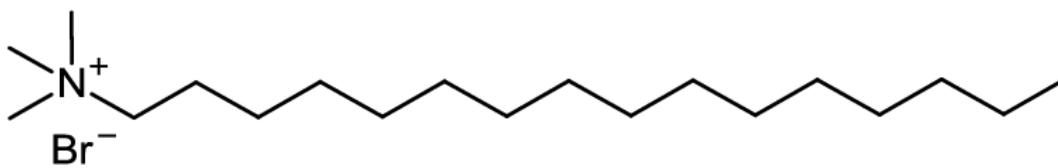
Síntesis de nanovarillas de plata en ausencia de surfactantes y semillas. Estimación de la concentración

4.1. Introducción

Entre otras nanoestructuras, desde las últimas décadas existe un creciente interés en la síntesis de partículas metálicas anisotrópicas como las nanovarillas de oro y plata para aplicaciones basadas en sus propiedades ópticas, principalmente debido a que exhiben dos bandas de resonancia de plasmón superficial, LSPR y TSPR.^{1,2} La posición de las bandas de la LSPR y la TSPR puede ajustarse con mucha precisión mediante el control de la relación de aspecto de las nanovarillas.^{3,4} Por otro lado, las partículas metálicas con forma de varilla han mostrado tener una mayor actividad en técnicas basadas en la dispersión Raman incrementada por el metal (SERS), a comparación con nanopartículas esféricas,⁵ lo que las hace excelentes candidatas en aplicaciones como sensores.⁶⁻⁹

Actualmente, se conocen varios enfoques para la fabricación de nanovarillas de plata (AgNR), que involucran tanto métodos químicos¹⁰⁻¹⁵ como procesos físicos.¹⁶ Sin embargo, todas estas metodologías usualmente requieren utilizar *templates* o plantillas que actúen como directores con el objetivo de controlar el crecimiento del cristal y, consecuentemente, la forma de la nanopartícula obtenida.^{10,12,13,15} Por mucho, la ruta sintética más utilizada para obtener AgNR es la metodología de crecimiento mediado por semillas.^{10,13,17,18} Este procedimiento involucra semillas de nanopartículas que se adicionan a una solución de

crecimiento que contiene, usualmente, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) – un surfactante catiónico – entre otros reactivos. El CTAB (esquema 4.1.) es capaz de formar micelas de forma cilíndrica en soluciones acuosas actuando, consecuentemente, como una plantilla suave para la formación de las partículas.^{10,18–20} Si bien todas estas metodologías sintéticas permiten controlar efectivamente la forma, las dimensiones y el rendimiento de la obtención de partículas, la remoción de los agentes directores (plantillas) de la superficie de los NR sintetizados puede requerir complicados tratamientos post-síntesis. El desarrollo de aplicaciones basadas en la adsorción de analitos sobre la superficie de la nanopartícula, necesitará la limpieza previa de la superficie de AgNR para deshacerse del surfactante que actúa como ligando.



Esquema 4.1. Estructura química del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), muy utilizado para la síntesis dirigida de nanovarillas metálicas.

Las aplicaciones de los nanomateriales son relevantes en diversos campos, sin embargo, es aún muy difícil evaluar con exactitud la concentración de estos materiales, principalmente debido a que las concentraciones obtenidas luego del proceso sintético son usualmente muy bajas para los métodos tradicionales de cuantificación²¹ – del orden de 10^{-9} M~ 10^{-12} M – y porque las muestras siempre se obtienen con un cierto grado de polidispersidad, incluso en metodologías sintéticas altamente controladas.²² La estimación exacta de la concentración de los nanomateriales es importante para obtener información confiable que describa los comportamientos observados en los sistemas nanoparticulados y, de esta manera, poder evitar resultados engañosos que deriven en conclusiones erróneas. Actualmente, hay pocas publicaciones que discutan este gran desafío en las nanociencias y ninguna, hasta donde se conoce, que tenga en cuenta la contribución a

la concentración total de las partículas no esféricas, más allá de la polidispersidad.^{22,23}

En este capítulo se describirá una metodología sintética para la preparación de AgNR sin la utilización de semillas de Ag ni surfactantes. Este método consiste en un proceso *one-pot* de dos pasos secuenciales, donde inicialmente se generan *in situ* centros de nucleación de Ag sobre los cuales posteriormente crecen partículas en forma de varillas durante el segundo paso de la reacción, debido a la adición de cantidades estrictamente controladas de hidróxido de sodio. Además, se presentará un algoritmo para estimar la concentración de partículas totales en sistemas multiforma, teniendo en cuenta la proporción en la que se encuentran las diferentes morfologías presentes y la polidispersidad de las mismas.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanovarillas de plata mediante una metodología que no involucre la utilización de surfactantes como agentes directores o semillas de plata.
- Caracterizar y evaluar las propiedades espectroscópicas y morfológicas de las nanopartículas obtenidas.
- Derivar un algoritmo que permita estimar la concentración de nanopartículas anisotrópicas y polidispersas, aún en sistemas que presenten múltiples morfologías.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos (grado analítico) como se recibieron, sin ningún protocolo de purificación previo: borohidruro de sodio (Tetraedron), citrato de trisodio (Anedra), acetato de sodio (Anedra), hidróxido de sodio (Merck), nitrato de plata (BioPack), carbazol 98 % (Sigma) y 3, 3', 5, 5'-tetrametilmenzidina >99 % (TMB, Aldrich). Todos los experimentos se realizaron utilizando como solvente agua

de calidad MilliQ (resistividad 18 M Ω cm) a 25,0 °C. La solución de NaOH preparada fue titulada antes de su utilización para conocer con exactitud la concentración de la misma.

4.3.2. Instrumentación y software

Los espectros de absorción, las imágenes TEM y el protocolo de centrifugado se llevaron a cabo en los mismos equipos indicados en el capítulo 3, y bajo las mismas condiciones. Las medidas de fluorescencia se realizaron usando un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent) con un peltier de control de temperatura programado a 25,0 ° C.

El análisis de datos y análisis gráfico se realizaron usando OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

4.3.3. Síntesis de nanovarillas de plata

El proceso sintético para la preparación de AgNR fue el que se describe a continuación. Se mezclaron en un balón de doble cuello 1,0 mM de borohidruro de sodio y 1,0 mM de citrato de sodio a partir de soluciones madre de concentraciones adecuadas. Las cantidades adicionadas fueron calculadas para un volumen final de reacción igual a 50,0 mL. La mezcla resultante se calentó hasta 60,0 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos con agitación magnética a una velocidad de 800 rpm. Luego del tiempo establecido se agregó gota a gota, con agitación continua, una solución de nitrato de plata hasta alcanzar una concentración de Ag⁺ en el medio de reacción igual a 1,0 mM. La temperatura se elevó hasta 90,0 °C y se adicionó NaOH 0,1 M a la mezcla hasta obtenerse una concentración de iones oxhidrilos igual a 1,8 mM, continuando la agitación y el calentamiento durante 20 minutos adicionales desde el agregado de NaOH. La suspensión coloidal obtenida se dejó enfriar protegida de la luz hasta alcanzar temperatura ambiente.

Las nanopartículas obtenidas fueron centrifugadas tres veces consecutivas a diferentes valores de rfc con el objetivo de remover reactivos sin reaccionar, preconcentrar las partículas sintetizadas y separar parcialmente las esferas de las nanovarillas. La dispersión coloidal de AgNR se dividió en 6 muestras de 5,0 mL que

fueron llevadas a la ultra-centrifuga. El protocolo de centrifugación consistió en tres etapas sucesiva de rfc creciente, con redispersión del precipitado obtenido luego de cada etapa en un volumen de agua milli-Q igual a 5,0 mL: 1° etapa, 1159 rfc durante 30 minutos; 2° etapa, 2608 rfc durante 20 minutos; y 3° etapa, 15585 rfc por 15 minutos. Luego de la tercera etapa de centrifugado, se recolectaron todas las fracciones precipitadas en un tubo Falcon™ de polipropileno, redispersando la muestra en 5,0 mL de agua deionizada. Todas las muestras de AgNR preparadas y centrifugadas se almacenaron a 4,0 °C para su posterior uso.

4.3.4. Cuantificación de Ag⁺ sin reaccionar

Para determinar el rendimiento de la reacción de síntesis de AgNR, se llevó a cabo la cuantificación de Ag⁺ remanente al final del proceso sintético, de acuerdo al protocolo descrito por Gonzalez-Fuenzalida *et al.*²⁴ A tal fin, se prepararon 5 muestras conteniendo cantidades fijas de la suspensión de AgNR (500,0 μL), que fueron enriquecidas con soluciones estándar de Ag⁺ en el rango de concentración 0-100 mM. Las muestras fueron preparadas por duplicado. Las alícuotas de la suspensión coloidal de plata se tomaron inmediatamente luego de finalizar el proceso sintético, y previamente al protocolo de centrifugado. Luego, se adicionó a cada solución 0,66 mM del indicador colorimétrico TMB preparado en solución de buffer acetato de pH 4,0. Las muestras se dejaron reaccionar durante 15 minutos protegidas de la luz. Finalmente, se registraron los espectros UV-visible de cada muestra entre los 300,0 nm y 800,0 nm.

A partir de los espectros UV-visible, se realizó la curva de calibración mediante el método de adición de estándar, utilizando como señal analítica el incremento de absorbancia entre 543,0 nm y 656,0 nm ($\Delta A_{656-543}$).

4.3.5. Caracterización de las nanopartículas

Las AgNR sintetizadas se caracterizaron mediante espectroscopia UV-visible y TEM.

Se registraron los espectros de absorbancia UV-visible en el rango de longitudes

de onda (λ) entre 200,0 nm y 800,0 nm a fin de identificar las bandas TSPR y LSPR, así como también el perfil general de las bandas de absorción de las nanovarillas obtenidas.

Por otro lado, se determinó la distribución de tamaño y morfología de las nanopartículas a partir de imágenes de microscopía. Las muestras a analizar se prepararon depositando 20 μ L de dispersión coloidal de AgNR sobre grillas de cobre recubiertas de carbono de 300 *mesh*, que se dejaron secar al aire. El análisis de las imágenes TEM se realizó utilizando el software ImageJ[®], haciendo el conteo de alrededor de 1000-1500 partículas por muestra para obtener resultados lo más representativos posibles. Para una mejor definición de los bordes partícula-fondo, el sistema de color de las imágenes se transformó a binario (blanco y negro) logrando un mayor contraste. Las partículas esféricas se contaron mediante el sistema automatizado de análisis de partículas que incorpora ImageJ[®], configurando la circularidad entre 0,95-1,00. Ante la dificultad del sistema automático para identificar las partículas en forma de varilla, el conteo y la medición de las mismas se llevó a cabo de forma manual, midiendo segmentos individuales del largo y ancho de cada nanovarilla observada.

4.3.6. Modelo para el cálculo de la concentración de AgNR

Basado en el trabajo de Lazurko *et al.*,²² se derivó un algoritmo para la estimación de la concentración de nanopartículas en sistemas polidispersos *multi-forma*, es decir, sistemas donde coexisten más de una morfología.

En un sistema coloidal de nanopartículas esféricas, la concentración total de NP ($[NP]$) satisface la ecuación 4.1., donde $F(s)$ denota el número total de átomos para una partícula de diámetro s , $g(s)$ es una función que describe la distribución de tamaños del sistema de nanopartículas y $[S]$ es la concentración total de precursor metálico utilizada durante la síntesis de las NP.²⁵

$$[NP] \int F(s)g(s)ds = [S] \quad \text{Ec. 4.1.}$$

Si se considera ahora un sistema de partículas no interactuantes en el cual

coexisten morfologías esféricas con NP de forma cilíndrica (cilindro recto, varillas, NR), entonces en la ecuación 4.1. debe adicionarse un nuevo término que contenga la contribución de los NR a la concentración total de partículas, como se muestra en la ecuación 4.2.

$$[\text{NP}] \int F(s)g(s)ds + [\text{NR}] \iint M(b, a)L(b, a)db da = [S] \quad \text{Ec. 4.2.}$$

La ecuación 4.2. incorpora una función que describe el número total de átomos de precursor metálico en una varilla de diámetro a y largo b (\mathbf{M}), una función que representa la distribución de tamaños de las varillas en sus dos dimensiones definitorias, tanto en diámetro como en largo (\mathbf{L}) y la concentración en partículas de nanovarillas $[\text{NR}]$. Las integrales anteriores pueden aproximarse mediante sumas de Riemman para poder ser evaluadas numéricamente (ecuación 4.3.).

$$[\text{NP}] \sum_{i=1}^{n-1} F(s_i)g(s_i)\Delta s + [\text{NR}] \sum_{j=1}^{M-1} \sum_{k=1}^{N-1} M(b_j, a_k)L(b_j, a_k)\Delta b \Delta a = [S] \quad \text{Ec. 4.3.}$$

Luego, aplicando la regla del trapezoide en una dimensión para el término de contribución esférica y extendiéndola a una superficie para el término correspondiente a las varillas, la ecuación 4.3. se transforma en 4.4, permitiendo considerar la totalidad de los datos recolectados.

$$[\text{NP}] \sum_{i=1}^n (F(s_i)g(s_i) + F(s_{i+1})g(s_{i+1})) \frac{\Delta s}{2} + [\text{NR}] \sum_{j=1}^M \sum_{k=1}^N P(a_j, b_k) \frac{\Delta b \Delta a}{4} = [S] \quad \text{Ec. 4.4.}$$

La ecuación anterior incorpora el término $\mathbf{P}(a_j, b_k)$, que depende de los términos originales $\mathbf{M}(a_j, b_k)$ y $\mathbf{L}(a_j, b_k)$, de acuerdo a lo siguiente.

$$P(a_j, b_k) = M(b_j, a_k)L(b_j, a_k) + M(b_j, a_{k+1})L(b_j, a_{k+1}) + M(b_{j+1}, a_k)L(b_{j+1}, a_k) + M(b_{j+1}, a_{k+1})L(b_{j+1}, a_{k+1}) \quad \text{Ec. 4.5.}$$

La determinación de la concentración total de cualquier tipo de sistema de nanopartículas [NT], independientemente de su morfología y de su distribución de tamaños, requiere tener en cuenta la proporción en la que se encuentra presente cada tipo de partícula en la muestra analizada. Considerando lo anterior, y reorganizando la ecuación 4.4., se obtiene una expresión matemática para calcular la concentración de nanopartículas en sistemas polidispersos y multi-forma (ecuación 4.6.), donde X_{NP} y X_{NR} corresponden a las fracciones relativas de NP y de NR, respectivamente.

$$[NT] = \frac{4[S]}{(2X_{NP} \sum_{i=1}^n (F(s_i)g(s_i) + F(s_{i+1})g(s_{i+1}))\Delta s + X_{NR} \sum_{j=1}^M \sum_{k=1}^N P(a_j, b_k)\Delta b \Delta a)} \quad \text{Ec. 4.6.}$$

Los términos $F(s)$ y $M(a, b)$, que corresponden al número de átomos de precursor en una nanopartícula de un tamaño específico, puede calcularse a partir del volumen de cada partícula y del volumen de los átomos que la componen, de acuerdo a las ecuaciones 4.7. y 4.8. En estas ecuaciones, V_{NP} corresponde al volumen de una partícula esférica ($V_{NP} = 4/3 \pi r^3$), mientras que V_{NR} al volumen de las partículas en forma de varilla considerándolas como cilindros rectos ($V_{NR} = \pi r^2 h$).

$$F(s) = \frac{V_{NP}(s_i)}{V_{\text{átomo}}} \quad \text{Ec. 4.7.}$$

$$M(a, b) = \frac{V_{NR}(a_j, b_k)}{V_{\text{átomo}}} \quad \text{Ec. 4.8.}$$

Por otro lado, los términos $g(s)$ y $L(a, b)$ pueden ser obtenidos desde datos de TEM, o desde cualquier conjunto de datos que contenga información sobre una cierta distribución de tamaños de nanopartículas y la proporción en las que se encuentran respecto de la muestra total.

Se utilizaron muestras coloidales de las AgNR presentadas en este capítulo para

ilustrar el impacto de calcular la concentración de nanopartículas utilizando la ecuación 4.6., a comparación de los resultados obtenidos mediante expresiones matemáticas más simples que sólo consideran el tamaño promedio de las nanopartículas (Ec. 4.9).^{26,27} En la ecuación 4.9., [NP] es la concentración de nanopartículas, [S] representa la concentración de catión precursor y $\bar{V}_{\text{átomo}}$ y \bar{V}_{NP} son los volúmenes promedio de los átomos de plata y de las nanopartículas, respectivamente.

$$[\text{NP}] = \frac{[\text{S}] \times \bar{V}_{\text{átomo}}}{\bar{V}_{\text{NP}}} \quad \text{Ec. 4.9.}$$

La comparación se realizó a través del estudio de la interacción entre nanopartículas de plata y carbazol.²⁸ Para ello, diferentes alícuotas de AgNR se mezclaron con una concentración fija de carbazol (100 nM), y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de las mezclas entre 300,0 nm y 450,0 nm. A partir de las áreas bajo la curva de la señal de fluorescencia de carbazol, se determinaron las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) calculando las concentraciones de AgNR con la ecuación 4.6. y a partir del tamaño medio de las partículas. Las intensidades de emisión en todos los espectros se corrigieron para contrarrestar los efectos de filtro interno que ocurren como consecuencia de la absorción por parte de AgNR de una porción de la luz emitida por carbazol. Dicha corrección se llevó a cabo utilizando la ecuación 4.10, donde F_{corr} y F_{obs} son las emisiones de fluorescencia corregidas y observadas, respectivamente, S_1 (0,8 cm), S_2 (1,0 cm) y S_3 (0,5 cm) son las dimensiones de la celda, y A_{ex} y A_{em} son las absorbancias a las longitudes de onda de excitación y emisión.^{29,30}

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times \left(\frac{2,3 S_2 A^{\text{ex}}}{1 - 10^{-S_2 A^{\text{ex}}}} \times 10^{-S_3 A^{\text{em}}} \times \frac{2,3 S_1 A^{\text{em}}}{1 - 10^{-S_1 A^{\text{em}}}} \right) \quad \text{Ec. 4.10.}$$

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Síntesis y caracterización de AgNR

Inspirado en los trabajos de Caswell *et al.*³¹ y Agnihotri *et al.*,³² se desarrolló una metodología sintética de nanopartículas en forma de varilla mediante una metodología que requiere dos agentes reductores que actúan a dos diferentes temperaturas. La primera reducción de los cationes plata (I) ocurre a 60,0 °C y está, principalmente, mediada por el anión borohidruro (agente reductor primario). Luego, a 90,0 °C, una segunda reducción química tiene lugar por acción del anión citrato (agente reductor secundario), el cual también cumple un importante rol como agente estabilizante. Durante la primera etapa de reducción se observó que la mezcla de reactivos se tornó de un color amarillo rojizo intenso, a medida que se iban formando centros de nucleación (semillas) de plata, por acción del borohidruro de sodio presente en la reacción. Este proceso es el predominante en esta etapa, mientras que el fenómeno de maduración de Ostwald de las nuevas semillas formadas es un proceso secundario.³² Posteriormente, con la adición de hidróxido de sodio y el incremento de la temperatura, la solución experimentó un viraje del color hacia una tonalidad verde grisácea (figura 4.1.). En esta segunda etapa, los núcleos de plata formados durante la etapa inicial participaron del proceso de crecimiento de las nanovarillas, como resultado de la reducción mediada por citrato de sodio de los iones Ag^+ remanentes en la solución, que ocurre a temperaturas elevadas (90,0 °C). Desde un punto de vista cualitativo, luego del proceso de centrifugado, el precipitado resuspendido en agua deionizada presentó una coloración verde debido a la formación de AgNR, mientras que el sobrenadante fue principalmente de color amarillo debido a la presencia de nanoesferas, sugiriendo que el protocolo de centrifugación aplicado fue adecuado para separar las partículas esféricas de mayor tamaño, formadas como producto secundario de la reacción. En secciones posteriores de este capítulo, se mostrarán los espectros UV-visible e imágenes TEM de las nanopartículas obtenidas.



Figura 4.1. Aspecto de la mezcla de reacción al finalizar el proceso de síntesis de AgNR.

Con fines exploratorios, inicialmente se estudiaron diferentes condiciones experimentales para la formación de AgNR, ejecutadas bajo el mismo esquema procedimental, modificando las relaciones molares de los reactivos involucrados, el pH del medio, la temperatura a la que ocurrían las reacciones de reducción y el tiempo de reacción de cada etapa (tabla 4.1.). En general, se observó que condiciones muy extremas de reacción (temperaturas de la segunda etapa superiores a 95,0 °C, concentraciones de OH⁻ por encima de 0,1 M y altas concentraciones del anión citrato) conducían a la formación de precipitado que se depositaba sobre las paredes del balón de reacción, como resultado de la mayor actividad del citrato como reductor a altos valores de pH y de temperatura.³³ En el otro extremo, concentraciones de oxhidrilos menores a 0,3 mM favorecieron la formación predominante de nanopartículas de plata esféricas, lo que fue evidente de manera visible por la intensa coloración amarilla de las soluciones al finalizar la reacción. Respecto de las concentraciones relativas de reactivos, en general se observó que aquellas nanopartículas sintetizadas con concentraciones equimolares de precursor metálico y borohidruro de sodio presentaron una mayor estabilidad y menor tendencia a flocular o agregarse luego del protocolo de centrifugado. Finalmente, los tiempos de reacción de cada etapa no parecieron tener gran influencia sobre el producto final

obtenido. Por otro lado, la formación de las nanovarillas resultó ser muy dependiente de la concentración de OH⁻ del medio, por lo que se decidió analizar este efecto por separado una vez definidos el resto de los parámetros de la síntesis. A partir de todas las observaciones indicadas anteriormente, se estableció que el proceso sintético debía llevarse a cabo teniendo en cuenta los siguientes niveles para cada factor analizado: [AgNO₃]= 1,0 mM; [Citrato]= 1,0 mM; [NaBH₄]= 1,0 mM; T₁= 60,0 °C; T₂= 90,0 °C; t₁= 30 minutos y t₂= 20 minutos.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales evaluadas para la síntesis de AgNR.

[AgNO ₃] / mM	[Citrato] / mM	[NaBH ₄] / mM	[NaOH] / mM
0,75 – 1,50	0,75 – 8,0	0,75 – 1,50	0,01 – 115,0
T ₁ ^a / °C	T ₂ ^b / °C	t ₁ ^c / minutos	t ₂ ^d / minutos
40,0 – 80,0	85,0 – 105,5	15 – 45	10 – 30

^a Temperatura a la que ocurre la primer reducción, con borohidruro de sodio.

^b Temperatura a la que ocurre la segunda reducción, con citrato de sodio.

^c Tiempo de la primera etapa, a T₁.

^d Tiempo de la segunda etapa, a T₂.

Como ya se mencionó, la formación de partículas en forma de varilla mostró ser muy dependiente de la concentración de los iones oxhidrilos presentes en el medio durante la segunda etapa de la reacción, observándose importantes cambios en la apariencia post-síntesis de las NP obtenidas ante pequeñas variaciones de pH. Por tal motivo se decidió explorar el producto obtenido variando únicamente la cantidad de NaOH agregada en la reacción, manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales, de acuerdo a lo establecido previamente. La figura 4.2. muestra los espectros UV-visible post-centrifugado de AgNR, obtenidos a [OH⁻] 1,0 mM; 1,8 mM; y 3,2 mM.

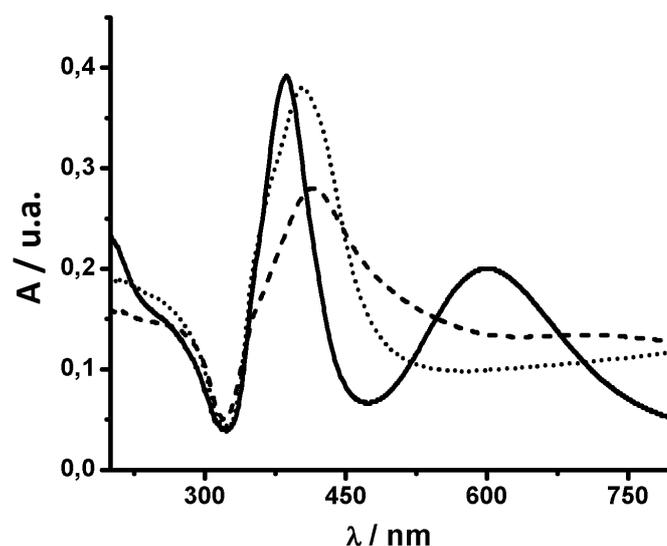


Figura 4.2. Espectros UV-visible post-centrifugado de AgNR obtenidas a diferentes concentraciones de NaOH: 1,0 mM (---); 1,8 mM; (—) 3,2 mM (.....).

En partículas anisotrópicas en forma de varilla, se esperan dos modos de resonancia de plasmón superficial que den origen a dos bandas de absorción en el UV-visible: la TSPR de mayor energía, y la LSPR de menor energía.³⁴ Como se observa en el espectro de la figura 4.2., a una concentración de OH⁻ igual a 1,8 mM las nanopartículas obtenidas presentaron las dos bandas de absorción, indicando la presencia de nanovarillas en la dispersión coloidal. Las TSPR y LSPR presentaron máximos de absorbancia a 387,0 nm y 602,0 nm, respectivamente, los cuales son característicos de nanovarillas de plata.³⁵⁻³⁶ Bajo cualquiera de las otras condiciones, los dos picos no pudieron definirse claramente y gran parte de la absorción por encima de los 500,0 nm puede ser principalmente asignada a dispersión de luz ocasionada por aglomerados de nanopartículas de gran tamaño. De esta manera, se determinó que la [NaOH] óptima para la obtención de AgNR fue 1,8 mM; y el proceso de síntesis adecuado, resultó como se describe en la sección 4.3.3. de este capítulo.

La figura 4.3. muestra una imagen TEM representativa de las partículas obtenidas posteriormente al proceso de centrifugación cuando la síntesis de AgNR se llevó a cabo en las condiciones óptimas. Las imágenes de microscopía muestran partículas de morfología cilíndrica con un largo promedio igual a 54 nm (desviación estándar,

sd= 9 nm) y con un ancho promedio de 18 nm (sd= 2 nm). Se puede observar en la imagen TEM varias nanopartículas esféricas que se forman simultáneamente con las nanovarillas. Estas nanoesferas presentaron un diámetro medio 26 nm (sd=3 nm), de similar tamaño que el ancho de las nanovarillas.

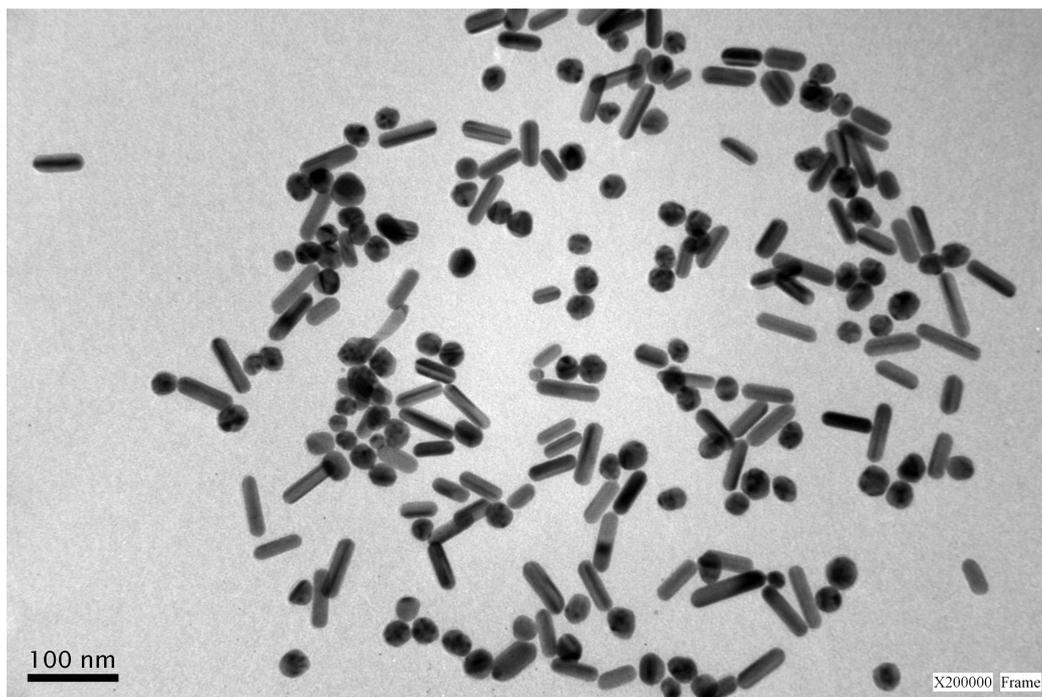


Figura 4.3. Imagen TEM de una muestra de AgNR. $[AgNO_3]= 1,0$ mM; $[NaBH_4]= 1,0$ mM; $[Citrato\ de\ sodio]= 1,0$ mM; pH= 11,25.

Como la posición de las bandas de plasmón superficial está relacionada a las dimensiones de las partículas que interactúan con la luz,³⁷ la absorción de las nanoesferas aparece en la misma región que la banda de plasmón transversal de las nanovarillas y, por lo tanto, las dos se solapan observándose una única señal alrededor de los 387,0 nm. El espectro UV-visible mostró una mayor absorbancia en esta banda a menores longitudes de onda, a comparación de la absorbancia observada en la banda a 602,0 nm como consecuencia de la interacción simultánea de varillas y esferas con la luz. A partir de imágenes TEM, se determinó que la síntesis propuesta produjo nanovarillas y nanoesferas en una proporción en número de

partículas igual a 53 % y 47 %, respectivamente. Si bien diferentes enfoques se evaluaron para lograr una mejor separación post-síntesis de esferas y varillas (centrifugación escalonada, precipitación por gravedad), la gran similitud de los tamaños de ambos tipos de partícula hizo que la separación fuese siempre parcial.

Ante la ausencia de agentes que actúen como plantilla para el crecimiento del cristal y considerando la gran influencia de la concentración de oxhidrilos en el medio durante la segunda etapa de la reacción, parecería que el anión OH^- cumple el rol de agente director del crecimiento del cristal en una sola dirección, posiblemente en conjunto con el anión citrato, el cual se encuentra totalmente desprotonado a los valores de pH trabajados, y que cumple una doble función, como agente reductor y como ligando que estabiliza las nuevas partículas formadas. Es conocido que algunos iones pueden dirigir el crecimiento de nanopartículas hacia diferentes formas, denotando la importancia de estas especies.^{38,39} Una posible explicación es que la formación de nanovarillas es resultado de una adsorción preferencial de los iones a diferentes caras del cristal.³¹ De este modo, es plausible que los aniones citrato o hidróxido se unan a las futuras caras laterales de las nanovarillas, permitiendo el crecimiento de las partículas en una sola dirección. Por ejemplo, para el proceso de obtención de nanoalambres de plata en condiciones similares a las utilizadas en la síntesis de AgNR propuesta en este capítulo (sin surfactantes), Murp *et al.*⁴⁰ propusieron que las nanoestructuras se formaban mediante un proceso de alargamiento del cristal dirigido por un mecanismo de acoplamiento orientado. A través de este proceso, inicialmente los centros de nucleación de plata se generaron por reducción química de los iones Ag^+ en agua a ebullición con citrato de sodio e hidróxido de sodio como aditivos. Finalmente, estos centros de nucleación se unen para formar nanoalambres de plata completamente crecidos, a través de caras cristalográficas favorables. El acoplamiento orientado puede describirse como un ordenamiento auto-dirigido de nanopartículas vecinas cuando partículas con idénticas configuraciones cristalográficas están presentes. Si estas partículas se encuentran con una orientación favorable, las mismas se unen para disminuir la energía superficial total.⁴¹

Si bien los resultados obtenidos no permiten discriminar el mecanismo mediante el cual se forman las nanovarillas en las condiciones experimentales empleadas, la metodología sintética resultó ser muy reproducible. Ésto permitió evaluar AgNR como un nuevo analito en la búsqueda de nuevas metodologías analíticas para nanomateriales sintéticos que propone esta tesis doctoral, como así también estudiar la influencia de la morfología de las NP en los métodos de detección.

Con el objetivo de evaluar el rendimiento de la síntesis de AgNR, se cuantificó la cantidad de iones plata sin reaccionar después del procedimiento sintético (pero antes de la centrifugación) de acuerdo al protocolo descrito por Gonzalez-Fuenzalida *et al.*²⁴ que permite la cuantificación colorimétrica *in situ* de Ag^+ en presencia de AgNP, de acuerdo a lo que indica la figura 4.4. Mediante esta metodología, la sonda TMB puede oxidarse por acción de cationes Ag^+ (Figura 4.4.A), aún en presencia de AgNP (Figura 4.4.B), para formar oxTMB y $Ag(0)$. La forma oxidada de TMB presenta una coloración azul (Figura 4.4.C), por lo que la aparición de oxTMB puede registrarse mediante un espectrofotómetro UV-visible siguiendo el máximo característico de oxTMB a 656 nm, siendo posible cuantificar indirectamente Ag^+ en solución.

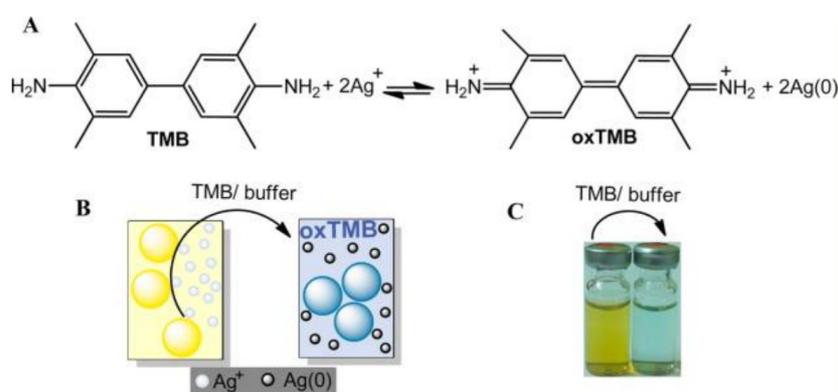


Figura 4.4. (A) Oxidación de TMB por Ag^+ ; (B) Representación esquemática de la detección "in situ" de Ag^+ residual luego de la síntesis de AgNP; (C) visualización colorimétrica.²⁴

Conocer la cantidad de plata sin reaccionar es importante para la estimación de la concentración que se discutirá en la próxima sección de este capítulo, ya que deben

incorporarse términos de corrección si no se consume la totalidad de iones precursores durante la síntesis. Luego de la reacción entre TMB (0,66 mM) con soluciones de AgNR (500,0 μL) y enriquecidas con diferentes concentraciones de iones plata (0 – 100 μM), se tomaron los espectros UV-visible de las muestras. A fin de compensar el incremento de la línea de base con el aumento de la concentración de Ag^+ adicionada, se utilizó como señal analítica la diferencia de absorbancia entre 656,0 nm y 543,0 nm ($\Delta A_{656-543}$), que permitió corregir el efecto de la línea de base. $\Delta A_{656-543}$ mostró dependencia lineal con la concentración adicionada de iones plata, con una pendiente igual a $(110 \pm 2) 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ y ordenada al origen igual a cero (Figura 4.5.). La calibración se llevó a cabo utilizando el método de adición de estándar (MOSA). De acuerdo a esta metodología, una ordenada al origen igual a cero indica que el analito no puede ser cuantificado y que la concentración está por debajo del límite de detección (LOD) del método. Para el caso de las partículas presentadas en este capítulo, el LOD (calculado como $\text{LOD}=3,3 s_b/m$; con s_b igual a la desviación estándar del blanco – determinada mediante la medición de 20 muestras de TMB en ausencia de AgNR y Ag^+ - y m la pendiente de la recta de calibrado) fue igual a 3,5 μM y, por lo tanto, la concentración de Ag^+ sin reaccionar al finalizar la síntesis de AgNR fue menor al 0,35 % de la cantidad inicial utilizada.

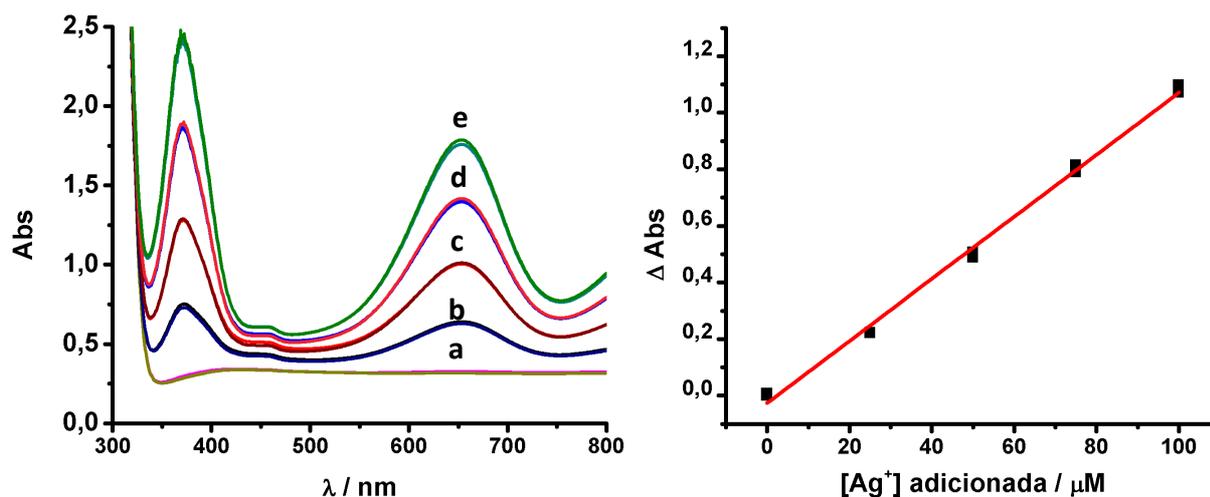


Figura 4.5. Izquierda: Espectros UV-visible de soluciones de AgNR con concentraciones crecientes de Ag^+ 0 - 100 μM (a-e) en presencia de TMB. Derecha: Curva de calibración MOSA de duplicados para la determinación de la cantidad de plata sin reaccionar de la síntesis de AgNR propuesta.

La estabilidad de la mezcla de nanopartículas obtenida (varillas y esferas) se estudió analizando los cambios observados en espectros UV-visible de AgNR durante un período de 30 días, desde que la dispersión coloidal fue preparada. De la figura 4.6. se puede deducir que las nanopartículas obtenidas no experimentaron ningún cambio morfológico significativo durante los 30 días bajo estudio, ya que las bandas de absorción permanecieron prácticamente sin cambios. A medida que el tiempo de envejecimiento continuó incrementándose (más de 60 días), las partículas comenzaron a depositarse en el fondo de los viales que las contenían, y la coloración se tornó verde amarillada, indicando agregación y una reorganización de las nanovarillas hacia la formación de partículas cuasi-esféricas de gran tamaño, probablemente por un proceso de maduración de Ostwald.⁴² Este fenómeno puede observarse tanto en el espectro UV-visible a 90 días de la figura 4.6., donde hay significativas variaciones de la posición de las bandas de absorción y sus absorbancias respecto de los otros espectros, como en las micrografías TEM de las AgNR a 90 días (Figura 4.7.), en las que se observan grandes aglomerados de NP, con partículas que superan los 100,0 nm de diámetro.

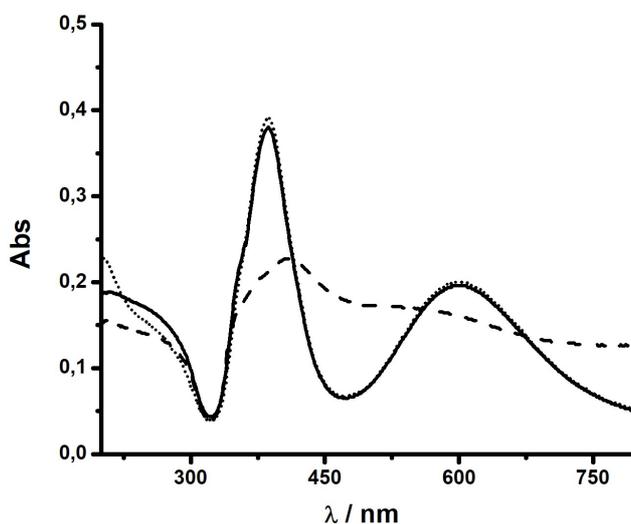


Figura 4.6. Espectros UV-visible de AgNR registrados inmediatamente después de la síntesis (.....), luego de 30 días (—), y a 90 días (- - -) de almacenadas a 4,0 °C.

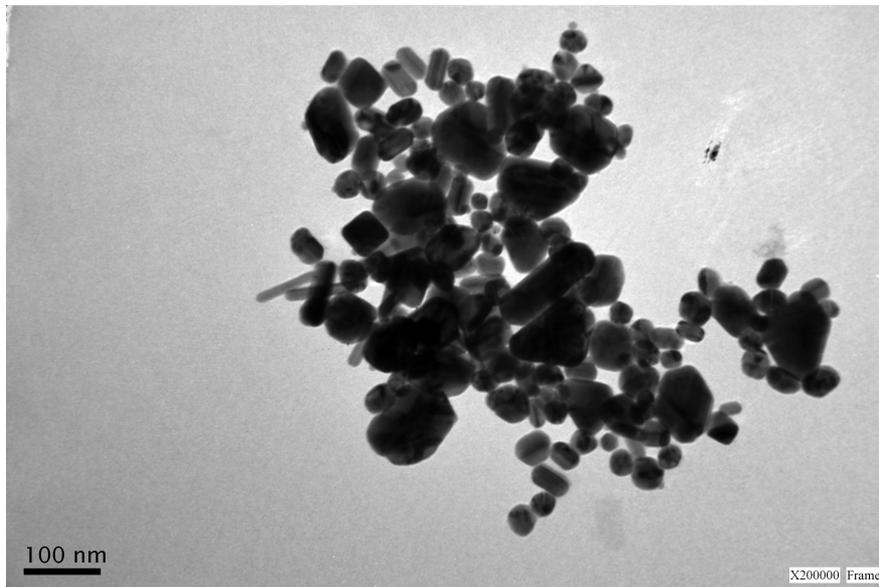


Figura 4.7. Micrografía TEM de AgNR tomada 90 días luego de la síntesis.

4.4.2. Modelo para el cálculo de la concentración de sistemas de nanopartículas multiforma

Si bien existen actualmente modelos matemáticos que permiten determinar la concentración de nanopartículas en sistemas polidispersos, estos están únicamente diseñados para el análisis de partículas esféricas.²² Al introducir una nueva morfología que presenta una distribución de tamaños bi-dimensional, como las partículas cilíndricas en AgNR, es necesario adaptar estos modelos para calcular el volumen de cada partícula y la probabilidad de encontrar una partícula de ciertas dimensiones entre todas las NP presentes en la muestra analizada. Incluso, es necesario combinar ecuaciones si se tienen en cuenta sistemas con múltiples morfologías que coexisten en una muestra de NP. El nuevo algoritmo desarrollado permite estimar la concentración de nanopartículas en sistemas coloidales, independientemente de la forma y las distribuciones de tamaño a partir de imágenes de microscopía electrónica, incluso en mezclas. Las figura 4.8. y 4.9. muestran, respectivamente los histogramas de distribución de tamaño de las nanovarillas (largo y ancho) y nanoesferas (diámetro) obtenidas utilizando la síntesis de AgNR descrita

en este capítulo, al contar más de 1500 partículas de diferentes lotes de síntesis en imágenes TEM. Cuando se utilizan datos provenientes de microscopía electrónica, es importante analizar la mayor cantidad posible de partículas (>1000)²² para obtener un conjunto de datos que represente adecuadamente a la muestra. La ecuación 4.6. permite realizar los cálculos considerando intervalos de probabilidad que resultan independientes de la distribución de tamaño, por lo que puede utilizarse en distribuciones que se desvíen de una distribución Gaussiana perfecta.

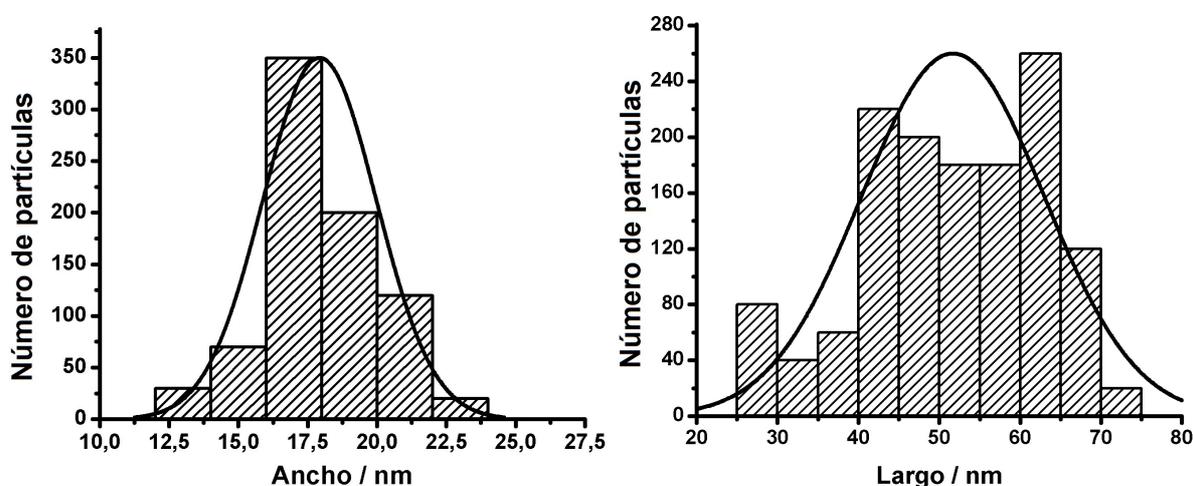


Figura 4.8. Histogramas de distribución de tamaños de las nanovarillas obtenidas, a lo ancho (izquierda) y a lo largo (derecha) de las mismas. Ancho de las varillas= 18 (2) nm. Largo de las varillas= 54 (9) nm. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

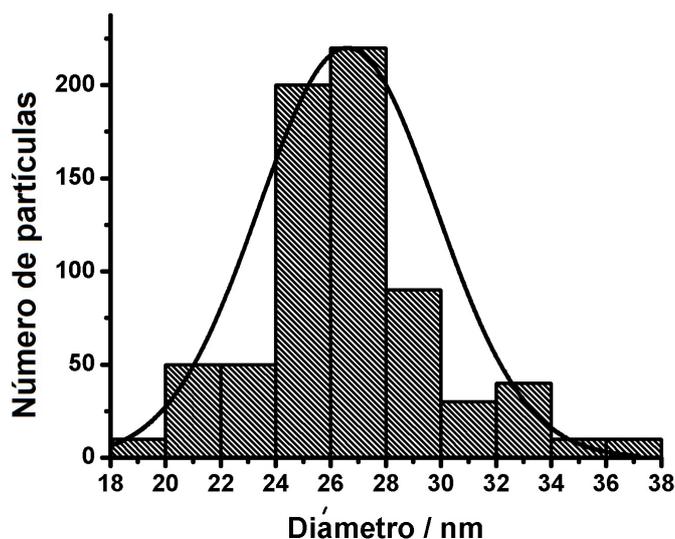


Figura 4.9. Histograma de distribución de tamaños de las nanoesferas obtenidas. Diámetro medio= 26 (3) nm. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

La tabla 4.2. muestra los resultados obtenidos para el cálculo de la concentración de las nanopartículas evaluadas utilizando la ecuación 4.6., que considera la mezcla de esferas y varillas con su correspondiente polidispersidad, y los resultados obtenidos mediante un método que únicamente tiene en cuenta el tamaño medio de las partículas. Para el cálculo de concentración utilizando el nuevo algoritmo, se consideró que la totalidad de los iones Ag^+ se transformaron en nanopartícula de algún tipo, como se mostró anteriormente, y se aplicaron correcciones para tener en cuenta las partículas esféricas que se separaron de AgNR mediante el protocolo de centrifugación.

Tabla 4.2. Comparación de las concentraciones de nanopartículas determinadas para AgNR.

		Método de cálculo ^a	
		Ecuación 4.6. ^c	Tamaño medio ^{b,d}
[AgNP] / 10^{-9} M	Mezcla	6,75 (0,02)	8,5 (1,1)
	Nanoesferas	3,58 (0,01)	4,5 (0,6)
	Nanovarillas	3,17 (0,01)	4,0 (0,5)

^a A partir de información proveniente de imágenes TEM.

^b Calculado a partir de la ecuación $[NP]=[S]/N$, con N =volumen NP/volumen átomo de plata; y $[S]$ igual a la concentración de ión precursor.

^c Entre paréntesis se indica el error asociado, calculado mediante propagación de errores.

^d Entre paréntesis se indica el error asociado, calculado asumiendo que la desviación estándar de la media de los tamaños es proporcional al error de la concentración.

Para ilustrar el impacto del método de cálculo de la concentración de nanopartículas, se evaluó la interacción entre las AgNP y la sonda fluorescente carbazol (figura 4.10). Este fluoróforo es un hidrocarburo aromático policíclico que experimenta desactivación de la fluorescencia cuando interacciona con NP metálicas, respondiendo a la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV} [AgNP] \quad \text{Ec. 4.11.}$$

donde K_{SV} corresponde a la constante de Stern-Volmer o de *quenching*. Los principios relacionados a la fluorescencia y los fenómenos de desactivación ocasionados por NP

serán discutidos con mayor profundidad en el capítulo 5.

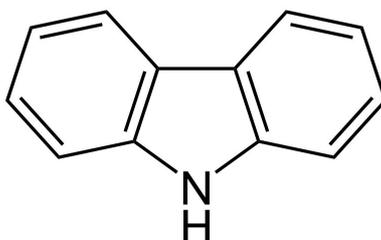


Fig. 4.10. Estructura química de carbazol. El sistema conjugado π permite la absorción y posterior emisión de luz como fluorescencia, mientras que el heteroátomo de nitrógeno tienen afinidad a la superficie metálica de las NP.

Los cambios en la intensidad de fluorescencia a una concentración fija de carbazol (100 nM) se registraron luego de la adición de diferentes alícuotas de AgNR, y se graficó F_0/F vs [AgNR] a fin de determinar las constantes de Stern-Volmer, como se muestra en la figura 4.11. Las intensidades de fluorescencia se corrigieron para considerar el efecto de filtro interno de acuerdo a la Ec. 4.10. presentada anteriormente. Las K_{SV} obtenidas fueron iguales a $9,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (desviación estándar = $0,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) cuando la concentración se calculó a partir de la Ec. 4.6. discutida en este capítulo, y a $7,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (desviación estándar = $0,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) cuando se empleó la Ec. 4.9., que únicamente considera un sistema de partículas idénticas de tamaño igual al tamaño promedio de la distribución real. Estos resultados muestran que existe una variación aproximadamente igual a 25 % entre las K_{SV} calculadas utilizando las dos metodologías. Se espera que el impacto de incorporar las correcciones de polidispersidad y la presencia de múltiples formas en la estimación de las concentraciones provea resultados mejores y más representativos en muestras más polidispersas, por la mayor contribución de las partículas de menor tamaño a la concentración total.

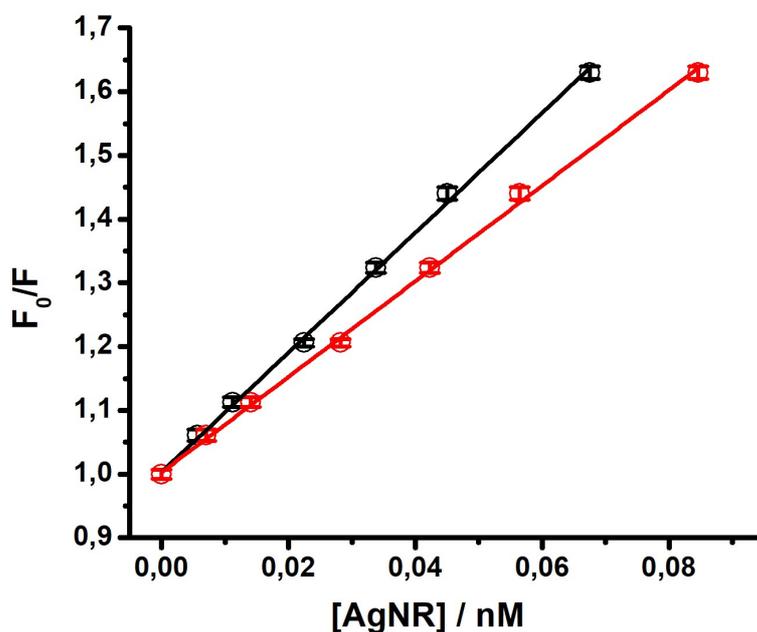


Figura 4.11. Gráficas de Stern-Volmer de AgNR con CZL 100 nM. Concentraciones calculadas con la ecuación 4.6. (rojo) y con la ecuación 4.9. (negro).

Las diferencias entre las estimaciones de concentración de AgNR pueden ser responsables de la disparidades observadas en los efectos que producen NP con similares diámetros medios, pero con diferentes polidispersidad. Asimismo, estas disparidades pueden surgir por ignorar completamente la presencia de ciertas morfologías en las muestras estudiadas. En resumen, una incorrecta estimación de la concentración puede ser responsable de la variabilidad *batch a batch*, respecto de la respuesta observada en diferentes aplicaciones, como se ha demostrado aquí para la determinación de constantes de *quenching*.

La nueva ecuación propuesta en este capítulo ofrece una metodología conveniente para calcular concentraciones más exactas y realistas de nanopartículas en dispersiones coloidales. Incluso, la ecuación podría refinarse aún más, considerando otros factores como el empaquetamiento cristalino.

4.5. Conclusiones

En este capítulo se presentó una nueva vía sintética para producir nanovarillas de plata estables con una relación de aspecto ~ 3 en ausencia de cualquier tipo de surfactante o agente especial que actúe como plantilla, mediante una metodología *one-pot* de dos pasos consecutivos a dos temperaturas diferentes. El proceso sintético desarrollado es muy dependiente de la concentración de oxhidrilos en el medio, los cuales podrían cumplir un rol fundamental como agentes directores del crecimiento de los cristales en una sola dirección.

Por otro lado, se propuso una nueva herramienta práctica para lograr una mejor estimación de la concentración de nanopartículas en sistemas coloidales que presenten partículas de morfología diferentes a esferas y que incorpora correcciones para considerar la polidispersidad de las muestras. En este sentido, es destacable mencionar que estimaciones incompletas o parciales de la concentración de nanopartículas en el área de la nanociencia y la nanotecnología pueden llevar a resultados engañosos que finalmente conduzcan a interpretaciones o conclusiones equivocadas, principalmente si se espera que los fenómenos analizados sean dependientes de la concentración del nanomaterial. La existencia de herramientas para la estimación de la concentración que consideren tanto la morfología como la polidispersidad de los nanomateriales es de importancia para disminuir la variabilidad *batch a batch* y poder comprender completamente los efectos del tamaño de las nanopartículas en los sistemas estudiados.

4.6. Referencias

- (1) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Hunyadi, S. E.; Orendorff, C. J. One-Dimensional Colloidal Gold and Silver Nanostructures. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (19), 7544–7554. <https://doi.org/10.1021/ic0519382>.
- (2) Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (40), 8410–8426. <https://doi.org/10.1021/jp9917648>.
- (3) Xu, H.; Kan, C.; Miao, C.; Wang, C.; Wei, J.; Ni, Y.; Lu, B.; Shi, D. Synthesis of High-Purity Silver Nanorods with Tunable Plasmonic Properties and Sensor

- Behavior. *Photonics Res.* **2017**, *5* (1), 27. <https://doi.org/10.1364/PRJ.5.000027>.
- (4) Shajari, D.; Bahari, A.; Gill, P.; Mohseni, M. Synthesis and Tuning of Gold Nanorods with Surface Plasmon Resonance. *Opt. Mater.* **2017**, *64*, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2017.01.004>.
- (5) Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jäckel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (16), 1805–1825. <https://doi.org/10.1002/adma.200902557>.
- (6) Zalaffi, M. S.; Litti, L.; Canton, P.; Meneghetti, M.; Moretto, L. M.; Ugo, P. Preparation and Characterization of Ag-Nanostars@Au-Nanowires Hierarchical Nanostructures for Highly Sensitive Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Nano Express* **2020**, *1* (2), 020006. <https://doi.org/10.1088/2632-959X/aba104>.
- (7) Cao, W.; Luo, Y.; Li, J.; Qian, A.; Wang, Q.; Wang, X.; Duan, L.; Wu, Y.; Han, C. Detection of Benzo[a]Pyrene with Silver Nanorod Substrate in River Water and Soil Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Results Chem.* **2021**, *3*, 100126. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100126>.
- (8) Han, C.; Yao, Y.; Wang, W.; Qu, L.; Bradley, L.; Sun, S.; Zhao, Y. Rapid and Sensitive Detection of Sodium Saccharin in Soft Drinks by Silver Nanorod Array SERS Substrates. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, *251*, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.051>.
- (9) Xu, L.; Zhang, H.; Tian, Y.; Jiao, A.; Chen, F.; Chen, M. Photochemical Synthesis of ZnO@Au Nanorods as an Advanced Reusable SERS Substrate for Ultrasensitive Detection of Light-Resistant Organic Pollutant in Wastewater. *Talanta* **2019**, *194*, 680–688. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.060>.
- (10) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. Wet Chemical Synthesis of Silver Nanorods and Nanowires of Controllable Aspect Ratio. *Chem. Commun.* **2001**, No. 7, 617–618. <https://doi.org/10.1039/b100521i>.
- (11) Patarroyo, J.; Genç, A.; Arbiol, J.; Bastús, N. G.; Puntes, V. One-Pot Polyol Synthesis of Highly Monodisperse Short Green Silver Nanorods. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (73), 10960–10963. <https://doi.org/10.1039/C6CC04796C>.
- (12) Zhuo, X.; Zhu, X.; Li, Q.; Yang, Z.; Wang, J. Gold Nanobipyramid-Directed Growth of Length-Variable Silver Nanorods with Multipolar Plasmon Resonances. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 7523–7535. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02622>.
- (13) Bhattacharya, S.; Biswas, J. Role of Spacer Lengths of Gemini Surfactants in the Synthesis of Silver Nanorods in Micellar Media. *Nanoscale* **2011**, *3* (7), 2924. <https://doi.org/10.1039/c1nr10141b>.
- (14) Pietrobon, B.; McEachran, M.; Kitaev, V. Synthesis of Size-Controlled Faceted Pentagonal Silver Nanorods with Tunable Plasmonic Properties and Self-Assembly of These Nanorods. *ACS Nano* **2009**, *3* (1), 21–26. <https://doi.org/10.1021/nn800591y>.
- (15) Dong, R.-X.; Tsai, W.-C.; Lin, J.-J. Tandem Synthesis of Silver Nanoparticles and Nanorods in the Presence of Poly(Oxyethylene)-Amidoacid Template. *Eur.*

- Polym. J.* **2011**, *47* (7), 1383–1389.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.04.003>.
- (16) Šubr, M.; Petr, M.; Peksa, V.; Kylián, O.; Hanuš, J.; Procházka, M. Ag Nanorod Arrays for SERS: Aspects of Spectral Reproducibility, Surface Contamination, and Spectral Sensitivity. *J. Nanomater.* **2015**, *2015*, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2015/729231>.
- (17) Personick, M. L.; Langille, M. R.; Zhang, J.; Mirkin, C. A. Shape Control of Gold Nanoparticles by Silver Underpotential Deposition. *Nano Lett.* **2011**, *11* (8), 3394–3398. <https://doi.org/10.1021/nl201796s>.
- (18) 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* **2018**, *3* (2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.03.003>.
- (19) 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.* **2012**, *258* (15), 5909–5913.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.02.138>.
- (20) 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-Dimens. Syst. Nanostructures* **2014**, *64*, 211–217.
<https://doi.org/10.1016/j.physe.2014.07.029>.
- (21) Howard, A. G. On the Challenge of Quantifying Man-Made Nanoparticles in the Aquatic Environment. *J. Env. Monit* **2010**, *12* (1), 135–142.
<https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- (22) Lazurko, C.; Ahumada, M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Alarcon, E. I. NANoPoLC Algorithm for Correcting Nanoparticle Concentration by Sample Polydispersity. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3166–3170. <https://doi.org/10.1039/C7NR08672E>.
- (23) Goel, K.; Zuñiga-Bustos, M.; Lazurko, C.; Jacques, E.; Galaz-Araya, C.; Valenzuela-Henriquez, F.; Pacioni, N. L.; Couture, J.-F.; Poblete, H.; Alarcon, E. I. Nanoparticle Concentration vs Surface Area in the Interaction of Thiol-Containing Molecules: Toward a Rational Nanoarchitectural Design of Hybrid Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (19), 17697–17705.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b03942>.
- (24) González-Fuenzalida, R. A.; Moliner-Martínez, Y.; González-Béjar, M.; Molins-Legua, C.; Verdú-Andres, J.; Pérez-Prieto, J.; Campins-Falcó, P. In Situ Colorimetric Quantification of Silver Cations in the Presence of Silver Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10013–10016.
<https://doi.org/10.1021/ac402822d>.
- (25) Ahumada, M.; Lissi, E.; Montagut, A. M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Pacioni, N. L.; Alarcon, E. I. Association Models for Binding of Molecules to Nanostructures. *The Analyst* **2017**, *142* (12), 2067–2089.
<https://doi.org/10.1039/C7AN00288B>.
- (26) Alarcon, E. I.; Udekwu, K.; Skog, M.; Pacioni, N. L.; Stampelcoskie, K. G.; González-Béjar, M.; Polisetti, N.; Wickham, A.; Richter-Dahlfors, A.; Griffiths,

- M.; Scaiano, J. C. The Biocompatibility and Antibacterial Properties of Collagen-Stabilized, Photochemically Prepared Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33* (19), 4947–4956. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.033>.
- (27) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (28) Núñez, R. N.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. Improving Reproducibility between Batches of Silver Nanoparticles Using an Experimental Design Approach. *Microchem. J.* **2018**, *141*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.017>.
- (29) Leese, R. A.; Wehry, E. L. Corrections for Inner-Filter Effects in Fluorescence Quenching Measurements via Right-Angle and Front-Surface Illumination. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (8), 1193–1197. <https://doi.org/10.1021/ac50030a047>.
- (30) 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. Chem.* **2015**, *299*, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.12.001>.
- (31) Caswell, K. K.; Bender, C. M.; Murphy, C. J. Seedless, Surfactantless Wet Chemical Synthesis of Silver Nanowires. *Nano Lett.* **2003**, *3* (5), 667–669. <https://doi.org/10.1021/nl0341178>.
- (32) 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* **2014**, *4* (8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>.
- (33) Dong, X.; Ji, X.; Wu, H.; Zhao, L.; Li, J.; Yang, W. Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (16), 6573–6576. <https://doi.org/10.1021/jp900775b>.
- (34) Hu, G.; Liang, G.; Zhang, W.; Jin, W.; Zhang, Y.; Chen, Q.; Cai, Y.; Zhang, W. Silver Nanoparticles with Low Cytotoxicity: Controlled Synthesis and Surface Modification with Histidine. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53* (7), 4768–4780. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1940-6>.
- (35) Stamplecoskie, K. G.; Scaiano, J. C. Light Emitting Diode Irradiation Can Control the Morphology and Optical Properties of Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (6), 1825–1827. <https://doi.org/10.1021/ja910010b>.
- (36) Zhang, J.; Langille, M. R.; Mirkin, C. A. Synthesis of Silver Nanorods by Low Energy Excitation of Spherical Plasmonic Seeds. *Nano Lett.* **2011**, *11* (6), 2495–2498. <https://doi.org/10.1021/nl2009789>.
- (37) Loumaigne, M.; Midelet, C.; Doussineau, T.; Dugourd, P.; Antoine, R.; Stamboul, M.; Débarre, A.; Werts, M. H. V. Optical Extinction and Scattering Cross Sections of Plasmonic Nanoparticle Dimers in Aqueous Suspension. *Nanoscale* **2016**, *8* (12), 6555–6570. <https://doi.org/10.1039/C6NR00918B>.
- (38) Filankembo, A.; Giorgio, S.; Lisiecki, I.; Pileni, M. P. Is the Anion the Major Parameter in the Shape Control of Nanocrystals? *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*

- (30), 7492–7500. <https://doi.org/10.1021/jp022282q>.
- (39) Filankembo, A.; Pileni, M. P. Is the Template of Self-Colloidal Assemblies the Only Factor That Controls Nanocrystal Shapes? *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (25), 5865–5868. <https://doi.org/10.1021/jp000268c>.
- (40) Murph, S. E. H.; Murphy, C. J.; Leach, A.; Gall, K. A Possible Oriented Attachment Growth Mechanism for Silver Nanowire Formation. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (4), 1968–1974. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00123>.
- (41) Penn, R. L.; Banfield, J. F. Oriented Attachment and Growth, Twinning, Polytypism, and Formation of Metastable Phases; Insights from Nanocrystalline TiO_2 . *Am. Mineral.* **1998**, *83* (9–10), 1077–1082. <https://doi.org/10.2138/am-1998-9-1016>.
- (42) Hansen, T. W.; DeLaRiva, A. T.; Challa, S. R.; Datye, A. K. Sintering of Catalytic Nanoparticles: Particle Migration or Ostwald Ripening? *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (8), 1720–1730. <https://doi.org/10.1021/ar3002427>.

5

Método univariado para la detección y cuantificación de nanomateriales de oro y plata

5.1. Introducción

Como se ha mencionado en el capítulo 1, en los últimos años se han desarrollado numerosos productos comerciales que contienen AuNP y AgNP.¹⁻³ La creciente producción y utilización de estos productos hace inevitable la eventual liberación de NP sintéticas en el ambiente, y particularmente en los sistemas acuáticos.⁴⁻⁶ Sin embargo, más allá de los esfuerzos globales por abordar y regular la producción y la manipulación segura de estos materiales, aún no existe legislación completamente destinada a la regulación de los mismos como contaminantes ambientales o que establezca cantidades máximas permitidas, sino que se limitan a establecer las condiciones de producción industrial y las metodologías de caracterización de los nanomateriales.⁷ Teniendo esto en cuenta, resulta fundamental el desarrollo de metodologías confiables y robustas que sean capaces de identificar, caracterizar y cuantificar las NP sintéticas en matrices complejas.^{3,8} En los últimos años se ha desarrollado una variedad limitada de técnicas analíticas que permiten la cuantificación de NP, pero la mayoría de ellas requieren procesos previos de separación de las NP en función de sus tamaños o formas, y la utilización de técnicas analíticas complejas y costosas.⁹⁻¹³ Como respuesta a esta situación, empieza a ganar importancia el desarrollo de metodologías más sencillas, basadas en sensores químicos como, por

ejemplo, las sondas moleculares fluorescentes.¹⁴

5.1.1. Sondas moleculares fluorescentes y nanopartículas metálicas

La SPR de NP metálicas produce un campo electromagnético con componentes de absorción, de dispersión y de campo cercano, que determinan en que medida la intensidad del mismo se ve incrementada en comparación con la radiación incidente. Como consecuencia del campo electromagnético incrementado, se observa la mejora de varios fenómenos ópticos en moléculas que se encuentran próximas a la superficie del nanomaterial.¹⁵⁻¹⁷ Estas propiedades de las NP han permitido el desarrollo de varias aplicaciones, como la detección *single-molecule* mediante espectroscopia Raman incrementada por el metal (SERS),^{18,19} la microscopía de campo cercano,^{20,21} los dispositivos ópticos en la nanoescala,^{22,23} y de una gran variedad de sistemas de óptica no lineal.²⁴⁻²⁶

En general, las propiedades de un emisor fluorescente en las inmediaciones de una NP dependen del acoplamiento del dipolo del emisor con el plasmón superficial de la NP y, por lo tanto, se ven afectadas fundamentalmente por la distancia entre el fluoróforo y la superficie metálica, y por la ubicación espacial del emisor alrededor de la partícula y la orientación del dipolo molecular respecto a la superficie de la NP.²⁷ Como puede observarse en la figura 5.1., cuando la molécula fluorescente se encuentra en contacto directo o muy próxima a la superficie del metal, la emisión de fluorescencia se ve totalmente desactivada (Fig. 5.1.B). Los dos fenómenos que están principalmente involucrados en este proceso son la transferencia de electrones, usualmente en partículas muy pequeñas (< 5 nm), y la transferencia de energía, mediante el mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).^{17,28} En el otro extremo, si el fluoróforo se posiciona muy alejado de la nanopartícula metálica las ondas electromagnéticas del plasmón superficial que viajan a través de la interfaz metal-dieléctrico (polariton), pueden no alcanzar el fluoróforo y, por lo tanto, no se observarían efectos sobre la emisión del mismo (Fig. 5.1.A). En una situación intermedia, existe una distancia óptima a la cual se puede observar una exaltación de la fluorescencia como resultado de una interacción

plasmónica entre fluoróforo y metal, al incrementarse el campo electromagnético de este último en las inmediaciones de la superficie ante un haz de luz incidente de longitud de onda adecuada.¹⁷ Este fenómeno, que ocurre a distancias hasta los 5 nm, se denomina fluorescencia incrementada por el metal (MEF).²⁹

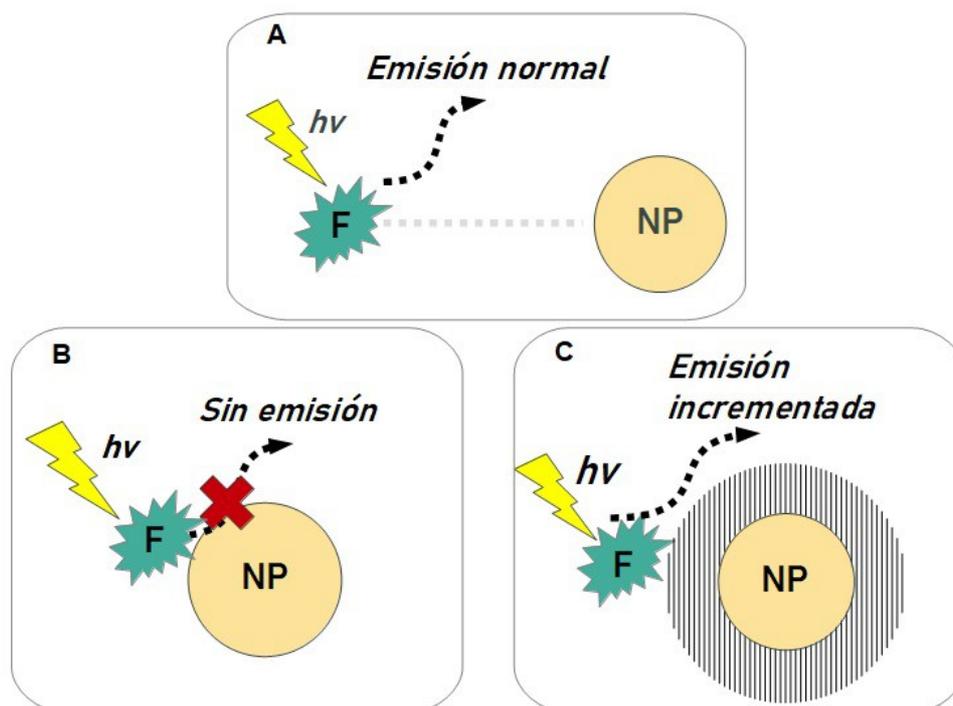


Fig. 5.1. Posibles efectos sobre la emisión de un fluoróforo en las inmediaciones de una NP. Estos efectos son dependientes principalmente de la distancia emisor-NP. **A)** Sistema no perturbado a grandes distancias. **B)** Quenching de emisión cuando hay contacto entre el emisor y la NP. **C)** Exaltación de la emisión de fluorescencia a distancias cortas y óptimas.

La modulación de la emisión de fluorescencia en función de la distancia fluoróforo-NP ha sido aprovechada principalmente para la detección de numerosos analitos,³⁰⁻³² pero no en el desarrollo de metodologías de detección para NP metálicas. Por lo tanto, resulta un área de interés que puede ser explorada.

5.1.2. Sondas moleculares fluorescentes y química analítica supramolecular

La química supramolecular se centra en el estudio de los fenómenos relacionados con las interacciones moleculares que van más allá del enlace covalente y que llevan a

la formación de nuevas estructuras *supramoleculares*, que presentan propiedades diferentes a las de los elementos que las constituyen.³³ Una de las entidades supramoleculares más estudiadas son los complejos de tipo *huésped-receptor*, donde diferentes moléculas se asocian como resultado de la complementariedad química entre los sitios de unión y de la compatibilidad de forma y tamaño entre el sustrato y el receptor macrocíclico que lo acoge, de forma similar a lo que sucede entre una enzima y su sustrato específico en la naturaleza.³⁴ La formación de un complejo sustrato-receptor afecta marcadamente las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped, como la solubilidad, reactividad química, las propiedades espectroscópicas y electroquímicas, entre otras.³⁵

Una de las familias de compuestos macrocíclicos más estudiadas es la de las ciclodextrinas (CD). Las CD son oligómeros cíclicos constituídos por unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1-4)-glicosídicos.³⁶ El número de monómeros que las conforman, determinan su nomenclatura: α -CD cuando están formadas por 6 unidades monoméricas, β -CD cuando son 7, y γ -CD cuando son 8.^{36,37} Estos macrociclos presentan una estructura de cono truncado, con una cavidad hidrofóbica en la que se pueden alojar sustratos afines, de acuerdo a sus tamaños y polaridad.³⁷ En las CD, la estructura macrocíclica se encuentra estabilizada por enlaces puente hidrógeno intramoleculares entre grupos hidroxilo de unidades de glucopiranosas adyacentes. Como resultado, las CD nativas suelen ser poco solubles en agua.³⁷ Una estrategia usual para aumentar la solubilidad de este tipo de compuestos en agua, es la modificación de las CD nativas mediante sustitución de los grupos hidroxilos por otros grupos hidrofílicos, como el 2-hidroxipropilo, dando origen a CD modificadas, como la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Fig. 5.2.).³⁸

Entre los compuestos que pueden formar estos complejos huésped-receptor, ingresando a la cavidad del macrociclo, se puede mencionar el carbazol, que ha sido estudiado previamente en nuestro laboratorio.³⁹ El carbazol (mostrado en la Fig. 4.10. del capítulo anterior) es un cromóforo con una importante emisión de fluorescencia⁴⁰ y, además, presenta en su estructura un heteroátomo (N) que puede interaccionar

con la superficie de NP metálicas de oro y plata, por lo que resulta un excelente candidato para ser utilizado como sonda molecular fluorescente en la detección de AuNP y AgNP.

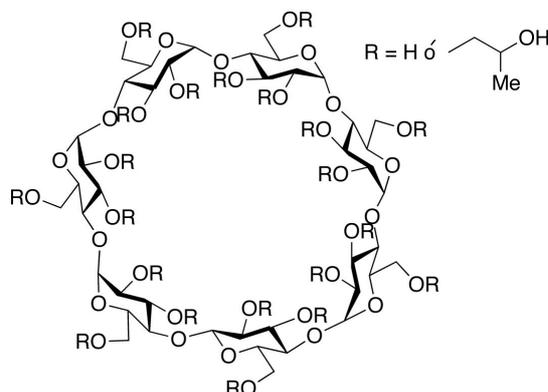


Fig. 5.2. Estructura química del compuesto macrocíclico 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Desde el punto de vista analítico, la formación de tales complejos permite, en ciertos casos, mejorar la eficiencia del método analítico para la determinación de diferentes especies químicas.⁴¹ El reconocimiento molecular que lleva a la formación de este tipo de complejos supramoleculares da lugar a una mejor separación y captura del analito, y a la obtención de ganancias de la señal analítica. En los últimos años se ha obtenido una gran variedad de sensores químicos fluorescentes con receptores macrocíclicos basados en la formación de complejos de inclusión.⁴²⁻⁴⁵ Considerando las ventajas que presenta la química supramolecular desde el punto analítico (mejor reconocimiento molecular, amplificación de señales analíticas, posibilidad de transformar información química a información instrumental, etc.), la generación de sistemas híbridos, mediante la interacción covalente o no covalente entre complejos supramoleculares fluorescentes y NP metálicas, puede resultar en el desarrollo de metodologías analíticas que mejoren significativamente la sensibilidad en contraparte a metodologías basadas en sistemas de sensado no supramoleculares.

5.1.3. Validación de métodos analíticos

Se conoce como validación al análisis que demuestra que un método analítico desarrollado es capaz de proveer suficiente especificidad, exactitud y precisión en la determinación de un analito en una dada muestra real. Este análisis proporciona evidencia básica para fundamentar la validez de los resultados obtenidos por el método propuesto con un cierto grado de confianza.⁴⁶

La validación de métodos analíticos para NP presentan algunos desafíos adicionales respecto al análisis químico regular ya que, por ejemplo, los resultados de una medida son una combinación de distribución de tamaños y de concentración. Durante el proceso de validación, el uso de materiales de referencia o materiales de referencia certificados (MRC) son preferidos, si están disponibles. Los MRC son producidos y caracterizados con altos estándares y vienen acompañados por certificados que declaran los valores de propiedades de interés del analito, como su concentración y la incerteza asociada a este valor. Usualmente, la utilización de MRC es la mejor alternativa para evaluar la exactitud de un nuevo método analítico, pero presentan la desventaja de tener un elevado costo económico y una baja disponibilidad para el gran número de matrices y analitos posibles.⁴⁷ Sin embargo, actualmente no existen materiales de referencia certificados para NP.^{48,49} Por lo tanto, la validación de los métodos deben incluir lineamientos relacionadas a los métodos de caracterización de los nanomateriales y a como llevar a cabo los fortificados (*spiking*) de los materiales de prueba.⁴⁸ Una alternativa para la validación de un método analítico es la realización de pruebas inter-laboratorios,⁵⁰ pero este tipo de estudios para NP en muestras ambientales todavía no han sido informados, ya que tienen un alto costo económico y requieren de mucho tiempo.

En el caso particular de la validación de métodos para la detección y cuantificación de NM, el conjunto de parámetros a evaluar son el intervalo lineal, la sensibilidad, el límite de detección (LOD), de cuantificación (LOQ), la precisión, la exactitud, la selectividad, la robustez y la recuperación.⁵¹ Los parámetros analíticos para la validación de métodos se encuentran descritos con mayor detalle en el Anexo

D de esta tesis doctoral.

5.1.3.1. Recuperación

Una de las mejores alternativas al uso de materiales de referencia son los ensayos de recuperación. La recuperación corresponde a la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado en una matriz. Este ensayo consiste en enriquecer la matriz seleccionada con una cantidad determinada del analito de interés y posteriormente aplicar el método analítico propuesto a la muestra.⁴⁷ Usualmente, se evalúan varios niveles de concentración a fin de construir una curva de calibración en presencia de la matriz. Si la sensibilidad obtenida en presencia de la matriz coincide con la sensibilidad determinada para el mismo analito, mediante el mismo método, y en ausencia de la matriz, se considera que la recuperación es igual al 100 % y que los efectos de matriz son despreciables.⁵² Si por el contrario, hay diferencias significativas entre las sensibilidades, estas se asocian a *efectos matriz*,⁵² que producen errores sistemáticos tanto por exceso como por defecto en la determinación del analito de interés.

La IUPAC distingue la recuperación aparente (R), y la recuperación o factor de recuperación (R*⁵³). La recuperación aparente (Ec. 5.1.) es el cociente entre la cantidad de analito determinada mediante la aplicación del método analítico propuesto (x_M) y el valor de referencia (x_R). Este valor de referencia corresponde a la cantidad de analito adicionada en la muestra previo al proceso de medición. Por lo tanto, la recuperación aparente se asocia sólo al error sistemático atribuido al efecto matriz.

$$R = \frac{x_M}{x_R} \quad \text{Ec. 5.1.}$$

El factor de recuperación (Ec. 5.2.) se refiere a la relación entre la cantidad de analito establecida por el método propuesto (C_M) y la cantidad presente en la muestra (C_R), ya sea original o adicionada, previamente a cualquier proceso de extracción o de pre-concentración de la muestra. En consecuencia, la recuperación está relacionada

con el error sistemático global del método analítico.

$$R^* = \frac{C_M}{C_R} \quad \text{Ec. 5.2.}$$

A partir de las recuperaciones aparentes determinadas a distintos niveles de concentración, es posible calcular una recuperación aparente promedio, con su correspondiente desviación estándar. La exactitud podrá comprobarse analizando si el valor de recuperación promedio determinado mediante el método analítico propuesto es significativamente igual o diferente al 100 %, realizando una prueba de hipótesis de comparación de medias a dos colas, a un determinado nivel de confianza α . Si se acepta la hipótesis nula (H_0) $R=100$ %, determinando el estadístico de contraste t-Student, entonces se puede afirmar que el método es exacto para la determinación del analito en matrices al nivel de confianza evaluado.⁵⁴

A lo largo de este capítulo, se discutirá sobre el desarrollo de un método analítico para nanomateriales de oro y plata utilizando sensores fluorescentes como estrategia de detección, desde la caracterización inicial de los componentes involucrados en el método analítico, pasando por estudios de interacción con sondas (supra)moleculares fluorescentes-NP metálicas, hasta los ensayos de validación finales.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar las propiedades fotofísicas de carbazol (CZL), del compuesto macrocíclico hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) y de mezclas de ambos mediante espectroscopia UV-visible y de fluorescencia.
- Determinar la constante de asociación del complejo formado entre CZL e HP β CD mediante técnicas espectroscópicas.
- Estudiar la interacción entre NP y las sondas fluorescentes CZL y CZL@HP β CD, considerando la influencia de las características de las NP empleadas (tamaño, material, ligando).

- Determinar la sensibilidad de los cambios espectroscópicos generados por la interacción NP-sondas fluorescentes.
- Determinar la desviación estándar de blancos químicos (S_{x_0}) y los parámetros analíticos para la validación del método propuesto: límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.
- Evaluar la selectividad del método propuesto.
- Aplicar el método espectrofluorimétrico a muestras de agua de río y de red domiciliaria enriquecidas con los analitos de interés, determinando la eficiencia y exactitud del mismo mediante ensayos de recuperación.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Reactivos

Los siguientes reactivos de grado analítico se utilizaron sin ningún protocolo de purificación previo: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), AgNO_3 (BioPack), NaOH (Merck), citrato de sodio dihidrato (Anedra), borohidruro de sodio (Tetrahedron), ácido gálico monohidrato (Merck), Irgacure-2959® (I-2959, Sigma-Aldrich), CZL 98 % (Sigma) e HP β CD (Roquette, grado sustitución 0,9). Las mediciones espectroscópicas se realizaron en solución de buffer fosfato (SBF) 0,05 M de pH 6,994 y metanol de calidad HPLC (Sintorgan), en una proporción 95 % v/v y 2 % v/v, respectivamente. La SBF se preparó a partir de fosfato dihidrógeno de potasio (J. T. Baker), fosfato monohidrógeno de disodio (AppliChem) y NaCl (Taurus) para ajustar la fuerza iónica.⁵⁵ En todas las soluciones preparadas se utilizó agua de calidad MilliQ.

5.3.2. Instrumentación y software

Los equipos de espectroscopia UV-visible y de fluorescencia fueron los mismos que se mencionaron en los capítulos 3 y 4, respectivamente. Para ambas metodologías se utilizaron celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, para UV-visible

o fluorescencia, según corresponda.

Las mediciones de pH se llevaron a cabo en un pHmetro Orion (Boston, MA, USA) modelo 720A, empleando un electrodo Ross combinado, que fue calibrado utilizando soluciones buffer estándar de pHs 4,008; 6,994 y 9,155.

La síntesis fotoquímica de nanopartículas de oro se realizó en un fotoreactor LuzChem modelo LZC-ORG de iluminación lateral con 10 lámparas UVA de 8 W.

El análisis de datos y de gráficos se realizaron usando OriginPro 8 (OriginLab Corporation). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software Minitab® 17 (Minitab, Inc.).

5.3.3. Caracterización espectroscópica de CZL e HP β CD

5.3.3.1. Espectroscopia UV-visible

Se preparó una solución madre de CZL disolviendo 25,0 mg de cristales en un volumen final de 5,0 mL con metanol como solvente, dada la baja solubilidad de este compuesto en medios acuosos, resultando una concentración de 0,030 M. Esta solución se almacenó a 4 °C, protegida de la luz hasta su uso.

Para evaluar el efecto del compuesto macrocíclico sobre la absorbancia de CZL, e intentando minimizar el error de las concentraciones finales de las soluciones mezcla, se prepararon dos soluciones de 100,0 mL: una solución de CZL de concentración 10,0 μ M; y una solución conteniendo la misma concentración de CZL que la anterior (10,0 μ M) y la máxima concentración de HP β CD utilizada, correspondiente a 10,0 mM, a partir de 1,5 g del compuesto sólido (P.F. CD con grado de sustitución 0,9= 1506,7 g mol⁻¹). El solvente utilizado en estas dos soluciones fue SBF de pH 7,0 al 95 % v/v y metanol como cosolvente al 2 % v/v para favorecer la solubilidad de CZL en el medio acuoso. Posteriormente, al mezclar las soluciones anteriores en diferentes proporciones, se obtuvieron mezclas con concentraciones finales de macrociclo que variaron entre 0 y 10,0 mM. Adicionalmente, se preparó una solución blanco de HP β CD, a fines comparativos, con la concentración máxima utilizada del mismo (10,0 mM).

Los espectros de absorción UV-visible de CZL, HP β CD y de las mezclas se determinaron entre 200 y 350 nm, a 25,0 °C, en un espectrofotómetro de doble haz.

5.3.3.2. Espectroscopia de fluorescencia

A partir de la solución madre de CZL (0,030 M), se obtuvo otra solución de concentración 0,15 mM en SBF/CH₃OH (95:2 % v/v). A partir de esta solución, se prepararon dos soluciones de 100,0 mL para evaluar los efectos de la HP β CD sobre la emisión de fluorescencia de CZL. La concentración de carbazol se redujo a 0,5 μ M, para evitar que ocurran fenómenos de autoabsorción ($A_{CZL} < 0,05$). La concentración del compuesto macrocíclico se mantuvo en 10,0 mM, ya que no presenta absorción a la longitud de excitación de CZL. A partir de estas dos soluciones se prepararon diferentes mezclas con [CZL] constante (0,5 μ M) y concentración de HP β CD entre 0 y 10 mM.

La longitud de onda de excitación fue 290,0 nm, y se obtuvieron los espectros de fluorescencia entre 300 y 500 nm, a 25,0 °C. Se emplearon anchos de rendija de 5,0 nm y una ganancia del detector de 650 V.

A partir de los espectros de emisión obtenidos, se determinó la constante de asociación entre CZL e HP β CD. El análisis cuantitativo de los espectros de emisión se realizó en función del área bajo la curva de las bandas de emisión de CZL, obtenidas por integración matemática de los espectros en Origin8® en el rango de longitudes de onda entre 326 nm y 450 nm. Los valores absolutos se relativizaron con respecto al área bajo la curva del espectro de CZL en ausencia de macrociclo ([CZL]=0,5 mM en SBF/CH₃OH 95:2 % v/v).

5.3.4. Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata y oro empleadas

Se sintetizaron seis diferentes tipos de nanomateriales de oro y plata, correspondiendo tres de ellos a AgNP y tres a AuNP. Las nanopartículas empleadas y las metodologías sintéticas se indican a continuación.

- ◆ *Nanopartículas de plata/gálico (AgNPg)*: estas nanopartículas se sintetizaron de acuerdo a lo desarrollado en el capítulo 3.

- ◆ *Nanopartículas de plata/citrato (AgNPc)*: se sintetizaron de acuerdo a una metodología propuesta en literatura que se realiza a partir de borohidruro de sodio parcialmente *envejecido*, denominada “síntesis de imitación de envejecimiento”.⁵⁶ Para la síntesis de las NP se prepararon dos soluciones de 5,0 mL: una conteniendo 0,5 mM de AgNO₃, y otra conteniendo una mezcla de borohidruro de sodio preparado *in situ* y borohidruro de sodio que se ha dejado reaccionar con agua durante 3 días (borohidruro *envejecido*) en proporción 1:3, y de concentración total 3,05 mM. Ambas soluciones se mezclaron en un erlenmeyer, con agitación vigorosa durante 10 minutos, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Posteriormente, se adicionó al erlenmeyer citrato de sodio 200 μM, que actúa como ligando y estabilizante. Estas nanopartículas se utilizaron sin centrifugado previo.
- ◆ *Nanovarillas de plata/citrato (AgNR)*: estas nanopartículas se sintetizaron de acuerdo a lo desarrollado en el capítulo 4.
- ◆ *Nanopartículas de oro/gálico (AuNPg)*: la preparación de las mismas se realizó de acuerdo al método propuesto por Yoosaf.⁵⁷ Para llevar a cabo la síntesis se adicionaron 90 μM de AG a un erlenmyer que contenía 270 μM de H₂AuCl₄·3H₂O a temperatura ambiente, con agitación vigorosa y cubierto de la luz. La mezcla se agitó durante 30 minutos, observándose el viraje de color de la solución de amarillo a rojo, indicando formación de AuNP. Las nanopartículas obtenidas se centrifugaron posteriormente a 3214 g durante 30 minutos.
- ◆ *Nanopartículas de oro/citrato (AuNPc)*: estas nanopartículas se sintetizaron mediante una metodología basada en el método de Turkevich.⁵⁸ Brevemente, se calentó a reflujo una solución acuosa de H₂AuCl₄·3H₂O de concentración 1,41 mM con agitación vigorosa. Luego, se agregaron 3,4 mM de citrato de sodio, manteniendo la agitación y el reflujo por 20 minutos. Luego de la adición del reductor, la solución previamente amarilla se tornó de color rojo intenso, indicando la formación del nanomaterial de oro. Posteriormente, las

nanopartículas obtenidas se centrifugaron a 4500 rpm (2604 g) durante 30 minutos.

- ◆ *Nanopartículas de oro/I-2959 (AuNP_{heba})*: estas nanopartículas se sintetizaron mediante una metodología fotoquímica⁵⁹ utilizando el fotoiniciador Irgacure®-2959. En una placa de cultivo transparente de poliestireno de 24 pocillos se colocaron 0,33 mM de HAuCl₄·3H₂O y 1,0 mM de I-2959. La placa se llevó a un fotoreactor de 10 lámparas UVA de 8 W y se irradió durante 30 minutos. Luego de la irradiación, la solución se tornó de color rojo, indicando formación de AuNP. Posteriormente, las NP obtenidas se centrifugaron a 3214 g durante 30 minutos. El estabilizante de estas nanopartículas es uno de los subproductos de la reacción fotoquímica, el 4-(2-hidroxi-etoxi)-ácido benzoico (heba).

De acuerdo a lo descrito para cada NP, en algunos casos las nanopartículas sintetizadas fueron sometidas a procesos de centrifugación para preconcentrar las muestras y para eliminar reactivos sin reaccionar que hayan podido quedar en solución. Todas las NP centrifugadas fueron resuspendidas en 6 mL de agua MQ y se almacenaron a 4 °C, protegidas de la luz.

Todas las NP obtenidas se caracterizaron por espectroscopia UV-visible para obtener la posición de la banda de plasmón superficial de cada tipo de partícula, y por microscopía electrónica (TEM) para obtener la morfología y distribución de tamaños de las NP. Para la caracterización espectroscópica, se tomaron alícuotas de 200 µL de cada tipo de NP, y se diluyeron en un volumen final de 3,0 mL con agua MQ. Las soluciones se trasvasaron a celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, registrando los espectros UV-vis entre 300 nm y 800 nm a 25,0 °C. Las imágenes TEM se obtuvieron del microscopio electrónico mencionado en la sección 3.3.2. Se emplearon las mismas metodologías para la preparación de las muestras y para el análisis de imágenes que se describen en 3.3.2. Para el caso de AgNR, el tamaño de las nanovarillas se determinó manualmente utilizando la herramienta *regla* de ImageJ®, del modo que se describió en el capítulo 4. Para cada tipo de NP, se contaron >1500 partículas para

obtener una distribución lo más representativa posible del sistema bajo estudio.

5.3.5. Interacción NP-sondas fluorescentes

La interacción de CZL y de CZL@HP β CD con AuNP y AgNP se estudió mediante espectroscopia de fluorescencia. Los espectros se registraron para ambos sistemas fluorescentes en presencia y ausencia de NP, en experimentos individuales para cada tipo de nanopartícula empleado. Todas las soluciones se prepararon a una concentración fija de CZL igual a 0,100 μ M y, para el caso del complejo, a concentraciones fijas de CZL/HP β CD iguales a 0,100 μ M y 5 mM, respectivamente. La concentración de CZL y la de HP β CD establecida fue la óptima para evitar la agregación de las nanopartículas, pero obteniendo una buena respuesta espectroscópica tanto del fluoróforo como de los cambios generados ante la presencia de las NP. En todos los casos, el solvente utilizado fue SBF/CH₃OH (92:2 % v/v). Las cantidades relativas de cada componente del buffer tuvieron que reajustarse para incorporar los volúmenes correspondientes de NP. La disminución de la concentración de SBF no afectó la estabilidad coloidal.

Los rangos de concentración de NP empleados en los experimentos de interacción fueron los siguientes: AgNPg (11–89 pM), AgNPc (66–530pM), AgNR (20–160pM), AuNPg (0,6–5,2 pM), AuNPc (19,7 – 157,9 pM), AuNP_{heba} (9,8 – 78,6 pM). La concentración de las nanopartículas se estimó considerando la polidispersidad de la distribución de tamaños de las mismas, de acuerdo a lo reportado en la literatura y al algoritmo presentado en el capítulo 4 en el caso de AgNR.⁶⁰

Las soluciones se prepararon siempre adicionando como último reactivo el volumen de NP necesario en el matraz conteniendo la solución de CZL o de complejo, a fin de evitar la agregación de las NP.

Las diferentes soluciones preparadas, tanto en presencia como en ausencia de NP, se excitaron a 290,0 nm, registrando los espectros de emisión entre 330,0 y 450,0 nm. Los anchos de rendija de emisión y de excitación del espectrofluorímetro se fijaron en 5,0 nm y la ganancia del detector se configuró en 800 V.

Dado que las NP presentan absorción en la región de excitación y de emisión, los espectros de emisión se corrigieron para tener en cuenta el efecto de filtro interno. Para ello, se utilizó la ecuación 4.10. mencionada en el capítulo 4,^{61,62} que permite contrarrestar la absorción, por parte de las NP, tanto de la radiación emitida por el CZL luego de ser excitado (λ_{em}), como de la radiación utilizada para producir la excitación del fluoróforo (λ_{ex}).

5.3.6. Determinación de parámetros analíticos

Para cada tipo de NP y para cada sistema de detección (CZL y CZL@HP β CD), la calibración se realizó a seis u ocho niveles de [NP] (dependiendo del tipo de partícula) de acuerdo a lo indicado en la sección 5.3.5. Cada nivel de concentración fue analizado por triplicado.

Para la determinación de los límites de detección y de cuantificación se calculó la desviación estándar del blanco químico (S_{x_0}) a partir de la media de las áreas relativas bajo la curva de replicados de CZL y del complejo (n=20) en ausencia de NP.

La exactitud y la repetibilidad del método propuesto se evaluó a tres niveles de concentración para cada tipo de NP, midiendo seis replicados por cada nivel (n=6) y determinando la concentración predicha por el método de acuerdo a la función de calibración obtenida previamente.

La precisión intermedia del método se determinó realizando las determinaciones analíticas en los mismos tres niveles de concentración que para el caso de la repetibilidad, pero en tres días diferentes, realizando seis replicados por cada muestra preparada (n=6).

La selectividad se evaluó mediante la adición de una alícuota de compuestos potencialmente interferentes (NaCl, H₂AuCl₄.3H₂O, AgNO₃, y otras NP) en soluciones que contenían la sonda fluorescente y una cantidad conocida de NP: AgNPg (47 pM), AgNPc (187 pM), AgNR (40 pM), AuNPg (5,0 pM), AuNPc (100,0 pM), AuNP_{heba} (50,0 pM). La cantidad adicionada de interferente fue ajustándose hasta obtener una variación de la señal analítica del 10 % (error asociado aproximado en la estimación de concentraciones “estándar” de NP)^{60,63} o mayor, que fue establecido como el valor

de tolerancia⁶⁴ ante la falta de pautas definidas respecto del análisis de NP en matrices ambientales.¹⁴

Para los ensayos de recuperación, el agua de red se recolectó en un frasco estéril de plástico desde una canilla externa al edificio de Ciencias II de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, en Ciudad Universitaria, Córdoba, luego de dejar circular agua durante 5 minutos, para lograr una depuración interna de las cañerías. El recipiente se enjuagó tres veces con la muestra de agua y posteriormente se lo llenó por completo. El agua de río se recolectó desde el río Ctalamochita, en dos localizaciones diferentes de su curso (previa y posterior a la zona industrial química) de la ciudad de Río Tercero, Córdoba (Fig. 5.3.). El agua se recolectó a nivel superficial, a contracorriente y en el medio del cauce del río, en botellas de plástico, enjuagando la botella varias veces hasta la recolección final. Tanto la muestra de agua de red como de agua de río se almacenaron en heladera hasta su uso.

Para el análisis, se prepararon soluciones conteniendo 0,100 μM de CZL en SBF/ CH_3OH (90:2 % v/v), a las que se les adicionó un 5 % v/v o un 10 % v/v de agua de red o de río sin tratamiento previo, de acuerdo al tipo de partícula estudiado. Posteriormente, cada solución se fortificó con AuNP y AgNP a tres niveles de concentración para cada tipo de NP, realizando seis replicados por muestra ($n=6$). Finalmente, se registraron los espectros de fluorescencia de cada solución de acuerdo a los parámetros ya mencionados anteriormente (sección 3.5.6.), y se determinaron los porcentajes de recuperación aparentes.



Fig. 5.3. Ubicación geográfica de los sitios de recolección de agua de río en su recorrido previo (★) y posterior (●) a la zona industrial.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Caracterización espectroscópica de CZL e HP β CD

La selección de CZL o de su complejo con HP β CD como potenciales moléculas o supramoléculas sensoras para la detección de nanopartículas metálicas se fundamenta en la capacidad de interactuar con la superficie metálica de compuestos que presentes heteroátomos (N, O, S) en su estructura molecular.^{14,65}

En primer lugar, se evaluaron las propiedades espectroscópicas del sistema estudiado, registrando los espectros UV-visible de CZL y de HP β CD. En la figura 5.4. se presentan los espectros de absorción obtenidos para cada compuesto, en SBF/CH₃OH (95:2 % v/v), donde se observa que CZL presenta máximos de absorción a 232,5 nm, 255,0 nm, 290,5 nm, 322,0 nm y 333,5 nm. Estas señales pueden asignarse a transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, características de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.⁶⁶ Por su parte, el compuesto macrocíclico no presenta señales importantes por encima de los 210 nm, lo que es esperado considerando la

ausencia de sistemas conjugados en HP β CD.

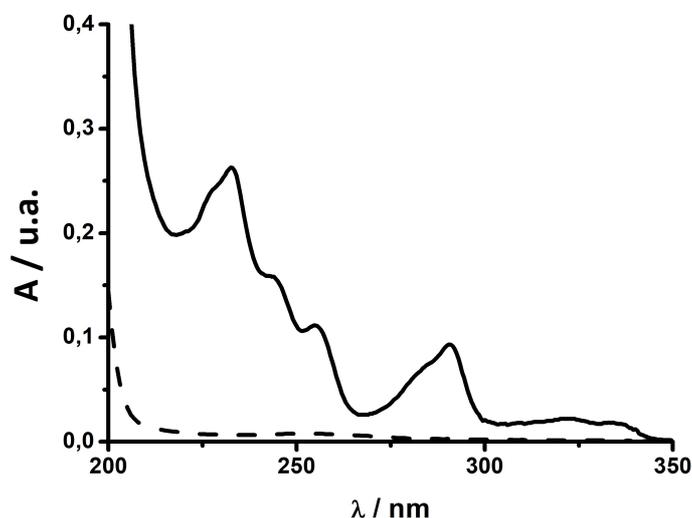


Fig. 5.4. Espectros de absorción UV-visible de CZL 10,0 μM (—) e HP β CD 10,0 mM (- - -) en SBF/CH₃OH (95:2 % v/v).

Luego de la caracterización de los componentes individuales por espectroscopia UV-visible, se procedió a analizar el efecto producido por la presencia del macrociclo en el espectro de absorción de CZL. En general, si existen interacciones específicas entre un receptor (R) y un sustrato (S) en sus estados electrónicos basales, esto puede conducir a la formación de un nueva especie R@S que puede tener propiedades espectroscópicas distintas a la de los componentes que le dieron origen.⁶⁷ Se registró el espectro UV-visible de CZL en presencia de CD en los mismos niveles de concentración que los utilizados en la caracterización de los componentes individuales, a fines comparativos. La figura 5.5.A muestra el espectro UV-visible obtenido para la mezcla de CZL/HP β CD y un espectro teórico obtenido como la suma espectral de los componentes individuales. Se puede observar que el espectro de absorción de la mezcla presenta un ligero corrimiento batocrómico (alrededor de 1,0 nm) de los máximos de absorción de CZL respecto de lo observado en el espectro de CZL en ausencia de HP β CD, que se desplazan a 234,0 nm; 256,5 nm; 293,0 nm; 323,0 nm y 334,0 nm (resolución en λ del equipo: 0,05 nm). Adicionalmente, se

define una nueva banda a 245,0 nm, que en el espectro de CZL aparecía como un hombro. Por otro lado, se produce, en general, un ligero incremento de la absorbancia respecto de la suma teórica, con algunas pequeñas regiones del espectro donde la absorbancia resulta menor. Esto puede apreciarse más fácilmente en la figura 5.5.B en la que se observan valores positivos de ΔA ($A_{\text{exp}} - A_{\text{teo}}$) en casi todo el rango espectral.

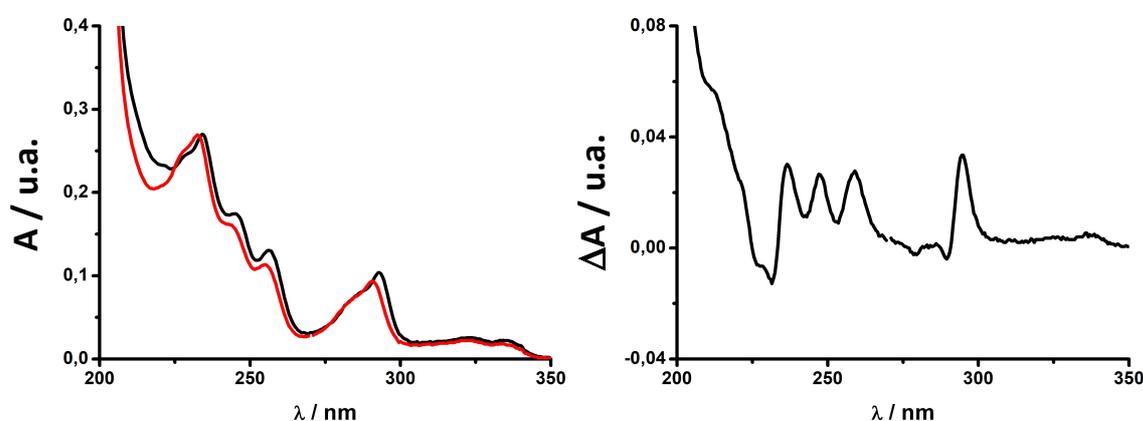


Fig. 5.5. A) Espectro UV-visible de CZL en presencia de HP β CD (—) y espectro aditivo teórico CZL+HP β CD (—) en SBF/CH₃OH (95:2 % v/v). **B)** Diferencias de absorbancia entre el espectro experimental y el espectro aditivo teórico.

Estos resultados sugieren que podría existir cierta asociación entre CZL e HP β CD. Esta asociación podría atribuirse a la formación de un complejo de inclusión, fundamentalmente por las interacciones de tipo hidrófoba entre la cavidad de la ciclodextrina y el núcleo carbazólico. Por otro lado, la formación del complejo también estaría favorecida por la presencia de grupos hidroxilo como sustituyentes de la CD, que pueden interaccionar mediante puente hidrógeno con el átomo de nitrógeno del CZL, o bien con el sistema electrónico π del sustrato mediante interacciones atractivas de tipo π - π .⁶⁸ La presencia de grupos donores de H también podría explicar el corrimiento batocrómico observado en el espectro, al afectar la diferencia de energía entre HOMO y LUMO de las transiciones de tipo $n \rightarrow \pi^*$, cuando los átomos de nitrógeno actúan como aceptores.⁶⁹ Sin embargo, las variaciones

espectrales fueron poco significativas y los cambios de absorbancia observados no llegaron a superar las 0,04 unidades, aún a una concentración de macrociclo 1000 veces mayor que la de sustrato. Por lo tanto, estos resultados no fueron suficientes para una determinación cuantitativa de la afinidad entre los componentes.

Respecto del análisis mediante espectroscopia de fluorescencia, la figura 5.6 muestra el espectro de CZL obtenido a un $\lambda_{exc}=290,0$ nm, uno de los máximos observados en el espectro de absorción. La emisión de fluorescencia de CZL es importante aún a niveles de concentración del orden de 10^{-9} M y presenta dos máximos parcialmente solapados a 345,0 nm y 360,0 nm. El compuesto macrocíclico no presenta espectro de emisión de fluorescencia.

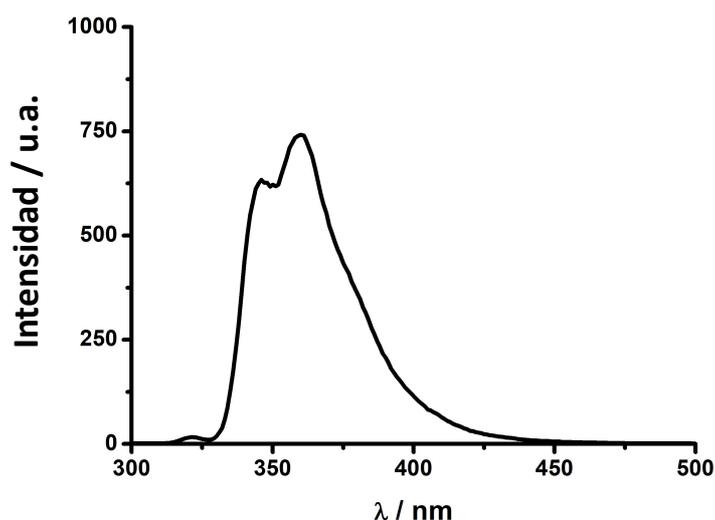


Fig. 5.6. Espectro de fluorescencia de CZL 500 nM en SBF/CH₃OH (95:2 % v/v). $\lambda_{exc}= 290$ nm. Potencia del detector: 650 V. 25,0 °C.

En general, el espectro de emisión de un determinado compuesto se asemeja a la imagen especular de la banda de absorción de la transición electrónica $S_0 \rightarrow S_1$, de acuerdo a la Regla de Kasha, y no varía con la λ_{exc} .⁷⁰ Por otro lado, la banda de emisión de una determinada transición electrónica se desplaza hacia longitudes de onda mayores respecto de la banda de absorción, siendo la diferencia de longitud de onda entre estas dos bandas el corrimiento de Stokes.⁷⁰ CZL muestra

comportamientos tradicionales en cuanto a su emisión de fluorescencia se refiere, siendo el perfil de emisión la imagen especular de la banda de absorción situada a 322,0 nm, con un corrimiento de Stokes de 3278,1 cm^{-1} .

Si bien HP β CD no presenta espectro de emisión de fluorescencia, se observó que sí produce efectos significativos sobre el espectro de emisión de CZL cuando los dos compuestos están presentes en solución. La figura 5.7. muestra espectros de emisión de CZL en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de HP β CD.

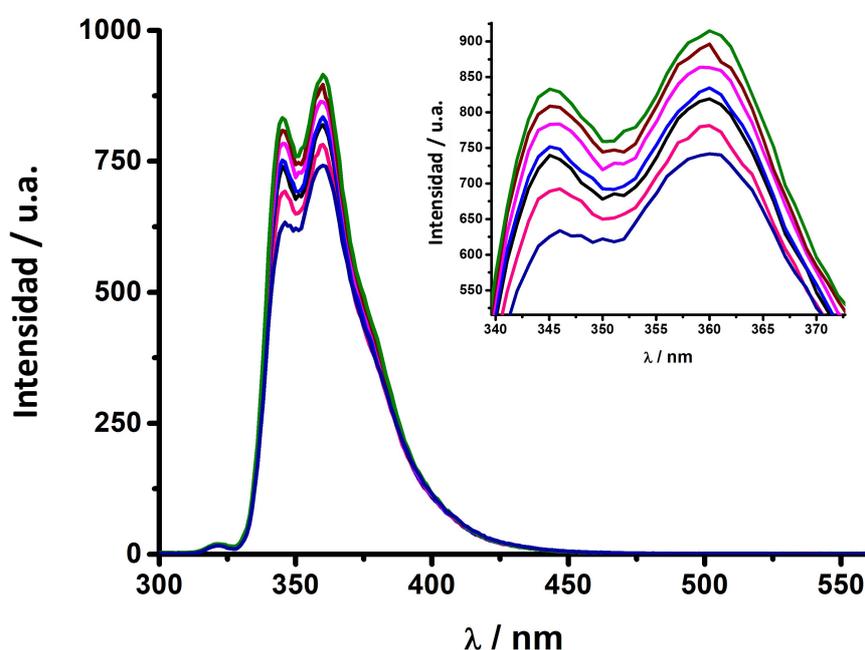


Fig. 5.7. Espectro de CZL 0,5 μM en ausencia de HP β CD (—). Espectro de CZL 0,5 μM en presencia de HP β CD 10,0 mM (—). Los espectros intermedios, en orden ascendente de intensidad, corresponden a CZL 0,5 μM en presencia de [HP β CD] 1,0 mM; 2,0 mM; 3,0 mM; 5,0 mM y 7,0 mM. Solvente: SBF/ CH_3OH (95:2 % v/v). $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$. Potencia del detector: 650 V. 25,0 $^\circ\text{C}$. Inset: espectro ampliado en la región de los máximos de emisión.

El efecto observado es la exaltación de la emisión del fluoróforo por presencia de la ciclodextrina, lo que indicaría la formación de un complejo entre los componentes. Resultados similares se observaron en el laboratorio empleando HP β CD con grado de sustitución 0,6.³⁹ La exaltación observada puede ser producto de la restricción de los grados de libertad de movimiento de CZL (aumento de la rigidez estructural) que

desfavorece los procesos de relajación no radiantes (conversión interna, transferencia de energía intermolecular, etc.) favoreciendo así la desactivación por emisión de fotones (fluorescencia), o bien producto de alteraciones de la micropolaridad circundante o de la protección de los estados excitados dentro de la cavidad cuando se forma un complejo.⁶⁷ Por lo tanto, es posible predecir, al menos cualitativamente, que el núcleo carbazólico está incluido en la cavidad de la ciclodextrina o asociado íntimamente a una de las caras de la cavidad de forma superficial. Los resultados obtenidos en espectroscopia de fluorescencia están de acuerdo con los observados mediante espectroscopia de absorción UV-visible pero, a diferencia de estos últimos, las variaciones espectrales observadas en emisión de fluorescencia si permitieron la determinación cuantitativa de la termodinámica de la formación del complejo (constante de asociación).

5.4.2. Determinación de la constante de asociación del complejo CZL@HP β CD

La asociación entre un receptor macrocíclico R y un determinado sustrato S puede ocurrir por inclusión del S dentro de la cavidad del R, formando una nueva especie S@R denominada endo-complejo. Si la interacción entre los dos componentes es, en cambio, de tipo superficial entre los grupos funcionales externos de R con S, entonces el complejo se denomina exo-complejo.^{35,67} La formación de un complejo R@S puede producir modificaciones de las propiedades físicas y químicas tanto de R como de S, o incluso presentar nuevas propiedades que son características del complejo una vez formado.³⁵ Para poder llevar a cabo la determinación cuantitativa de la afinidad entre los componentes de un complejo S@R se pueden utilizar diferentes técnicas instrumentales, como espectroscopia UV-visible, de fluorescencia o resonancia magnética nuclear (RMN), que permiten calcular los parámetros termodinámicos de el proceso mencionado, como la constante de asociación sustrato-receptor (K_A), y los cambios de energía libre (ΔG), de entropía (ΔS) y de entalpía (ΔH).⁷¹ Para poder determinar la constante de asociación se deben medir, mediante una técnica adecuada, las propiedades afectadas por la interacción entre huésped y receptor al ir variando la concentración de un componente mientras

la concentración del otro se mantiene constante.

Para este caso en particular, y considerando los resultados obtenidos y discutidos en la sección anterior, se llevó a cabo la determinación de la constante de asociación entre CZL e HPβCD mediante espectroscopia de emisión de fluorescencia.

Si suponemos que la estequiometría del complejo es 1:1, se establece el siguiente equilibrio químico, con una constante de equilibrio K_A (Ec. 5.3.)



$$K_A = \frac{[S@R]}{[S][R]} \quad \text{Ec. 5.3.}$$

En la ecuación 5.3. $[S]$, $[R]$ y $[S@R]$ son las concentraciones en equilibrio del sustrato y del receptor libres (no complejados), y del complejo, respectivamente.

Por otro lado, la intensidad de emisión de fluorescencia de un fluoróforo (expresada como unidades de área) cuya concentración cumple con la relación $2,303A < 0,05$ (A = absorbancia), se define como:

$$F = 2,303 B I_0 b \phi \varepsilon [S] \quad \text{Ec. 5.4.}$$

En la ecuación 5.4., B es una constante asociada a diversos parámetros instrumentales, I_0 representa la intensidad de la fuente de excitación, b es el paso óptico, ϕ es el rendimiento cuántico de fluorescencia, ε es la absorptividad molar a λ_{exc} y $[S]$ es la concentración molar del sustrato fluorescente. Si todas las constantes de proporcionalidad que relacionan la intensidad de fluorescencia con la concentración de sustrato en la ecuación 5.4. se agrupan en una única constante ζ , ésta puede reescribirse como indica la ecuación 5.5., donde los subíndices “o” indican ausencia de receptor.³⁹

$$F_o = \zeta [S]_o \quad \text{Ec. 5.5.}$$

Si se considera la presencia de un receptor macrocíclico R, la fluorescencia total del sistema será la sumatoria de las contribuciones individuales de las distintas especies presentes en el equilibrio, como se establece en la ecuación 5.6.

$$F = \zeta_S [S] + \zeta_R [R] + \zeta_{S@R} [S@R] \quad \text{Ec. 5.6.}$$

Como se mencionó previamente, para el caso de la HP β CD, no existe emisión de fluorescencia por parte del macrociclo, por lo que la ecuación anterior se simplifica a la ecuación 5.5.

$$F = \zeta_S [S] + \zeta_{S@R} [S@R] \quad \text{Ec. 5.7.}$$

Si consideramos la ecuación de la constante de equilibrio para la formación del complejo entre R y S (Ec. 5.1.), y reemplazamos [S@R] en la ecuación 5.7., obtenemos la ecuación 5.8.

$$F = [S] (\zeta_S + \zeta_{S@R} [R] K_A) \quad \text{Ec. 5.8.}$$

Teniendo en cuenta el balance de masa de una mezcla en equilibrio, $[S]_0 = [S] + [S@R]$, y la expresión de la constante de equilibrio (Ec. 5.3.), es posible definir una relación, F_R , entre la emisión de fluorescencia del sustrato en presencia (F) y en ausencia (F_0) de receptor, combinando las ecuaciones 5.6. y 5.5., que resulta en la siguiente expresión (Ec. 5.9.):

$$F_R = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \frac{\zeta_{S@R}}{\zeta_S} K_A [R]}{1 + K_A [R]} \quad \text{Ec. 5.9.}$$

La relación entre las constantes $\zeta_{S@R}$ y ζ_S es igual a $\varepsilon_{S@R} \Phi_{S@R} / \varepsilon_S \Phi_S$ y representa la relación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia del sustrato complejoado respecto del sustrato libre (Φ), siempre que $\varepsilon_{S@R} = \varepsilon_S$ a la longitud de onda de excitación. Si se trabaja en condiciones de pseudo-primer orden ($[R] \gg [S]$) de

forma tal que $[R] \approx [R]_0$, entonces la ecuación 5.9. puede reescribirse de la siguiente manera:

$$F_R = \frac{1 + \Phi K_A [R]_0}{1 + K_A [R]_0} \quad \text{Ec. 5.10.}$$

A partir de los datos de emisión de fluorescencia a una concentración constante de sustrato fluorescente, y a diferentes concentraciones iniciales de receptor $[R]_0$, es posible determinar la constante de asociación en complejos de estequiometría 1:1 a partir de la ecuación 5.10., denominada isoterma de asociación.

En la figura 5.8. se muestran los valores obtenidos de F_R a una concentración de CZL igual a $0,5 \mu\text{M}$ y concentraciones crecientes de HP β CD hasta $10,0 \text{ mM}$. Todas las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en condiciones de pseudo-primer orden.

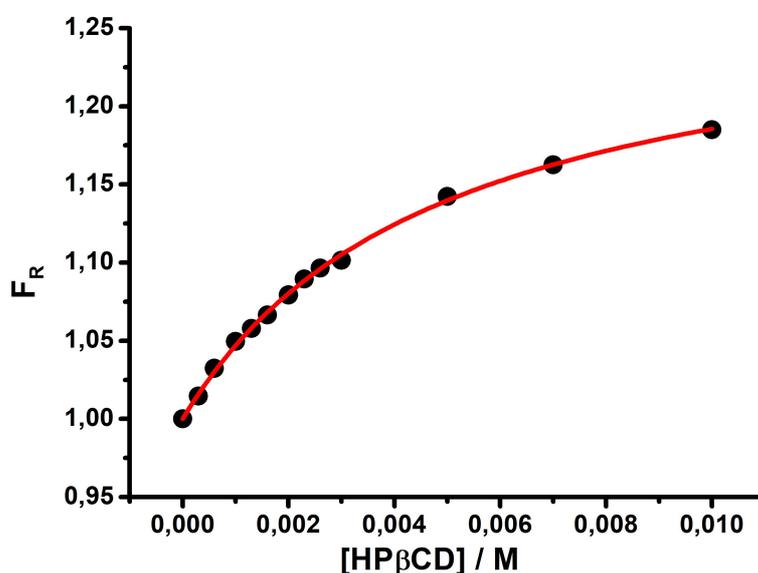


Fig. 5.8. Variación de F_R para $0,5 \mu\text{M}$ de CZL en función de $[\text{HP}\beta\text{CD}]_0$. Solvente: SBF/ CH_3OH (95:2 % v/v) $\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$. Potencia del detector: 650 V. $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$. En rojo se muestra el ajuste no lineal de los puntos experimentales de acuerdo a la Ec. 5.10.

A partir del ajuste de regresión no lineal de los datos obtenidos se obtuvo una

constante de asociación para el complejo igual a $(205 \pm 7) \text{ M}^{-1}$ y una relación de rendimientos cuánticos (Φ) igual a $(1,28 \pm 0,08)$. La constante de asociación entre CZL e HP β CD determinada previamente en nuestro laboratorio para una CD de grado sustitución 0,6 y mediante una metodología equivalente tuvo un valor igual a $(12 \pm 1) 10^2 \text{ M}^{-1}$.³⁹ Estos resultados indican que hay una fuerte dependencia de la afinidad entre sustrato y macrociclo con el grado de sustitución de este último. Este efecto podría atribuirse a que una mayor cantidad de grupos 2-hidroxipropilo en la ciclodextrina nativa podría dar lugar a efectos estéricos que desfavorecen la asociación entre los componentes. Estos resultados refuerzan la hipótesis sobre la formación de un complejo de inclusión entre CZL e HP β CD, ya que una mayor cantidad de grupos sustituyentes impediría, por efectos estéricos, la incorporación del sustrato a la cavidad de la ciclodextrina, razón por la cual se obtienen constantes de asociación más bajas. Sin embargo, cabe aclarar que los estudios realizados no proveen información estructural de la especie supramolecular formada. La relación de rendimientos cuánticos mayor a 1 indica que CZL presenta una mayor emisión de fluorescencia formando parte del complejo que como sustrato libre. Este incremento de la señal de fluorescencia de CZL en el complejo con HP β CD podría ser la base para desarrollar metodologías analíticas más sensibles para la detección y cuantificación de diferentes nanomateriales.

5.4.3. Síntesis y caracterización de las nanopartículas metálicas

Se sintetizaron seis nanomateriales de oro y de plata diferentes. La obtención de los nanomateriales cursó con cambio de coloración de las soluciones de partida, a tonalidades rojizas en el caso de AuNP y amarillas/verdes para AgNP. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por espectroscopia UV-visible con el objetivo de observar el perfil general de las bandas SPR (Fig. 5.9.).

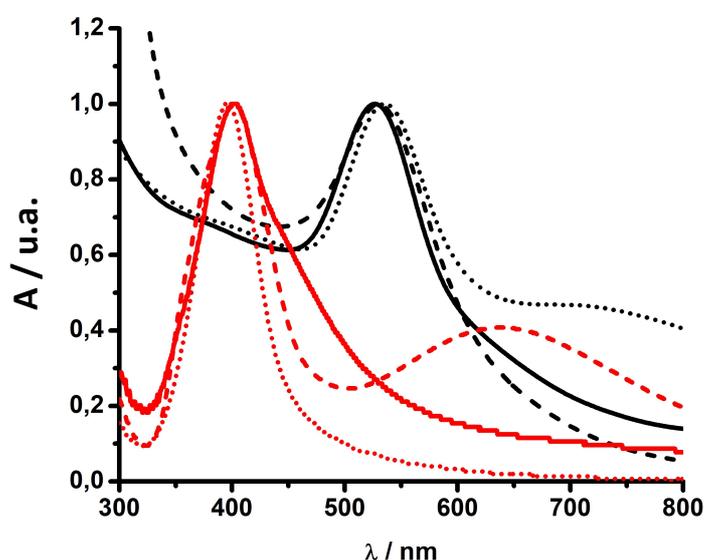


Fig. 5.9. Espectros UV-visible normalizados de nanomateriales de plata (rojo) y oro (negro). (—) AgNpC (.....) AgNpG (---) AgNR (—) AuNpC (.....) AuNpG (---) AuNp_{heba}

Las AuNP sintetizadas presentaron una banda SPR alrededor de los 530 nm en el espectro UV-visible, mientras que las AgNP, alrededor de los 400 nm. Particularmente, AgNR presentó dos bandas de plasmón (banda transversal y banda longitudinal) como consecuencia de su anisotropía morfológica, apareciendo la segunda banda a 630 nm. Los máximos de absorción observados para cada nanopartícula están en consonancia con lo esperado para este tipo de nanomateriales.⁷²⁻⁷⁴ Las posiciones de las bandas SPR de cada nanomaterial se resumen en la tabla 5.1.

Las NP también se caracterizaron mediante TEM para analizar la morfología y determinar las dimensiones de cada tipo de NP utilizada (Fig. 5.10.A-F). Desde el punto de vista morfológico, todas las partículas obtenidas, a excepción de AgNR, presentaron forma esférica. En el caso de AgNR, se obtuvo una mezcla de partículas esféricas y partículas en forma de varilla. Respecto de las dimensiones, las NP mostraron una distribución poblacional de tipo normal. Los tamaños promedio determinados por TEM se informan en la Tabla 5.1.

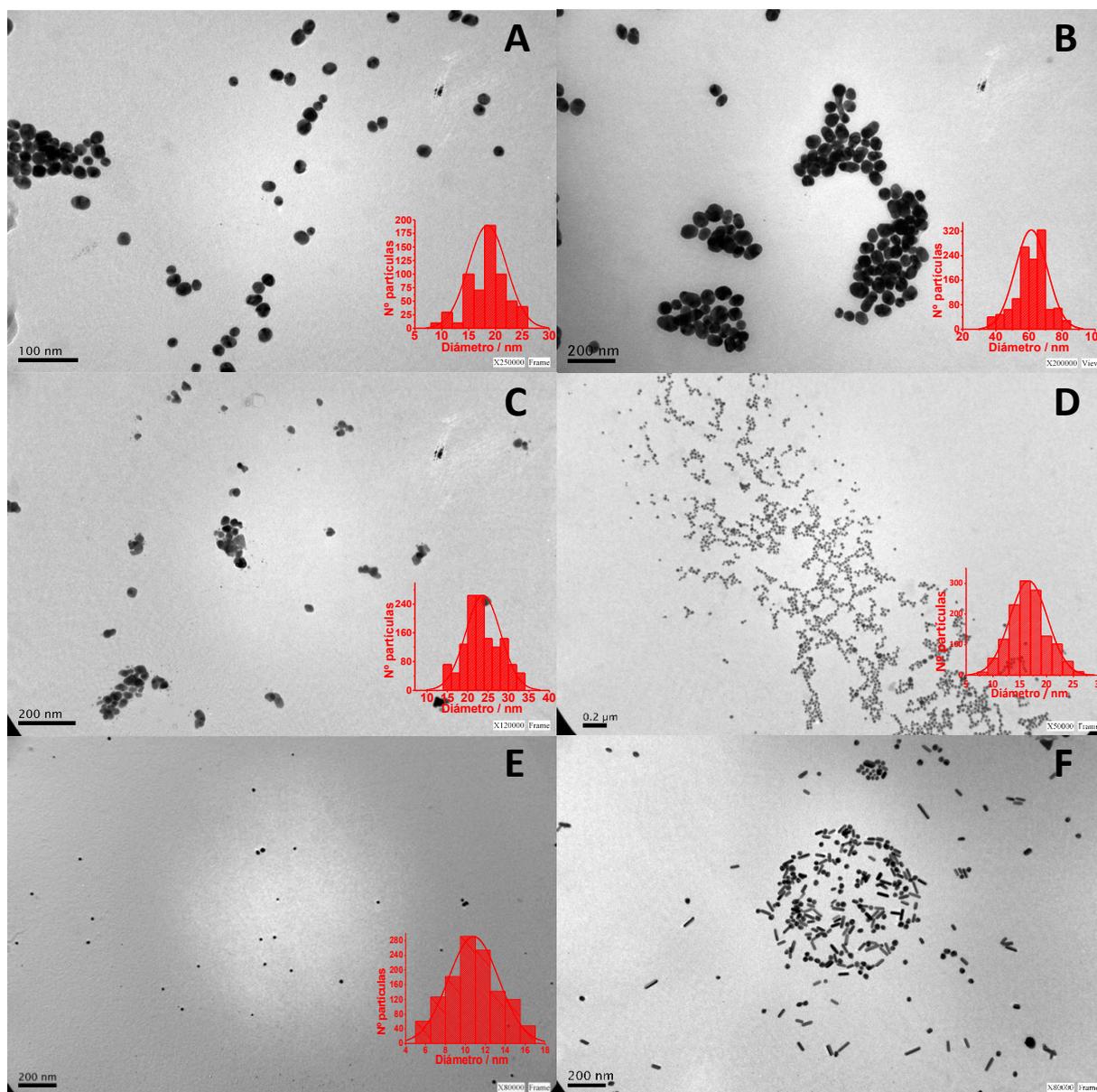


Fig. 5.10. Imágenes TEM representativas de las diferentes nanopartículas utilizadas y su distribución de tamaños. **A)** AuNPc **B)** AuNPg **C)** AuNP_{heba} **D)** AgNPg **E)** AgNPc **F)** AgNR. Para AgNR, la distribución de tamaños corresponde a la mostrada en el capítulo 4 (Sección 4.4.2.).

La concentración de las nanopartículas obtenidas se estimó mediante el algoritmo NaNoPoLC⁶⁰ (Anexo B) para aquellas con morfología esférica y con el algoritmo presentado en el capítulo 4 de esta tesis para AgNR (multiforma). La distribución de

tamaños se obtuvo para cada tipo de partícula mediante múltiples micrografías TEM, con el análisis de una gran población de partículas individuales (>1500). Las concentraciones calculadas para cada una de las nanopartículas sintetizadas se resumen en la tabla 5.1. Para el caso particular de AgNR, formadas por una mezcla de partículas esféricas y en forma de varillas, la concentración total fue (6,75±0,02) nM.

Tabla 5.1. Máximos de absorción, tamaños promedio y concentración de las nanopartículas sintetizadas.^a

Tipo de NP	λ_{\max} / nm	Diámetro medio / nm	[NP]/ nM	Tipo de NP	λ_{\max} / nm	Diámetro medio / nm	[NP]/ nM
AgNPg	396,5	16 (5)	0,86 (0,03)	AuNPg	535,0	61 (9)	78 (1)
AgNPc	402,0	11 (5)	6,75 (0,02)	AuNPc	527,0	18 (5)	23,68 (0,8)
AgNR	402,0	E 15 (5)	3,17 (0,01)	AuNP_{heba}	530,0	24 (4)	1,18 (0,01)
	638,0	V Largo: 54 (9) Ancho: 13 (2)	3,58 (0,01)				

^a Entre paréntesis se informa la desviación estándar.

(E) Esferas, (V) varillas.

5.4.4. Interacción NP-sondas fluorescentes

Los estudios de interacción entre las sondas fluorescentes, CZL y CZL@HP β CD, con los diferentes nanomateriales sintetizados se llevaron a cabo mediante espectroscopia de fluorescencia. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, se ha observado que las propiedades fluorescentes de las sondas están estrechamente relacionadas con la distancia existente entre la misma y la superficie metálica del nanomaterial, como resultado de la interacción plasmónica entre los componentes.¹⁵ En la figura 5.11. se muestra, a modo representativo, la emisión de fluorescencia de soluciones de concentración fija de las sondas fluorescentes estudiadas al interaccionar con AgNPg y AuNPg, a diferentes niveles de [NP].

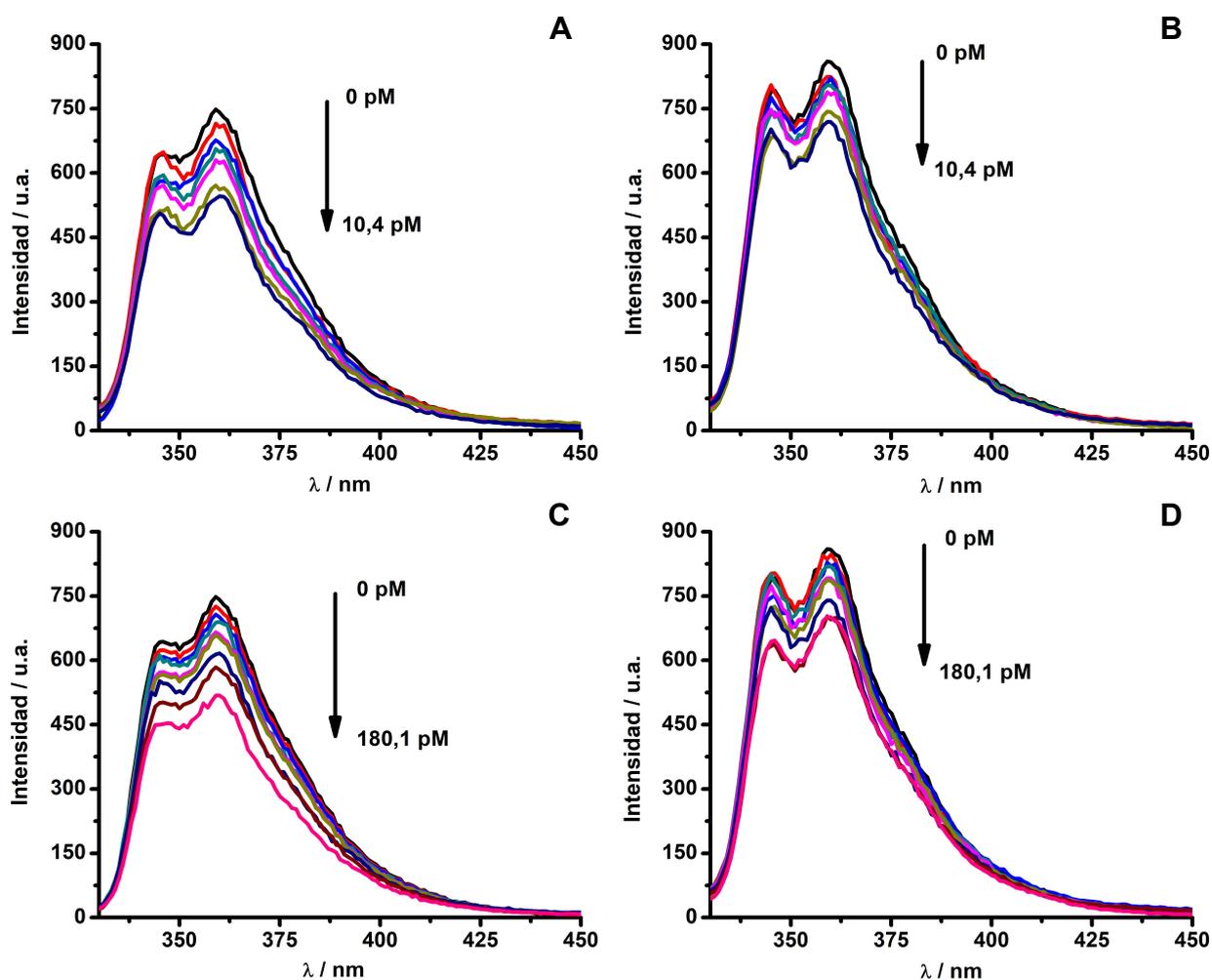


Fig. 5.11. Efecto de la concentración creciente de NP sobre las sondas fluorescentes estudiadas, en SBF/CH₃OH (92:2 % v/v) a 25,0 °C. **A)** AuNPg/CZL, **B)** AuNPg/CZL@HPβCD, **C)** AgNPg/CZL, **D)** AgNPg/CZL@HPβCD.

Los espectros de fluorescencia muestran una clara disminución de la emisión de CZL y de CZL@HPβCD ante el aumento de la concentración de AuNPg y AgNPg (*quenching*). Para el resto de las partículas estudiadas se observaron efectos similares. La única excepción fue la muestra AgNPc/complejo, en la cual no se observaron variaciones significativas de la emisión del fluoróforo. La desactivación de la emisión de fluorescencia observada indica que el fluoróforo se posiciona en las inmediaciones de las AgNP y AuNP, probablemente por la presencia del átomo

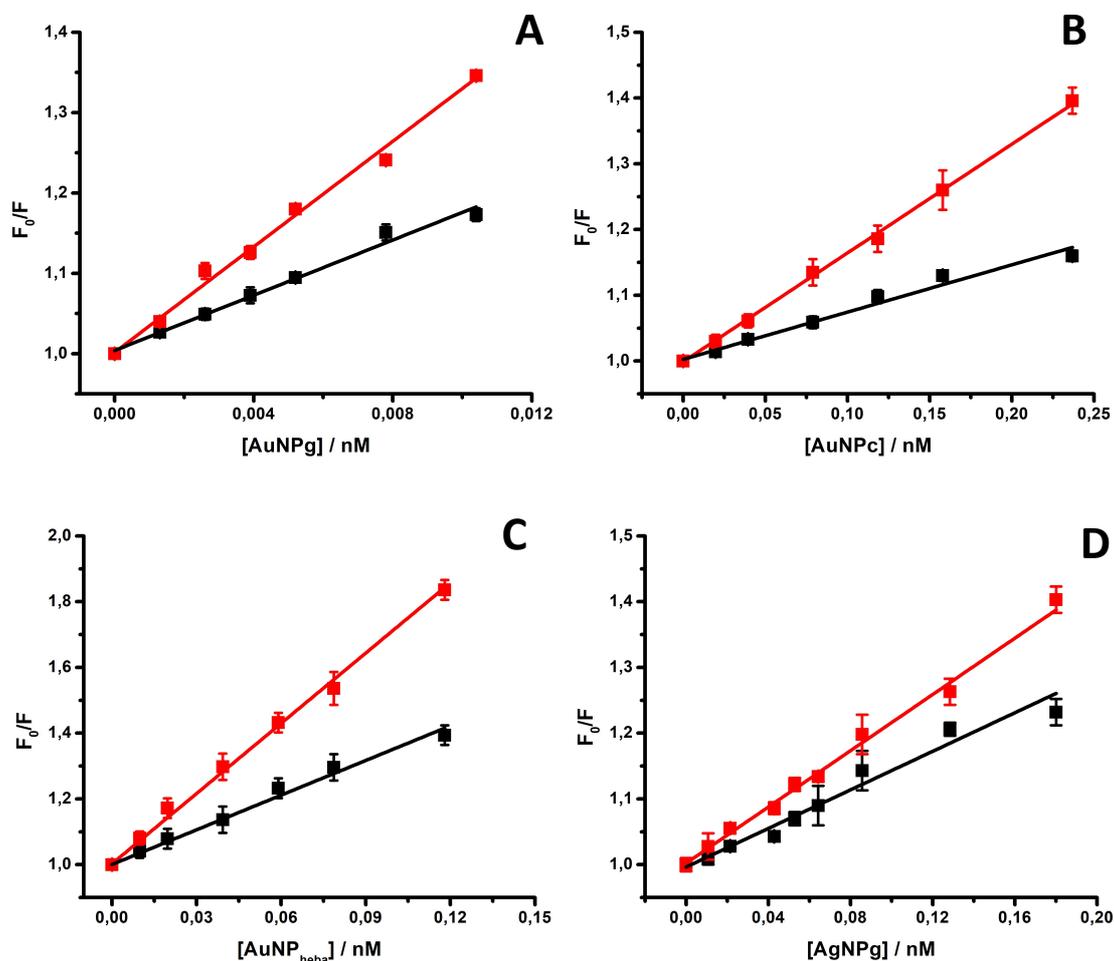
electronegativo de nitrógeno en la estructura del CZL que interacciona atractivamente con la superficie metálica.⁶⁵ Como se mencionó previamente en la sección 5.1.1., el *quenching* de fluorescencia puede ocurrir por FRET,⁷⁵ como consecuencia del solapamiento de la banda de emisión del donador (CZL) con la banda de absorción del aceptor (NP) dentro de la región espectral.²⁸ En este caso particular, si se comparan los espectros de absorción de las diferentes nanopartículas utilizadas (Fig. 5.9.) con los espectros de emisión de CZL (Fig. 5.11.), se puede observar que hay solapamiento espectral en toda la región de emisión del fluoróforo. Otra explicación a la atenuación de la fluorescencia observada puede ser la transferencia de energía superficial (SET), que puede surgir como resultado de una fuerte interacción de los electrones libres de la banda de conducción de la superficie metálica con el campo electromagnético del dipolo del donador cuando éste se encuentra muy cerca del metal.⁷⁶ A diferencia de FRET, SET no requiere una transición electrónica discreta resonante, sino que la interacción ocurre con los niveles electrónicos continuos del sistema metálico.^{76,77} Es probable que ambos mecanismos ocurran simultáneamente, dando lugar al *quenching* de fluorescencia de CZL observado.

La dependencia de la desactivación de la fluorescencia con el incremento de concentración de las nanopartículas metálicas (*quenchers*) responde a la ecuación de Stern-Volmer. Si bien la derivación formal de la ecuación de Stern-Volmer surge de considerar las velocidades de todos los procesos de desactivación de un fluoróforo en el estado excitado, es posible obtener dicha ecuación teniendo en cuenta la formación de un complejo entre la sonda fluorescente (CZL) y el *quencher* (NP), de forma similar al análisis realizado en la sección 5.4.2. Con estas consideraciones, la ecuación 5.10. puede escribirse de la siguiente manera (Ec. 5.11.), donde Φ toma el valor cero ya que $\zeta_{\text{CZL@NP}}$ es nulo al considerar que la nanopartícula desactiva completamente la emisión de fluorescencia de la sonda en la proximidad de la superficie metálica.

$$F_R = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \Phi K[\text{NP}]}{1 + K[\text{NP}]} = \frac{1}{1 + K[\text{NP}]} \quad \text{Ec. 5.11.}$$

La recíproca de la ecuación 5.11. es una función lineal que corresponde a la ecuación de Stern-Volmer que fue presentada en el capítulo 4 (Ec. 4.11.). Esta ecuación relaciona las señales relativas de fluorescencia de la sonda en ausencia y presencia de las nanopartículas metálicas con la concentración de NP, donde K es igual a la constante de Stern-Volmer (K_{SV}).

En función de los resultados obtenidos para cada tipo de nanopartícula, se graficaron las curvas de Stern-Volmer (Fig. 5.12.A-F), tomando la relación de áreas bajo la curva de los espectros de emisión en ausencia de NP (F_0) y en presencia de las mismas (F) a diferentes niveles de [NP].



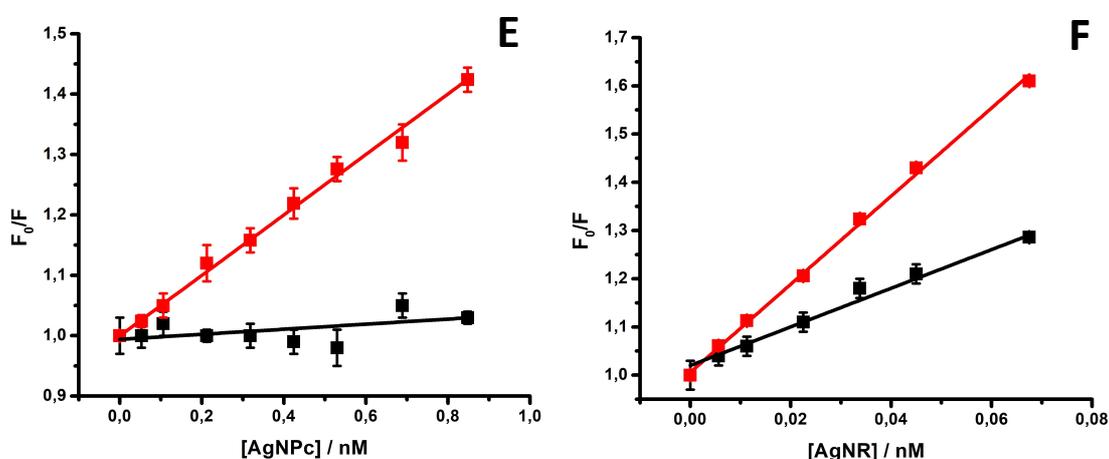


Fig. 5.12. Curvas de Stern-Volmer de CZL (rojo) y CZL@HP β CD (negro) en presencia de nanopartículas metálicas en SBF/CH₃OH (92:2 % v/v) a 25 °C. **A)** AuNPg. **B)** AuNPc. **C)** AuNP_{heba}. **D)** AgNPg. **E)** AgNPc. **F)** AgNR. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de triplicados de cada nivel de concentración.

A excepción de la muestra AgNPc/CZL@HP β CD, se observó comportamiento lineal, y por lo tanto se pudieron calcular las constantes de Stern-Volmer (Tabla 5.2.) correspondientes mediante regresión lineal por cuadrados mínimos de acuerdo a la ecuación 5.12.

Tabla 5.2. Constantes de Stern-Volmer de CZL y CZL@HP β CD para cada tipo de NP a 25,0 °C.^a

Tipo de NP / tamaño medio (nm) ^b	K _{SV} ^c / 10 ⁹ M ⁻¹	
	CZL	CZL@HP β CD
AuNPg / 61 (9)	32,7 ± 0,6	17,2 ± 0,8
AuNPc / 18 (5)	1,65 ± 0,07	0,72 ± 0,03
AuNP _{heba} / 24 (4)	7,1 ± 0,2	3,5 ± 0,2
AgNPg / 16 (5)	2,1 ± 0,1	1,47 ± 0,06
AgNPc / 11 (5)	0,50 ± 0,02	-
AgNR / esferas 15 (5) varillas 54 (9) x 13 (2)	9,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2

^a [CZL]= 100 nM; [CZL@HP β CD]= 100 nM:5,0 mM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas= 5 nm; SBF/CH₃OH (92:2 % v/v).

^b Entre paréntesis se informa la desviación estándar.

^c El error informado es el error estándar de la calibración.

En términos generales se puede observar que los valores de K_{SV} obtenidos con CZL fueron siempre mayores que aquellos obtenidos con el complejo CZL@HP β CD para todos los tipos de partícula estudiados. En todos los casos, las constantes disminuyeron entre un 30 % y 66 % respecto de las determinadas para CZL. Incluso para AgNPc, se observa que las concentraciones crecientes de AgNP no afectan la emisión de fluorescencia de CZL@HP β CD y no se puede determinar un valor de constante. Si bien el complejo presenta una emisión de fluorescencia más intensa que el sustrato aislado, su interacción con las nanopartículas metálicas está aparentemente desfavorecida, resultando en menores constantes de Stern-Volmer. Es muy probable que la inclusión del fluoróforo en la cavidad de la ciclodextrina impida el acercamiento de CZL hasta la superficie metálica del nanomaterial, afectando los procesos fotofísicos de transferencia de electrones o energía que ocurren a nivel superficial, lo que conduce a una desactivación de la fluorescencia menos marcada. La disminución de intensidad de emisión observada podría ser entonces resultado de la interacción de las NP únicamente con CZL libre, que no forma parte del complejo con la ciclodextrina. Cabe aclarar que trabajos realizados con anterioridad en el laboratorio mostraron que no hay interacción apreciable entre CD y las NP estudiadas, no observándose ninguna variación significativa de las propiedades espectroscópicas, morfológicas o de estabilidad de las NP.⁷⁸ Estos resultados se reconfirmaron para la HP β CD utilizada en estos experimentos mediante estudios exploratorios iniciales.

Por otro lado, se observa que la naturaleza del nanomaterial (metal, ligando, tamaño) también tiene una gran influencia sobre la desactivación de la fluorescencia de CZL. Si bien no es posible hacer un análisis sistemático de la influencia de cada variable sobre las constantes de Stern-Volmer determinadas, es posible obtener algunas generalizaciones. Se observa que el valor de K_{SV} está particularmente influenciado por el tamaño de las partículas, con mayores K_{SV} en partículas con mayores diámetros promedio. Si bien se podría esperar que las partículas de menor tamaño presentaran un mayor porcentaje de *quenching* como resultado de una

mayor área superficial disponible, también hay que considerar que aquellas nanopartículas que se obtuvieron con mayores dimensiones también lo hicieron con mayor polidispersidad, y la contribución de las partículas de menor tamaño podrían influir de manera importante en la desactivación de la fluorescencia. Sin embargo, no hay posibilidades de comparar esta variable independientemente del resto de las características de las NP ya que no se disponía de nanopartículas del mismo material y ligando pero de diferentes dimensiones. Un caso particular es el de AgNR, conformado por partículas esféricas, de tamaño comparable a aquellas en AgNPc, y partículas en forma de varilla. La K_{SV} determinada para AgNR es aproximadamente 18 veces mayor que para AgNPc, aun conteniendo el mismo ligando sobre la superficie. Esto da indicios de que la forma también juega un rol importante en la interacción de la sonda con la superficie del nanomaterial, aunque también puede ser consecuencia del mayor tamaño que presentan las varillas, de acuerdo con lo discutido anteriormente.

Para el mismo tipo de metal, si se compara la influencia del ligando sobre los valores de K_{SV} , se puede concluir que las constantes son mayores cuando el ligando es ácido gálico y menores cuando es el anión citrato. Este comportamiento se observa independientemente del tipo de metal y se asocia a la fuerza de interacción del ligando con la superficie metálica o al grado de superficie metálica libre disponible para interaccionar con CZL, ya que el *quenching* requiere interacción superficial.²⁷

Si se considera el tipo de metal, las K_{SV} obtenidas resultaron siempre mayores con AuNP que con AgNP cuando el ligando sobre la superficie metálica fue el mismo, llegando a ser hasta 15 veces mayor para el caso de las nanopartículas funcionalizadas con ácido gálico, aunque hay que tener en cuenta que las NP comparadas también tienen una gran diferencia de tamaños. Estos resultados indicarían que existe una mayor afinidad de CZL por los átomos de oro que por los de plata en la superficie del nanomaterial. Si la interacción entre CZL y el metal está mediada principalmente por fuerzas de tipo electrostáticas o dipolares, y mediadas por el par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno de carbazol, la mayor afinidad de la sonda fluorescente por el oro podría explicarse por la mayor electronegatividad de este elemento.

Si bien es posible hacer estas generalizaciones, hay que tener en cuenta que todas las variables que caracterizan el nanomaterial influyen simultáneamente sobre la capacidad de desactivar la emisión de la sonda fluorescente, y es muy probable que existan interacciones entre factores que no puedan analizarse sin estudios más profundos y sistemáticos, que estaban fuera del objetivo de esta tesis.

En todos los casos bajo estudio se obtuvieron respuestas lineales para el *quenching* de fluorescencia de CZL o del complejo CZL@HP β CD producido por el incremento de la concentración de las nanopartículas metálicas, con mayor o menor sensibilidad dependiendo de cada caso. Por lo tanto, esta estrategia podría ser útil para el desarrollo de un método analítico que permita la detección y cuantificación de este tipo de nanomateriales, principalmente en sistemas ambientales acuáticos. Para ello, se llevaron a cabo diferentes experimentos con el objetivo de validar el método propuesto, que se describen en la siguiente sección.

5.4.5. Determinación de parámetros analíticos de los métodos propuestos

5.4.5.1. Linealidad y sensibilidad de calibración

En base a lo discutido en la sección 5.4.4., es posible utilizar la relación entre las variables (F_o/F) y $[NP]$ como curva de calibración de un nuevo método analítico. De esta manera, los parámetros estadísticos de la calibración, es decir, la sensibilidad (m) y la señal del blanco, corresponden a K_{SV} y a la señal analítica de CZL en ausencia de cualquier nanopartícula ($F_o/F=1$), respectivamente.

La correlación entre la señal analítica y la concentración de NP se comprobó mediante el coeficiente de Pearson r , mientras que el modelo lineal se validó en cada caso mediante un test ANOVA, el análisis del estadístico F y un test de falta de ajuste (LOF). Todos los parámetros estadísticos determinados se resumen en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Estadísticos F , p -valor $>LOF$ y coeficientes de correlación r del modelo lineal de la calibración.

CZL					CZL@HP β CD				
Tipo de NP	F	p-valor $>F^a$	p-valor $>LOF^b$	r	Tipo de NP	F	p-valor $>F^a$	p-valor $>LOF^b$	r
AuNPg	826,4	$9,5 \times 10^{-7}$	0,914	0,9970	AuNPg	640,1	$1,8 \times 10^{-6}$	0,848	0,9961
AuNPc	4985,4	$1,1 \times 10^{-8}$	0,380	0,9995	AuNPc	310,5	$1,1 \times 10^{-5}$	0,236	0,9920
AuNP _{heba}	2757,6	$4,7 \times 10^{-8}$	0,516	0,9990	AuNP _{heba}	902,3	$7,7 \times 10^{-7}$	0,849	0,9972
AgNPg	848,7	$1,4 \times 10^{-8}$	0,988	0,9959	AgNPg	257,0	$8,9 \times 10^{-7}$	0,818	0,9866
AgNPc	3583,2	$7,4 \times 10^{-11}$	0,405	0,9998	AgNPc	6,8	0,05	0,039	0,7010
AgNR	2665,6	$5,2 \times 10^{-8}$	0,346	0,9991	AgNR	491,1	$3,5 \times 10^{-6}$	0,359	0,9950

^a Un p -valor menor a 0,05 indica que el modelo lineal es significativo al 95 % de confianza.

^b Un p -valor mayor a 0,05 indica que la falta de ajuste no es significativa al 95 % de confianza, y que el modelo lineal es adecuado.

Para todas las nanopartículas estudiadas, a excepción de AgNPc, se obtuvieron resultados que comprueban la relación lineal entre las variables F_o/F y [NP]. El coeficiente de correlación para la calibración de AgNPc con CZL@HP β CD indicó que existe baja dependencia entre la variable dependiente y la independiente, y el estadístico F comprobó que los resultados no pueden ajustarse a un modelo lineal al 95 % de confianza. Para el resto de las nanopartículas evaluadas se obtuvieron valores de r superiores a 0,99, indicando una alta dependencia entre la desactivación de la fluorescencia de CZL y la concentración de las nanopartículas. Por otro lado, la comparación de los valores de F calculados con los F críticos para cada caso condujeron a p -valores mucho menores que 0,05, indicando la validez del modelo lineal al 95 % de confianza en el intervalo de concentraciones estudiado para estas nanopartículas. La falta de ajuste resultó no significativa para todos los sistemas evaluados (p -valor $LOF > 0,05$), a excepción del caso de AgNP que fue mencionado anteriormente. Que la LOF sea no significativa indica que no hay evidencias que permitan afirmar que la curva de calibración está sesgada y que, por lo tanto, aplicar el modelo de ajuste lineal es apropiado. Asimismo, se comprobaron los supuestos de

normalidad de los residuales de la regresión lineal y la homocedasticidad (iguales varianzas para cada observación) de estos residuales en todos los casos en los que el modelo lineal fue válido.

Los valores de sensibilidad determinados para las diferentes calibraciones se corresponden con las constantes de Stern-Volmer de los experimentos de *quenching* de fluorescencia, y se mostraron previamente en la tabla 5.2. En todos los casos, las sensibilidades de calibración estuvieron en el orden de 10^9 M^{-1} , siendo siempre mayores para CZL que para CZL@HP β CD, independientemente del tipo de nanopartícula analizada, como ya se mencionó anteriormente. El método propuesto resulta, en general, más sensible para partículas de oro, de mayor tamaño y con ácido gálico como ligando.

5.4.5.2. Límites de detección y cuantificación

Los LOD y LOQ se determinaron según las definiciones de la IUPAC presentadas en el Anexo D de esta tesis (Ec. C.7. y C.9., respectivamente). A tal fin, se determinó la desviación estándar de la señal analítica del blanco químico (S_{x_0}) en ausencia de nanopartículas a partir de la medición de los espectros de fluorescencia de dos conjuntos de 20 soluciones de CZL (100 nM) y CZL@HP β CD (100 nM:5 mM), que actúan como sensores analíticos del método propuesto. Los valores de S_{x_0} determinados resultaron iguales a 0,006 (CZL) y 0,005 (CZL@HP β CD). Las desviaciones de los blancos resultan muy similares, independientemente de la presencia de la ciclodextrina en el caso del complejo, por lo que las diferencias de LOD y LOQ son principalmente resultado de las diferentes sensibilidades de cada sensor.

La tabla 5.4. muestra los valores calculados de LOD y LOQ para cada tipo de partícula analizada.

Tabla 5.4. Límites de detección y cuantificación de diferentes NP empleando el método analítico propuesto.^a

Tipo de NP	LOD / 10 ⁻¹² M		LOQ / 10 ⁻¹² M	
	CZL ^{ab}	CZL@HPβCD ^c	CZL ^b	CZL@HPβCD ^c
AuNPg	1,10	1,19	3,3	3,6
AuNPc	16,1	21,0	48,3	63,1
AuNP _{heba}	5,4	6,5	16,3	19,4
AgNPg	10,1	20,4	30,4	61,2
AgNPc	34,5	-	103,4	-
AgNR	3,3	10,6	9,9	31,8

^a Los límites de detección y cuantificación se determinaron de acuerdo a las ecuaciones C.7. y C.9., respectivamente.

^b [CZL]= 100 nM.

^c [CZL@HPβCD]= 100 nM:5 mM.

En la mayoría de los casos los límites de detección determinados se encontraron en el orden de los pM (10⁻¹² M), indicando que el método analítico propuesto permite la detección y cuantificación de muy pequeñas concentraciones de nanopartículas, independientemente del material o ligando. De todas las partículas analizadas, la metodología mostró mejores resultados con AuNPg, AgNP_{heba} y AgNR, como consecuencia de sus mayores efectos sobre la fluorescencia de CZL, como ya se discutió previamente en la sección 5.4.4. Al comparar los resultados obtenidos con los dos sistemas de sensado, se observó que no hay una mejora significativa de los LOD y LOQ por la presencia de la ciclodextrina y, en todos los casos, los valores obtenidos son mayores a los determinados utilizando únicamente CZL como sensor. Estos resultados eran esperados ya que, en general, CZL@HPβCD presenta una menor sensibilidad ante todas las partículas analizadas y la desviación del blanco (S_{x0}) resulta comparable a la de CZL. Teniendo en cuenta que la exaltación de fluorescencia observada cuando se forma el complejo no se tradujo en una mejora de los diferentes parámetros analíticos del método (sensibilidad, LOD, LOQ) respecto a los obtenidos utilizando CZL como sensor, los demás ensayos de validación requeridos no se evaluaron para el sistema CZL@HPβCD.

Los límites de detección determinados mediante esta nueva metodología son del mismo orden que los reportados en bibliografía para nanopartículas metálicas de características similares.^{14,79,80} Estas metodologías se basan, al igual que la que se presenta en este capítulo, en técnicas espectroscópicas como UV-visible y fluorescencia, en conjunto con la utilización de diferentes sensores para la cuantificación de los nanomateriales, como colorantes^{14,79} u otros nanomateriales como carbon dots.⁸⁰ La tabla 5.5. compara las prestaciones analíticas de los diferentes métodos mencionados.

Tabla 5.5. Comparación de los LOD de diferentes métodos para NP similares al descrito en este capítulo.

Tipo de NP	Diámetro / nm	Ligando	Método	LOD	Ref.
AuNP	22	citrato	Quenching de fluorescencia de rodamina 6G en SBF	4,5 pM	14
	26	citrato		3,6 pM	14
	20	citrato	Quenching de fluorescencia de carbon dots funcionalizados	0,2 nM	82
	13 - 35	citrato	Interacción con colorantes por UV-visible	0,2 nM	81
	18	citrato	Quenching de fluorescencia con CZL (esta tesis)	16,1 pM	-
AgNP	18	ácido gálico	Quenching de fluorescencia de rodamina 6G en SBF	15,6 pM	14
	12	SDDC ^a		4,9 pM	14
	16	ácido gálico	Quenching de fluorescencia con CZL (esta tesis)	10,1 pM	-
	10 - 20	citrato	Quenching de fluorescencia de carbon dots funcionalizados	5,17 nM	73
	52	citrato	Interacción con colorantes por UV-visible	19 pM	72
	11	citrato	Quenching de fluorescencia con CZL (esta tesis)	34,5 pM	-

^a SDDC: didecamidocistina de sodio (surfactante).

Existen actualmente otros métodos analíticos que presentan una disminución

significativa de los LOD de nanopartículas, llegando al orden de los fM.^{81,82} Sin embargo, estos menores límites vienen de la mano del empleo de técnicas que involucran la utilización de instrumentación más compleja y costosa, como ICP-MS,⁸³⁻⁸⁵ o que incluyen múltiples pasos experimentales y largos tiempos de preparación, como digestión de las muestras previa al análisis y preconcentración de las mismas.^{10,13,86}

El método analítico propuesto en esta tesis, además de permitir la detección de concentraciones de AuNP y AgNP en el orden pM, presenta la ventaja de ser simple, rápido y económico, sin requerir la utilización de gran cantidad de reactivos ni equipamiento complejo o de personal altamente capacitado para llevar a cabo el análisis.

5.4.5.3. Exactitud y repetibilidad

La exactitud y la repetibilidad (precisión intra-ensayo) del método se evaluaron a 3 niveles de concentración para cada tipo de nanopartícula, abarcando todo el rango dinámico lineal de las curvas de calibración individuales. Las soluciones a cada nivel de concentración se prepararon por sextuplicado, en las condiciones experimentales establecidas previamente. Los niveles de concentración analizados en esta etapa fueron diferentes a los utilizados durante la etapa de calibración, pero estuvieron dentro del intervalo lineal de la metodología analítica. Para determinar la exactitud del método se realizó una comparación de medias mediante una prueba t de Student entre los valores de concentración experimentales predichos por el modelo lineal de calibración y el valor conocido adicionado en las muestras, a un nivel de significancia igual a 0,05. La comparación se efectuó con la premisa de que las medias experimentales son iguales a los valores conocidos, es decir, que la hipótesis nula $H_0: \bar{x} = \mu$. La repetibilidad se evaluó realizando el análisis de todas las muestras por el mismo analista, bajo las mismas condiciones experimentales y en el mismo día, determinando para cada nivel de concentración y cada partícula el coeficiente de variación porcentual (CV %). La tabla 5.6. muestra los resultados obtenidos respecto a la exactitud y la precisión intra-ensayo del método analítico propuesto.

Tabla 5.6. Análisis de la exactitud y la repetibilidad del método.^a

Tipo NP	[NP] / pM ^b		p-valor ^c	CV %
	Nominal	Determinada		
AuNPg	3,00	3,1 (0,2)	0,135	6,4
	4,00	4,0 (0,2)	0,704	5
	5,00	5,03 (0,08)	0,412	1,6
AuNPc	50,0	52 (4)	0,275	7
	90,0	94 (6)	0,163	6
	140,0	137 (4)	0,126	3
AuNP _{heba}	15,0	16 (2)	0,258	12,4
	45,0	47 (4)	0,223	8,8
	75,0	75 (3)	0,975	3,5
AgNPg	25,0	26 (2)	0,317	7,7
	50,0	52 (3)	0,191	5,8
	80,0	82 (5)	0,363	6,1
AgNPc	120,0	11 (2) x 10	0,159	19,8
	250,0	24 (3) x 10	0,745	13,9
	400,0	41 (3) x 10	0,287	7
AgNR	10,0	11 (1)	0,192	10,3
	35,0	36 (2)	0,405	5,1
	65,0	65 (2)	0,706	3,2

^a [CZL]= 100 nM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas em y exc= 5 nm; 25,0 °C. SBF/CH₃OH (92:2 % v/v).

^b Entre paréntesis se indica la desviación estándar de sextuplicados de cada muestra.

^c Un p-valor de la prueba t-Student menor a 0,05 indica que la media experimental es significativamente diferente al valor nominal al 95 % de confianza.

Para todas las nanopartículas analizadas, y a todos los niveles de concentración, se obtuvieron resultados que indican que no existen diferencias significativas entre las concentraciones determinadas por el método analítico y las cantidades adicionadas, al 95 % de confianza (p-valor>0,05). Por lo tanto, es posible afirmar que el método propuesto es exacto en la determinación de la cantidad de NP presente en las muestras en las condiciones experimentales establecidas.

Por otro lado, los coeficientes de variación calculados resultaron en la mayoría de los casos menores a 10 %, indicando que el método también presenta una excelente

precisión en la determinación de la concentración de las nanopartículas metálicas estudiadas. Los mayores CV % observados corresponden a las muestras de menor concentración, cerca de los límites de cuantificación del método. En ningún caso estos CV % superaron el 20 %, por lo que se considera que la precisión del método es buena aun a bajas concentraciones de NP.

5.4.5.4. Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó en tres días diferentes, durante un período de tres semanas, a fin de determinar si existen diferencias significativas en las concentraciones calculadas mediante el método analítico a lo largo del tiempo. Las mediciones fueron realizadas por el mismo analista y bajo las mismas condiciones experimentales en los tres días, utilizando el mismo lote de cada NP estudiada para todos los experimentos y las curvas de calibración previamente informadas. Todas las muestras analizadas se prepararon por sextuplicado ($n=6$) y a los mismos niveles de concentración que los indicados en la sección anterior. Las medias experimentales calculadas en cada día, y para cada tipo de partícula y nivel de concentración, se compararon simultáneamente mediante una prueba ANOVA, al 95 % de confianza. La igualdad simultánea de las medias experimentales en los tres días diferentes se definió como $H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3$, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) se definió como la desigualdad de al menos una de las medias experimentales. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.7.

En todos los casos, los resultados indicaron que no existen diferencias significativas entre las concentraciones determinadas en diferentes días al 95 % de confianza ($p\text{-valor} > 0,05$), independientemente del tipo de partícula y del nivel de concentración. El método analítico presentó una excelente precisión intermedia, arrojando los mismos resultados independientemente del día en que se realice la determinación analítica. Del mismo modo, los resultado indican que no hay un efecto significativo del envejecimiento de las NP en el período de tiempo estudiado.

Tabla 5.7. Análisis de la precisión intermedia del método.^a

Tipo NP	[NP] / pM ^b			p-valor ^c
	Día 1	Día 2	Día 3	
AuNPg	3,1 (0,2)	3,1 (0,1)	3,2 (0,3)	0,276
	4,0 (0,2)	3,9 (0,2)	4,0 (0,1)	0,137
	5,03 (0,08)	5,0 (0,1)	4,9 (0,2)	0,355
AuNPc	52 (4)	51 (3)	50 (4)	0,236
	94 (6)	95 (6)	92 (5)	0,158
	137 (4)	138 (5)	141 (4)	0,079
AuNP _{heba}	16 (2)	15 (3)	16 (3)	0,669
	47 (4)	44 (4)	47 (2)	0,060
	75 (3)	72 (6)	74 (4)	0,640
AgNPg	26 (2)	25 (2)	25 (1)	0,536
	52 (3)	51 (2)	50 (1)	0,323
	82 (5)	88 (4)	86 (12)	0,459
AgNPc	106 (21)	10 (3) x 10	10 (2) x 10	0,934
	245 (34)	24 (3) x 10	26 (2) x 10	0,627
	414 (29)	38 (5) x 10	40 (4) x 10	0,32
AgNR	11 (1)	10,6 (0,8)	10,5 (0,6)	0,948
	36 (2)	35 (2)	35 (2)	0,917
	65 (2)	66 (2)	66 (1)	0,72

^a [CZL]= 100 nM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas em y exc= 5 nm; 25,0 °C. SBF/CH₃OH (92:2 % v/v).

^b Entre paréntesis se indica la desviación estándar de sextuplicados de cada muestra.

^c Un p-valor de la prueba ANOVA menor a 0,05 indica que al menos una media experimental es significativamente diferente al resto con un 95 % de confianza.

5.4.5.5. Selectividad

Una vez establecidas la exactitud y precisión del método, se evaluó la selectividad del mismo, analizando en que medida se ve afectada la determinación analítica de las nanopartículas por efecto de diferentes especies que pueden estar presentes en muestras reales. Estos potenciales interferentes se adicionaron a muestras conteniendo CZL (100 nM) en SBF/CH₃OH (92:2 % v/v), y una concentración determinada de cada NP, indicadas en la tabla 5.8.

La selectividad se estudió considerando la tolerancia máxima (T) que presenta el

método a la presencia de los interferentes, definida como la relación entre la concentración de interferente y de analito ($T = [\text{Interferente}]/[\text{NP}]$). Para todas las nanopartículas estudiadas, se estableció que existe *interferencia* significativa si ante el agregado del interferente se produce una variación de la señal analítica igual o mayor al 10 %, que corresponde aproximadamente al error estándar estimado de la concentración de NP.^{14,64} A fin de evaluar la selectividad, se prepararon soluciones de CZL y NP, se registraron los espectros de fluorescencia y, posteriormente, se adicionaron a cada solución cantidades crecientes de los diferentes interferentes estudiados, registrando los nuevos espectros ante cada agregado hasta observar una variación de la señal analítica igual o mayor al 10 %. En la tabla 5.8. se informan los interferentes examinados y las tolerancias del método analítico a cada uno de ellos, para cada tipo de partícula.

Tabla 5.8. Tolerancia a diferentes interferentes del sistema de detección CZL/NP.^a

Interferente	Tolerancia (T) ^b					
	AuNPc (100 pM)	AuNPg (5 pM)	AuNP _{heba} (50 pM)	AgNPc (187 pM)	AgNPg (47 pM)	AgNR (40 pM)
AuNPc	-	2	0,7	0,07	1,8	0,5
AuNPg	0,005	-	0,02	0,001	0,007	0,03
AgNPc	0,3	165	1,4	-	14	1,8
AgNPg	0,1	1,5	0,3	0,37	-	0,5
AgNO ₃	n.d.	n.d.	n.d.	6 x 10 ⁵	2 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶
HAuCl ₄	6 x 10 ⁵	1 x 10 ⁸	3 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.
NaCl	>2 x 10 ^{9 c}	>40 x 10 ^{9 c}	>4 x 10 ^{9 c}	>1 x 10 ^{9 c}	>4 x 10 ^{9 c}	>5 x 10 ^{9 c}

^a [CZL]= 100 nM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas em y exc= 5 nm; 25,0 °C. SBF/ CH₃OH (92:2 % v/v).

^b $T = [\text{Interferente}]/[\text{NP}]$

^c No se alcanzó el máximo nivel de tolerancia (10 %) a la máxima concentración ensayada de interferente.
n.d.: no determinado

Se puede observar que el método analítico propuesto presenta, en general, excelente tolerancia a sales inorgánicas para todos los tipos de partícula estudiados, con valores mayores a 10⁹ en el caso de NaCl y mayores a 10⁵ cuando se trata de las sales precursoras de AuNP o AgNP, según corresponda. Cuando la interferencia es producida por otro tipo de nanopartículas, se observa que las tolerancias son muy

bajas, incluso menores que 1 en algunos casos. Esto es debido a que la sonda fluorescente no es específica para un tipo concreto de NP y, en mayor o menor medida, interacciona con todas observándose *quenching* de fluorescencia. Esto implica que en la mayoría de los casos el método analítico propuesto sólo puede aplicarse en condiciones en las que el analito a detectar y cuantificar está aislado de otros tipos de nanopartícula, por lo que podría requerir procesos previos de separación. Sin embargo, hay algunos tipos de NP que tienen tolerancias significativamente altas, sobre todo en presencia de AgNPc, que es la partícula que presenta menor constante de quenching y, por lo tanto, afecta menos en la determinación analítica de otras NP con mayor sensibilidad, como AuNPg.

5.4.5.6. Ensayos de recuperación

En ausencia de materiales certificados de referencia para cada partícula, el método analítico propuesto para la detección y cuantificación de NP de oro y plata también se validó mediante ensayos de recuperación en matrices reales fortificadas,^{50,87} de agua de red de la Ciudad de Córdoba y agua del río Ctalamochita de la Ciudad de Río Tercero, Córdoba.

Trasladar la aplicación de un método analítico que fue diseñado en condiciones experimentales controladas a un sistema que involucra una matriz real, puede conducir a la obtención de resultados imprecisos durante la cuantificación de un determinado analito, como resultado del efecto matriz. El efecto matriz se define como el efecto combinado de todos los componentes presentes en la muestra que son diferentes al analito durante la medición de una cantidad.⁸⁸ Las desviaciones que pueden observarse como consecuencia del efecto matriz, pueden resultar positivas, cuando la concentración determinada es mayor a la real presente en la muestra, o bien negativas, cuando la concentración determinada es menor a la real. Minimizar o corregir el efecto matriz se puede lograr mediante el empleo del método de adiciones estándar (MOSA), que permite realizar la calibración en presencia de la matriz.⁵⁴

Los ensayos de recuperación se llevaron a cabo enriqueciendo soluciones de CZL

(100 nM) con diferentes niveles de concentración de NP metálicas. Las concentraciones de NP utilizadas estuvieron por encima de los LOD determinados previamente y dentro del intervalo lineal establecido para la metodología. Las soluciones enriquecidas fueron preparadas en presencia de agua de red o de río, que no se sometió a pre-tratamiento alguno. Para AgNPg y AgNPc, las muestras de agua se utilizaron a una concentración igual a 10 % v/v, mientras que para el resto de las NP fue igual a 5 % v/v. Debido a que la recuperación en nanopartículas de plata (AgNPg y AgNPc) inicialmente se evaluó a concentraciones elevadas de matriz real (10 % v/v), se observaron importantes efectos de matriz positivos (agua de red y de río pre-industrias químicas), y negativos (agua de río post-industrias). Como se mencionó anteriormente, minimizar estos efectos requirió aplicar el método de adiciones estándar y recalculando los parámetros de la calibración. El resto de las partículas se analizó en presencia de concentraciones de matriz iguales al 5 % v/v, no observándose efectos de matriz apreciables.

Los valores de recuperación aparente (R) se calcularon a partir del cociente entre la cantidad de analito determinada experimentalmente mediante la aplicación del método analítico y la cantidad conocida adicionada a las muestras durante el fortificado (R se informa como porcentaje). Las tablas 5.9. y 5.10. especifican los valores de R obtenidos para partículas de plata y oro, respectivamente, en presencia de agua de red y de río.

Tabla 5.9. Recuperaciones del método analítico propuesto para AgNP en matrices reales.^a

Tipo NP	Matriz real	[NP] adicionada / pM	[NP] determinada / pM	R (SEM) %
AgNPg	Agua de red ^{b, g}	43	47	109 (3)
		86	85	98 (6)
		125	126	101 (3)
	Agua de río pre-industria ^{c, g}	43	44	102 (8)
		83	88	102 (2)
		125	125	100 (5)
	Agua de río post-industria ^{d, g}	43	48	110 (7)
		83	85	10 (1) x 10
		125	127	102 (5)
AgNPc	Agua de red ^h	100	98	10 (1) x 10
		300	316	106 (6)
		500	482	96 (2)
	Agua de río pre-industria ^e	100	94	9 (1) x 10
		300	299	100 (5)
		500	527	105 (5)
	Agua de río post-industria ^f	100	n.d.	n.d.
		300	335	112 (9)
		500	499	100 (4)
AgNR	Agua de red ^h	10	10	96 (3)
		35	36	103 (3)
		65	70	108 (4)
	Agua de río pre-industria ^h	10	10	98 (6)
		35	36	103 (2)
		65	64	98 (2)

^a [CZL]= 100 nM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas em y exc= 5 nm; 25,0 °C. SBF/CH₃OH (92:2 % v/v).

^b SEN= (3,2±0,2) nM⁻¹. ^c SEN= (2,36±0,08) nM⁻¹. ^d SEN= (1,16±0,08) nM⁻¹. ^e SEN= (0,64±0,01) nM⁻¹. ^f SEN= (0,314±0,009) nM⁻¹.

^g En estos casos se agregó matriz en una proporción igual al 10 % v/v, lo que requirió recalcular las sensibilidades, como se indica a continuación:

^h En estos casos se adicionó matriz en una proporción igual al 5 % v/v.

(SEM): error estándar de la media.

n.d.: no determinado.

Tabla 5.10. Recuperaciones del método analítico propuesto para AuNP en matrices reales.^a

Tipo NP	Matriz real ^b	[NP] adicionada / pM	[NP] determinada / pM	R (SEM) %
AuNP _g	Agua de red	3,0	2,8	93 (6)
		4,0	3,87	97 (4)
		5,0	5,09	102 (2)
	Agua de río pre-industria	3,0	3,18	106 (5)
		4,0	4,19	105 (5)
		5,0	5,36	102 (3)
AuNP _c	Agua de red	60	61	102 (6)
		100	102	102 (6)
		140	138	99 (2)
	Agua de río pre-industria	60	58	10 (1) x 10
		100	97	97 (6)
		140	135	96 (6)
AuNP _{heba}	Agua de red	15	16	10 (1) x 10
		45	46	103 (6)
		75	74	98 (3)
	Agua de río pre-industria	15	14	9 (1) x 10
		45	43	95 (7)
		75	71	95 (4)

^a [CZL]= 100 nM; λ_{exc} = 290,0 nm; ancho de rendijas em y exc= 5 nm; 25,0 °C. SBF/CH₃OH (92:2 % v/v).

^b En todos los casos se agregó matriz en una proporción igual al 5 % v/v.

(SEM): error estándar de la media.

Las recuperaciones aparentes calculadas a diferentes niveles de fortificación y en las diferentes matrices analizadas se encontraron entre 93 % y 112 %, independientemente del tipo de NP analizada. Estos valores de recuperación en matrices reales son excelentes, y resultan similares a los obtenidos utilizando otras estrategias analíticas.^{14,79}

La exactitud de la metodología propuesta en matrices reales se analizó mediante un test de comparación de medias, tomando el promedio de las recuperaciones (\bar{R}) determinadas para cada tipo de partícula y en cada matriz real, y evaluando mediante el estadístico t-Student si los diferentes \bar{R} determinados son significativamente

diferentes a 100 %, a un nivel de significancia igual a 0,05. Los resultados de la comparación de medias se informan en la tabla 5.11.

Tabla 5.11. *Análisis de la exactitud del método en presencia de matrices reales.*

Tipo NP	Matriz real	R %	SEM_R%	p-valor^a
AuNPg	Agua de red	99	2	0,719
	Agua de río pre-industrias	102	2	0,397
AuNPc	Agua de red	103	3	0,328
	Agua de río pre-industrias	106	5	0,257
AuNP _{heba}	Agua de red	103	4	0,401
	Agua de río pre-industrias	95	3	0,136
AgNPg	Agua de red	98	3	0,471
	Agua de río pre-industrias	104	4	0,344
	Agua de río post-industrias	96	4	0,283
AgNPc	Agua de red	100	5	0,926
	Agua de río pre-industrias	98	5	0,746
	Agua de río post-industrias	105	4	0,284
AgNR	Agua de red	103	2	0,175
	Agua de río pre-industrias	98	2	0,340

^a Un p-valor de la prueba t menor a 0,05 indica que la media experimental es significativamente diferente a 100 %, con un 95 % de confianza.

SEM_R%: error estándar de la media de la recuperación porcentual.

Los resultados de la tabla 5.11. indican que para todos los casos estudiados, las recuperaciones promedio son iguales a 100 %, a un 95 % de confianza (p-valor>0,05). Por lo tanto, puede concluirse que el método analítico propuesto resulta exacto en la determinación de nanomateriales sintéticos de oro y plata analizados en las matrices reales evaluadas.

5.5. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se presentó el desarrollo de una metodología univariada para la detección de nanomateriales sintéticos de oro y plata en matrices ambientales. Inicialmente se demostró que la sonda fluorescente CZL interacciona con el receptor macrocíclico HP β CD, produciendo exaltación de la fluorescencia del fluoróforo, lo que podría significar una importante ventaja analítica en la detección de los analitos de interés. Se investigó la interacción entre NP y las sondas fluorescentes CZL y CZL@HP β CD, observándose en todos los casos *quenching* de la fluorescencia de las sondas, atribuido a la interacción superficial del fluoróforo con la NP. *Este quenching* de emisión de las sondas fluorescentes respondió linealmente al incremento de la concentración de AuNP y AgNP, con K_{SV} mayores para el caso de CZL en ausencia de macrociclo. A partir de la interacción del sistema híbrido NP/CZL se pudo desarrollar una metodología analítica sensible para la detección de estos analitos en muestras fortificadas con agua de río y de red domiciliaria, con excelentes recuperaciones. Los parámetros de validación (LOD, LOQ, exactitud, precisión) resultaron satisfactorios considerando la potencial aplicación de la metodología en análisis de rutina de muestras ambientales. El método propuesto es muy simple, rápido y económico, ya que no requiere gran cantidad de reactivos o instrumentación costosa y compleja.

5.6. Referencias

- (1) The Nanodatabase <https://nanodb.dk/> (accessed 2021-10-28).
- (2) Project of Emerging Nanotechnologies. Consumer Product Information <http://www.nanotechproject.tech/cpi/> (accessed 2021-10-28).
- (3) Weinberg, H.; Galyean, A.; Leopold, M. Evaluating Engineered Nanoparticles in Natural Waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.006>.
- (4) Kühnel, D.; Nickel, C. The OECD Expert Meeting on Ecotoxicology and Environmental Fate – Towards the Development of Improved OECD Guidelines for the Testing of Nanomaterials. *Sci. Total Environ.* **2014**, *472*, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.055>.
- (5) Wagner, S.; Gondikas, A.; Neubauer, E.; Hofmann, T.; von der Kammer, F. Spot

- the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment-Release, Behavior, and Fate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/anie.201405050>.
- (6) 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.* **2018**, *30* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>.
- (7) European Commission. Joint Research Centre. *NANoREG Framework for the Safety Assessment of Nanomaterials.*; Publications Office: LU, 2017.
- (8) Howard, A. G. On the Challenge of Quantifying Man-Made Nanoparticles in the Aquatic Environment. *J. Env. Monit* **2010**, *12* (1), 135–142. <https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- (9) Ke, L.; Yang, D.; Gao, G.; Wang, H.; Yu, Z.; Rao, P.; Zhou, J.; Wang, Q. Rapid Separation and Quantification of Self-Assembled Nanoparticles from a Liquid Food System by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Chem.* **2020**, *319*, 126579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126579>.
- (10) Wimmer, A.; Urstoeger, A.; Hinke, T.; Aust, M.; Altmann, P. J.; Schuster, M. Separating Dissolved Silver from Nanoparticulate Silver Is the Key: Improved Cloud-Point-Extraction Hyphenated to Single Particle ICP-MS for Comprehensive Analysis of Silver-Based Nanoparticles in Real Environmental Samples down to Single-Digit Nm Particle Sizes. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1150*, 238198. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.01.001>.
- (11) 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* **2017**, *1511*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.064>.
- (12) Laborda, F.; Bolea, E.; Cepriá, G.; Gómez, M. T.; Jiménez, M. S.; Pérez-Arantequi, 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* **2016**, *904*, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
- (13) Urstoeger, A.; Zacherl, L.; Muhr, M.; Selic, Y.; Wensch, M.; Klotz, M.; Schuster, M. Magnetic Solid Phase Extraction of Silver-Based Nanoparticles in Aqueous Samples: Influence of Particle Composition and Matrix Effects on Its Application to Environmental Samples and Species-Selective Elution and Determination of Silver Sulphide Nanoparticles with Sp-ICP-MS. *Talanta* **2021**, *225*, 122028. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122028>.
- (14) Torres, M. A. M.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. The Fluorescence Quenching of Rhodamine 6G as an Alternative Sensing Strategy for the Quantification of Silver and Gold Nanoparticles. *Microchem. J.* **2021**, *160*, 105645. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105645>.
- (15) Rahman, D. S.; Deb, S.; Ghosh, S. K. Relativity of Electron and Energy Transfer Contributions in Nanoparticle-Induced Fluorescence Quenching. *J. Phys. Chem.*

- C* **2015**, *119* (48), 27145–27155. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08466>.
- (16) Ghosh, S. K.; Pal, T. Photophysical Aspects of Molecular Probes near Nanostructured Gold Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (20), 3831. <https://doi.org/10.1039/b817373g>.
- (17) Ghosh, S. K.; Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4797–4862. <https://doi.org/10.1021/cr0680282>.
- (18) Tiwari, M.; Singh, A.; Dureja, S.; Basu, S.; Pattanayek, S. K. Au Nanoparticles Decorated ZnO/ZnFe₂O₄ Composite SERS-Active Substrate for Melamine Detection. *Talanta* **2022**, *236*, 122819. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122819>.
- (19) Çeliç, Y.; Kurt, A. Three Dimensional Porous Expanded Graphite/Silver Nanoparticles Nanocomposite Platform as a SERS Substrate. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *568*, 150946. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.150946>.
- (20) Garrity, O.; Rodriguez, A.; Mueller, N. S.; Frank, O.; Kusch, P. Probing the Local Dielectric Function of WS₂ on an Au Substrate by near Field Optical Microscopy Operating in the Visible Spectral Range. *Appl. Surf. Sci.* **2022**, *574*, 151672. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151672>.
- (21) Yadav, R.; Arata, H.; Umakoshi, T.; Verma, P. Plasmon Nanofocusing for the Suppression of Photodegradation in Fluorescence Imaging Using Near-Field Scanning Optical Microscopy. *Opt. Commun.* **2021**, *497*, 127206. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2021.127206>.
- (22) Yesudasu, V.; Pradhan, H. S.; Pandya, R. J. Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Based Sensors: A Comprehensive Review. *Heliyon* **2021**, *7* (3), e06321. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06321>.
- (23) Odacı, C.; Aydemir, U. The Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Sensors: A Theoretical Comparative Study with 2D TMDC Materials. *Results Opt.* **2021**, *3*, 100063. <https://doi.org/10.1016/j.rio.2021.100063>.
- (24) Ovchinnikov, O. V.; Smirnov, M. S.; Chevychelova, T. A.; Zvyagin, A. I.; Selyukov, A. S. Nonlinear Absorption Enhancement of Methylene Blue in the Presence of Au/SiO₂ Core/Shell Nanoparticles. *Dyes Pigments* **2022**, *197*, 109829. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109829>.
- (25) Fathima, R.; Mujeeb, A. Enhanced Nonlinear and Thermo Optical Properties of Laser Synthesized Surfactant-Free Au-Pt Bimetallic Nanoparticles. *J. Mol. Liq.* **2021**, *343*, 117711. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117711>.
- (26) Fathima, R.; Mujeeb, A. Plasmon Enhanced Linear and Nonlinear Optical Properties of Natural Curcumin Dye with Silver Nanoparticles. *Dyes Pigments* **2021**, *189*, 109256. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109256>.
- (27) Ghosh, S. K.; Pal, T. Photophysical Aspects of Molecular Probes near Nanostructured Gold Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (20), 3831. <https://doi.org/10.1039/b817373g>.
- (28) Karthikeyan, B. Fluorescence Quenching of Rhodamine-6G in Au Nanocomposite Polymers. *J. Appl. Phys.* **2010**, *108* (8), 084311. <https://doi.org/10.1063/1.3496668>.

- (29) Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and Quenching of Single-Molecule Fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96* (11), 113002. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.113002>.
- (30) Liang, Z.; Lou, J.; Scipioni, L.; Gratton, E.; Hinde, E. Quantifying Nuclear Wide Chromatin Compaction by Phasor Analysis of Histone Förster Resonance Energy Transfer (FRET) in Frequency Domain Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) Data. *Data Brief* **2020**, *30*, 105401. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105401>.
- (31) Soleja, N.; Mohsin, Mohd. Real Time Quantification of Intracellular Nickel Using Genetically Encoded FRET-Based Nanosensor. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 648–657. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.115>.
- (32) Tan, J.; Li, Z.; Yao, W.; Ji, Z.; Sun, Z.; You, J. Construction of Ultrasensitive Devices for Visualization and Quantification of Phosgene Based on FRET-Mediated Two-Photon Chemosensor. *Dyes Pigments* **2021**, *187*, 109138. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109138>.
- (33) Lehn, J.-M. Perspectives in Supramolecular Chemistry—From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29* (11), 1304–1319. <https://doi.org/10.1002/anie.199013041>.
- (34) Cram, D. J. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27* (8), 1009–1020. <https://doi.org/10.1002/anie.198810093>.
- (35) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; Chichester, England; Hoboken, NJ, 2007.
- (36) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743–1754. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.
- (37) Mura, P. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in Aqueous Solution: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>.
- (38) Malanga, M.; Szemán, J.; Fenyvesi, É.; Puskás, I.; Csabai, K.; Gyémánt, G.; Fenyvesi, F.; Szente, L. “Back to the Future”: A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (9), 2921–2931. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.034>.
- (39) Matías Ezequiel Carranza. Tesis Doctoral: Diseño, Síntesis y Caracterización de Nanocavidades Para La Construcción de Dispositivos Moleculares, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 2015.
- (40) Abro, H. A.; Zhou, T.; Han, W.; Xue, T.; Wang, T. Carbazole-Based Compounds Containing Aldehyde and Cyanoacetic Acid: Optical Properties and Applications in Photopolymerization. *RSC Adv.* **2017**, *7* (87), 55382–55388. <https://doi.org/10.1039/C7RA11887B>.
- (41) Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (3), 687–699. <https://doi.org/10.1021/jo0617971>.
- (42) Manzoori, J. L.; Abdolmohammad-Zadeh, H.; Amjadi, M. Study on the Inclusion Complex between β -Cyclodextrin and Celecoxib by Spectrofluorimetry and Its

- Analytical Application. *Il Farm.* **2005**, *60* (6–7), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2005.02.003>.
- (43) Zhang, Y.-J.; Cao, W.-X.; Xu, J. Interaction of Sulfonated Calix[n]Arenes with Rhodamine B and Its Application to Determine Acetylcholine in a Real Neutral Aqueous Medium. *Chin. J. Chem.* **2010**, *20* (4), 322–326. <https://doi.org/10.1002/cjoc.20020200406>.
- (44) Jin, T. Near-Infrared Fluorescence Detection of Acetylcholine in Aqueous Solution Using a Complex of Rhodamine 800 and p-Sulfonato-Calix[8]Arene. *Sensors* **2010**, *10* (3), 2438–2449. <https://doi.org/10.3390/s100302438>.
- (45) Ocak, Ü.; Ocak, M.; Bartsch, R. A. Calixarenes with Dansyl Groups as Potential Chemosensors. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *381*, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.10.041>.
- (46) Gustavo González, A.; Ángeles Herrador, M. A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26* (3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.
- (47) Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant, T. J. D. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*; 2009. <https://doi.org/10.1039/9781847559555>.
- (48) Linsinger, T. P. J.; Roebben, G.; Solans, C.; Ramsch, R. Reference Materials for Measuring the Size of Nanoparticles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30* (1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.005>.
- (49) 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.* **2016**, *84*, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.026>.
- (50) González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-Laboratory Testing of Method Accuracy from Recovery Assays. *Talanta* **1999**, *48* (3), 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00271-9).
- (51) 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* **2019**, *1059*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.009>.
- (52) Meier, P. C.; Zünd, R. E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, 2005.
- (53) Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A. Use of the Terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in Analytical Procedures: (IUPAC Recommendations 2002). <https://doi.org/10.1515/iupac.74.0103>.
- (54) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; Pearson Educación, 2002.
- (55) C.R.N. Strauts, J.H. Gilfillan, H.N. Wilson. *Analytical Chemistry - The Working Tools*; Oxford University Press: London; Vol. I.
- (56) Polte, J.; Tuae, 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* **2012**, *6* (7), 5791–5802. <https://doi.org/10.1021/nn301724z>.
- (57) Yoosaf, K.; Ipe, B. I.; Suresh, C. H.; Thomas, K. G. In Situ Synthesis of Metal Nanoparticles and Selective Naked-Eye Detection of Lead Ions from Aqueous Media. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (34), 12839–12847. <https://doi.org/10.1021/jp073923q>.
- (58) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (59) McGilvray, K. L.; Decan, M. R.; Wang, D.; Scaiano, J. C. Facile Photochemical Synthesis of Unprotected Aqueous Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 15980–15981. <https://doi.org/10.1021/jao66522h>.
- (60) Lazurko, C.; Ahumada, M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Alarcon, E. I. NANoPoLC Algorithm for Correcting Nanoparticle Concentration by Sample Polydispersity. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3166–3170. <https://doi.org/10.1039/C7NR08672E>.
- (61) 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. Chem.* **2015**, *299*, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.12.001>.
- (62) Leese, R. A.; Wehry, E. L. Corrections for Inner-Filter Effects in Fluorescence Quenching Measurements via Right-Angle and Front-Surface Illumination. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (8), 1193–1197. <https://doi.org/10.1021/ac50030a047>.
- (63) Ahumada, M.; Lissi, E.; Montagut, A. M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Pacioni, N. L.; Alarcon, E. I. Association Models for Binding of Molecules to Nanostructures. *The Analyst* **2017**, *142* (12), 2067–2089. <https://doi.org/10.1039/C7AN00288B>.
- (64) Valcárcel Cases, M.; López-Lorente, Á. I.; López-Jiménez, M. Á. Quantitative Analytical Processes. In *Foundations of Analytical Chemistry: A Teaching–Learning Approach*; Valcárcel Cases, M., López-Lorente, Á. I., López-Jiménez, M. Á., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 199–232. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62872-1_5.
- (65) Cookson, J. “The Preparation of Palladium Nanoparticles”. *Platin. Met. Rev.* **2012**, *56* (2), 83–98. <https://doi.org/10.1595/147106712X632415>.
- (66) Li, L.; Wu, Y.; Zhou, Q.; He, C. Experimental and Theoretical Studies on the One-Photon and Two-Photon Properties of a Series of Carbazole Derivatives Containing Styrene: PROPERTIES OF A SERIES OF CARBAZOLE DERIVATIVES CONTAINING STYRENE. *J. Phys. Org. Chem.* **2012**, *25* (5), 362–372. <https://doi.org/10.1002/poc.1923>.
- (67) Atwood, J. L. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry - Two-Volume Set (Print)*; CRC Press: Boca Raton, 2004. <https://doi.org/10.1201/9780429075728>.
- (68) Varshey, D. B.; Sander, J. R. G.; Friščić, T.; MacGillivray, L. R. Supramolecular Interactions. In *Supramolecular Chemistry*; Gale, P. A., Steed, J. W., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2012; p smc003.

- <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc003>.
- (69) Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (70) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (71) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Determination of Carbaryl and Carbofuran in Fruits and Tap Water by β -Cyclodextrin Enhanced Fluorimetric Method. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488* (2), 193–202. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00701-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00701-3).
- (72) *Silver Nanoparticle Applications*; Alarcon, E. I., Griffith, M., Udekwu, K. I., Eds.; Engineering Materials; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6>.
- (73) Amendola, V.; Meneghetti, M.; Stener, M.; Guo, Y.; Chen, S.; Crespo, P.; García, M. A.; Hernando, A.; Pengo, P.; Pasquato, L. Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier, 2014; Vol. 66, pp 81–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63285-2.00003-1>.
- (74) Bhattacharya, S.; Biswas, J. Role of Spacer Lengths of Gemini Surfactants in the Synthesis of Silver Nanorods in Micellar Media. *Nanoscale* **2011**, *3* (7), 2924. <https://doi.org/10.1039/c1nr10141b>.
- (75) Murphy, C. B.; Zhang, Y.; Troxler, T.; Ferry, V.; Martin, J. J.; Jones, W. E. Probing Förster and Dexter Energy-Transfer Mechanisms in Fluorescent Conjugated Polymer Chemosensors. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (5), 1537–1543. <https://doi.org/10.1021/jp0301406>.
- (76) 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.* **2005**, *127* (9), 3115–3119. <https://doi.org/10.1021/ja043940i>.
- (77) Breshike, C. J.; Riskowski, R. A.; Strouse, G. F. Leaving Förster Resonance Energy Transfer Behind: Nanometal Surface Energy Transfer Predicts the Size-Enhanced Energy Coupling between a Metal Nanoparticle and an Emitting Dipole. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (45), 23942–23949. <https://doi.org/10.1021/jp407259r>.
- (78) Nuñez, Rodrigo N., P., Natalia L. Informe de Beca CIN-EVC. “Estrategias Analíticas Basadas En Sistemas Supramoleculares Para La Detección y Cuantificación de Nanomateriales.” 2015.
- (79) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (80) 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* **2015**, *872*, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.052>.
- (81) 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 Spectrom* **2014**, 29 (3), 444–453. <https://doi.org/10.1039/C3JA50342A>.
- (82) 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.* **2010**, 132 (35), 12176–12178. <https://doi.org/10.1021/ja104052c>.
- (83) Borovinskaya, O.; Gschwind, S.; Hattendorf, B.; Tanner, M.; Günther, D. Simultaneous Mass Quantification of Nanoparticles of Different Composition in a Mixture by Microdroplet Generator-ICPTOFMS. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (16), 8142–8148. <https://doi.org/10.1021/ac501150c>.
- (84) Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J.; Laborda, F.; Abad-Álvarez, I.; Bladé, C.; Arola, L.; Castillo, J. R. Detection and Characterization of Silver Nanoparticles and Dissolved Species of Silver in Culture Medium and Cells by AsFIFFF-UV-Vis-ICPMS: Application to Nanotoxicity Tests. *The Analyst* **2014**, 139 (5), 914–922. <https://doi.org/10.1039/C3AN01443F>.
- (85) Taboada-López, M. V.; Bartczak, D.; Cuello-Núñez, S.; Goenaga-Infante, H.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñero, A. AF4-UV-ICP-MS for Detection and Quantification of Silver Nanoparticles in Seafood after Enzymatic Hydrolysis. *Talanta* **2021**, 232, 122504. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122504>.
- (86) Liu, J.; Chao, J.; Liu, R.; Tan, Z.; Yin, Y.; Wu, Y.; Jiang, G. Cloud Point Extraction as an Advantageous Preconcentration Approach for Analysis of Trace Silver Nanoparticles in Environmental Waters. *Anal. Chem.* **2009**, 81 (15), 6496–6502. <https://doi.org/10.1021/ac900918e>.
- (87) Zänker, H.; Schierz, A. Engineered Nanoparticles and Their Identification Among Natural Nanoparticles. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, 5 (1), 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143130>.
- (88) Booksh, K. S.; Kowalski, B. R. Theory of Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **1994**, 66 (15), 782A-791A. <https://doi.org/10.1021/ac00087a001>.

6

Método multivariado para la cuantificación simultánea de nanomateriales de oro y plata

6.1. Introducción

El tratamiento de muestras ambientales que contienen NP sintéticas requiere considerar la existencia de diferentes tipos de nanomateriales con características variadas (material de las NP, material orgánico ligado a la superficie, tamaños y formas).¹ Las muestras ambientales poseen concentraciones considerables de ciertos elementos y de otras partículas coloidales que complican aún más la detección diferenciada de los NM sintéticos. La evaluación de los efectos de la actividad humana sobre el ambiente como consecuencia de la producción acelerada de artículos comerciales que contienen NP sintéticas, requiere que se pueda distinguir entre aquellas NP sintetizadas a nivel industrial y las NP naturales en cada etapa de su ciclo de vida.^{2,3} Por este motivo, resulta necesario que los métodos analíticos desarrollados permitan la diferenciación y la detección de NP en matrices complejas. Como se ha indicado en capítulos anteriores, si bien actualmente existen numerosos métodos que permiten la cuantificación de NM sintéticos, la mayoría de ellos requieren pretratamientos de las muestras y procesos de separación que consumen tiempo y recursos económicos.⁴⁻⁸ Ante estas metodologías costosas y de gran complejidad, la espectroscopia de fluorescencia asociada al análisis multivariado resulta una excelente alternativa, de mayor rapidez y simpleza, y mucho más económica. La aplicación de la

espectroscopia de fluorescencia como método de análisis de nanomateriales sintéticos fue discutida con más profundidad en el capítulo 5 de esta tesis. La principal desventaja que esta metodología presentó fue su selectividad, que resultó de baja a moderada, dependiendo del tipo de partícula analizada. Para contrarrestar esta situación, una estrategia que puede resultar adecuada es el tratamiento de los datos analíticos cualitativos y cuantitativos mediante procedimientos de calibración multivariados. Los métodos de calibración multivariados permiten, además de analizar correctamente múltiples analitos simultáneamente en presencia de interferentes, reducir la relación señal-ruido y proveer una ganancia en sensibilidad al utilizar más medidas o datos de un mismo fenómeno. Adicionalmente, estas metodologías ofrecen información que permite a los analistas investigar la validez de los modelos planteados o identificar automáticamente *outliers* (ventaja de primer orden), o incluso dan la posibilidad de modelar la contribución a la señal global de componentes inesperados que no estaban presentes durante la calibración, cuantificando con exactitud los analitos calibrados (ventaja de segundo orden).^{9,10}

Existe una gran variedad de modelos multivariados dependiendo del orden de los datos (primer orden, segundo orden, etc.) y de las características particulares de los datos analíticos. Dentro de los métodos que permiten alcanzar la ventaja de segundo orden (a partir de matrices de excitación-emisión de fluorescencia, por ejemplo),¹¹ se pueden mencionar por un lado los modelos trilineales, como PARAFAC (PARAllel FACtor analysis),¹² descomposición trilineal alternante autoponderada (SWATLD)¹³ o descomposición trilineal alternante penalizada (APTLD);¹⁴ y por otro lado los modelos con arreglos de tres vías con datos no trilineales, como resolución de curvas multivariadas con cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS),¹⁵ PARAFAC2,¹⁶ y modelos mucho más flexibles como el de cuadrados mínimos parciales desdoblados y multivía (U-PLS y N-PLS),¹⁷ o el de aniquilación de rango no bilineal (NBRA).¹⁸

El sistema bajo estudio que desarrollaremos a lo largo del capítulo presenta características que producen la ruptura de la trilinearidad (efecto de filtro interno ocasionado por absorción de luz por parte de NP metálicas). Por este motivo, se planteó la utilización de un modelo de cuadrados mínimos parciales desdoblados

acoplado a bilinearización residual (U-PLS/RBL) que permite alcanzar la ventaja de segundo orden, para obtener una solución analítica a la determinación de las mezclas de AuNP y AgNP.

6.1.1. Teoría de U-PLS/RBL

El modelo U-PLS es una variante del método de cuadrados mínimos parciales clásico (PLS) que se propuso para datos de segundo orden, donde los datos de tres vías se desdoblán en vectores antes del paso de calibración de PLS de dos vías.¹⁷ Así, U-PLS opera fundamentalmente en dos pasos.¹⁹ En una primera instancia, se introduce información acerca de la concentración en el paso de calibración (que se realiza sin incluir muestras desconocidas) con el objetivo de obtener dos tipos de variables latentes: por un lado, los *loadings* contenidos en una matriz \mathbf{P} y, por otro, los *loadings de peso* contenidos en una matriz \mathbf{W} . Las matrices anteriores son estimadas a partir de I matrices de calibración $\mathbf{X}_{c,i}$, y de las concentraciones de calibración \mathbf{y} . La dimensión de $\mathbf{X}_{c,i}$ es $J \times K$, donde J y K corresponden al número de canales en cada uno de los modos de los datos, mientras que la dimensión de \mathbf{y} es igual a $N_c \times 1$, con N_c igual al número de muestras de calibración. Las matrices $\mathbf{X}_{c,i}$ son inicialmente desdobladas y agrupadas en una nueva matriz \mathbf{Z}_x de dimensiones $JK \times 1$, de acuerdo a la ecuación 6.1., donde vec denota la operación de desdoblado (vectorizado) de la matriz.

$$\mathbf{Z}_x = [\text{vec}(\mathbf{x}_{c,1}) | \text{vec}(\mathbf{x}_{c,2}) | \dots | \text{vec}(\mathbf{x}_{c,I})] \quad \text{Ec. 6.1.}$$

A partir de esta matriz desdoblada se puede construir un modelo PLS que arroja un conjunto de *loadings* \mathbf{P} y de *loadings de peso* \mathbf{W} (ambos de dimensiones $JK \times A$) y coeficientes de regresión \mathbf{v} (de dimensión $A \times 1$), donde A es el número de variables latentes obtenido por un método de validación cruzada *leave-one-out*.²⁰ Si no existieran componentes inesperados en las muestras desconocidas, la concentración de los analitos se podría calcular a partir de la ecuación 6.2., con \mathbf{t}_u igual al *score* de la muestra de prueba, obtenido por proyección de los datos desdoblados, $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$ en el espacio de las A variables latentes. La expresión de \mathbf{t}_u se presenta en la ecuación 6.3.

$$y_u = t_u^T v \quad \text{Ec. 6.2.}$$

$$t_u = (W^T P)^{-1} W^T \text{vec}(X_u) \quad \text{Ec. 6.3.}$$

Cuando componentes inesperados (no calibrados) se encuentran presentes en la muestra desconocida, los *scores* de la muestra no son adecuados para la predicción de la concentración del analito a través de la Ec. 6.2., porque los residuales del paso de predicción de U-PLS (s_p , ecuación 6.4.) serán inusualmente más grandes que el nivel de ruido instrumental.

$$s_p = \frac{\|e_p\|}{(JK - A)^{1/2}} = \|\text{vec}(X_u) - P t_u\| / (JK - A)^{1/2} \quad \text{Ec. 6.4.}$$

En estos casos, el modelo U-PLS debe acoplarse a una metodología denominada bilinearización residual (RBL) basada en el uso de análisis de componentes principales (PCA), que permite completar el procedimiento post-calibración y modelar la presencia de un potencial interferente, alcanzando la ventaja de segundo orden.^{19,21} El objetivo de RBL es minimizar la norma del vector residual e_u , obtenido mientras se ajustan los datos de la muestra desconocida a la suma de las contribuciones relevantes. Esta minimización permite estimar los perfiles del interferentes b_{unx} y c_{unx} (ecuación 6.5.) a partir de la matriz X_u desdoblada que posee componente inesperados.

$$\text{vec}(X_u) = P t_u + [b_{unx} g_{unx} (C_{unx})^T] + e_u \quad \text{Ec. 6.5.}$$

En la ecuación anterior, g_{unx} es un factor de escalado, mientras que b_{unx} y c_{unx} son, respectivamente, el eigenvector de izquierda y el eigenvalor de derecha de una matriz de residuales E_p , que se obtiene reformulando el vector residual computado e_p (de dimensión $JK \times 1$) a una matriz de dimensión $J \times K$, y asumiendo que las interferencias están ausentes (ecuación 6.6.).

$$\mathbf{b}_{\text{unx}} \mathbf{g}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T = \text{SVD} \{ \text{reshape} [\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u] \} \quad \text{Ec. 6.6.}$$

Durante el procedimiento de RBL, la matriz de los *loadings* \mathbf{P} se mantiene constante a los valores de la calibración, mientras se varían los *scores* \mathbf{t}_u hasta que \mathbf{e}_u es minimizada, y los perfiles de los interferentes son estimados mediante descomposición en valores singulares (SVD) de la matriz \mathbf{E}_p . Una vez que \mathbf{e}_u es minimizada, la concentración de los analitos pueden calcularse a partir de la ecuación 6.2., al introducir el último valor de \mathbf{t}_u obtenido mediante RBL.

6.1.1.1. Sensibilidad y otras figuras de mérito en U-PLS/RBL

La sensibilidad en calibración multivariada se puede definir como la pendiente de una calibración pseudo-univariada basada en la llamada señal neta del analito (NAS), que es la porción de la señal total que se asocia únicamente al analito de interés.²²

Si la calibración en U-PLS/RBL es precisa, resulta obvio desde la ecuación 6.2. que la varianza de la concentración está dada por la ecuación 6.7., donde \mathbf{V}_t es la matriz de varianza-covarianza de los elementos del vector \mathbf{t}_u .

$$\text{var}(\mathbf{y}) = \mathbf{v}^T \mathbf{V}_t \mathbf{v} \quad \text{Ec. 6.7.}$$

Utilizando un enfoque basado en matrices Jacobianas, la varianza de la concentración puede expresarse en función de la incertidumbre instrumental $\text{var}(x)$, de los parámetros de calibración y de los perfiles de los interferentes, de acuerdo a la ecuación 6.8.

$$\text{var}(\mathbf{y}) = \text{var}(x) \mathbf{v}^T [\mathbf{P}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}} \mathbf{Z}_{\text{unx}}^+) \mathbf{P}]^{-1} \mathbf{v} \quad \text{Ec. 6.8.}$$

En la ecuación 6.8., \mathbf{I} es la matriz unidad de dimensión $JK \times JK$, y \mathbf{Z}_{unx} contiene información respecto de los interferentes de acuerdo a la ecuación 6.9., donde \mathbf{I}_c e \mathbf{I}_b son matrices unidad de dimensiones $J \times J$ y $K \times K$, respectivamente, y \otimes es el operador producto de Kronecker.

$$\mathbf{Z}_{\text{unx}} = [\mathbf{I}_c \otimes \mathbf{b}_{\text{unx}} \mid \mathbf{c}_{\text{unx}} \otimes \mathbf{I}_b] \quad \text{Ec. 6.9.}$$

Desde la ecuación 6.8., la sensibilidad puede expresarse como el cociente entre la incertidumbre en la señal y en la concentración (ecuación 6.10.).

$$SEN = [\text{var}(x)/\text{var}(y)]^{1/2} = \left\{ \mathbf{v}^T [\mathbf{P}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{\text{unx}} \mathbf{Z}_{\text{unx}}^+) \mathbf{P}]^{-1} \mathbf{v} \right\}^{1/2} \quad \text{Ec. 6.10.}$$

De forma análoga a las metodologías univariadas, se pueden definir otras figuras de mérito importantes, como la sensibilidad analítica γ , y los LOD y LOQ. Estos parámetros se definen a continuación, donde $SD(y_0)$ es igual a la desviación estándar en concentración de los blancos.

$$\gamma = SEN / [\text{var}(x)]^{1/2} \quad \text{Ec. 6.11.}$$

$$LOD = 3,3 SD(y_0) \quad \text{Ec. 6.12.}$$

$$LOQ = 10 SD(y_0) \quad \text{Ec. 6.13.}$$

Si bien la calibración multivariada posee un enorme potencial, existe una escasez de artículos bibliográficos referidos a la detección de nanomateriales sintéticos mediante este tipo de enfoques. Considerando que las cifras de mérito usualmente experimentan una mejora a medida que se aumenta el orden de los datos, se espera que en los próximos años exista un mayor desarrollo de metodologías de este estilo en la determinación analítica de NM sintéticos, con LOD más bajos que sus contrapartes univariadas. A lo largo de este capítulo se presentará una nueva metodología analítica para la cuantificación de mezclas de AuNP y AgNP en muestras de agua de río y de red domiciliaria sin necesidad de efectuar procesos de separación previos, mediante la aplicación de un modelo multivariado U-PLS/RBL a datos de fluorescencia total (matrices de excitación-emisión) de una mezcla de NP y un conjunto de sensores fluorescentes.

6.2. Objetivos específicos

- Evaluar la utilización de un algoritmo de calibración multivariada de segundo orden (U-PLS) para la detección y cuantificación simultánea de AuNP y AgNP en agua de río y de red domiciliaria.
- Determinar los parámetros analíticos del método propuesto: sensibilidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y exactitud/recuperación.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin ningún paso de purificación previo o pretratamiento. La síntesis de AuNP (citrato) y AgNP (gálico) se llevó a cabo a partir de los reactivos y procedimientos descritos en capítulos anteriores. Las sondas fluorescentes empleadas fueron rodamina 6G (R6G) 99 % pureza (Aldrich) y un carbazol modificado, [p-(9H-Carbazol-9-il)fenil](p-mercaptofenilamino) formaldehído (CZL-SH) (Figura 6.1.) sintetizado y cedido por el Lic. Ignacio Lemir, del grupo de Fotoquímica Orgánica: Catálisis metálica y biocatálisis, del Departamento de Química Orgánica, FCQ, UNC.

Las muestras de calibración y de validación se prepararon utilizando como solvente solución de buffer fosfato (SBF) 0,05 M de pH 7,0 al 90 % v/v. La SBF se preparó según lo indicado en el capítulo 5. Todas las soluciones se prepararon con agua de calidad MilliQ.

6.3.2. Instrumentación y software

Las matrices de emisión-excitación se registraron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent) con un peltier de control de temperatura programado a 25,0 ° C. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorescencia de 1,0 cm de paso óptico.

Las determinación del pH de las soluciones buffer preparadas se realizó con el

mismo pHmetro indicado en el capítulo 5, y con el mismo conjunto de soluciones buffer estándar.

El análisis de datos y análisis gráfico se realizó usando el software OriginPro 8 (OriginLab Corporation). El análisis de datos de segundo orden y la calibración multivariada se llevó a cabo mediante el software Multivariate Calibration 2 (MVC2),²³ programado en MATLAB (The Mathworks, Inc. Natick, MA, USA).

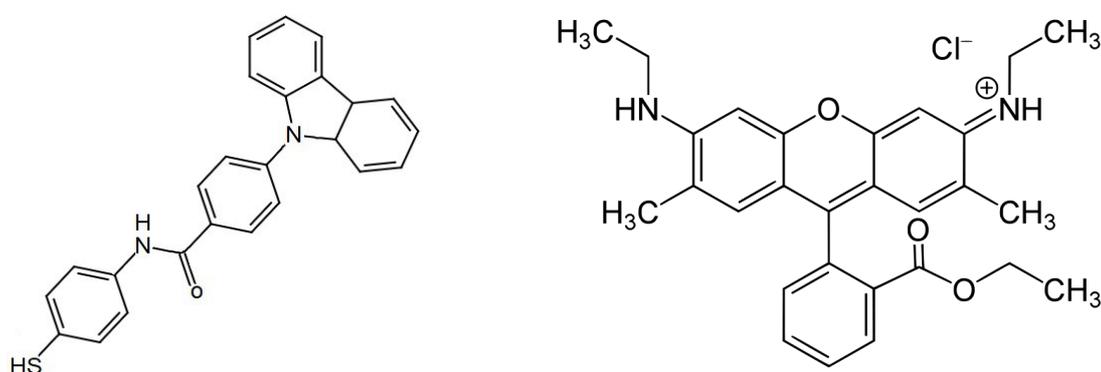


Figura 6.1. Estructura química de los compuestos empleados como sondas fluorescentes. Izquierda: CZL-SH. Derecha: R6G.

6.3.3. Síntesis de las nanopartículas de plata y oro empleadas

La preparación de AgNP de (16±5) nm y AuNP de (18±5) se realizó de acuerdo a los procesos sintéticos informados en el capítulo 5 de la presente tesis, en las secciones 5.3.5.1 y 5.3.5.4., respectivamente. Las concentraciones de las NP obtenidas se estimaron mediante el algoritmo NANoPoLC.²⁴

6.3.4. Caracterización espectroscópica de CZL-SH y R6G

Las sondas fluorescentes se caracterizaron mediante espectroscopia UV-visible y de fluorescencia a fin de determinar los máximos de absorción y las bandas de emisión de cada compuesto. A tal fin se prepararon soluciones madre de R6G y de CZL-SH de concentración 142 μM y 430 μM, respectivamente, a partir de los compuestos sólidos. La solución de R6G fue preparada en agua de calidad MQ, mientras que para CZL-SH se utilizó metanol como solvente. Las soluciones se

almacenaron a 4 °C, protegidas de la luz hasta su uso.

Los espectros UV-visible de ambos compuestos se registraron en el rango de longitudes de onda entre 200 nm y 600 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a 25,0 °C en SBF como solvente. Los espectros de emisión de R6G y CZL-SH se obtuvieron excitando a 290,0 nm soluciones de cada compuesto a niveles de concentración adecuados. Los anchos de rendija fueron fijados en 10 nm, y la detección se realizó con una ganancia de 650 V, para ambas sondas fluorescentes. Los espectros de emisión se registraron entre 310 nm y 800 nm en el caso de CZL-SH, y entre 500 nm y 800 nm para R6G. En todos los casos, las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a 25,0 °C y en SBF de pH 7,0 al 90 % v/v como solvente.

Luego de la caracterización espectroscópica individual de los sensores, se registraron matrices de emisión-excitación (EEM) de mezclas de ambos componentes a diferentes niveles de concentración y a diferentes condiciones instrumentales, a fin de evaluar las condiciones óptimas para llevar a cabo la calibración multivariada de los analitos. Considerando que la interacción de los sensores con las NP metálicas da lugar a *quenching* de fluorescencia,²⁵ se estableció como óptimo que las intensidades de fluorescencia de las bandas de emisión de la mezcla de componentes sea elevada (> 500 u.a.) en toda el área de emisión-excitación, pero sin llegar a saturar el detector, que ocurre a 1000 u.a. en el instrumento utilizado. Las condiciones experimentales evaluadas se encuentran resumidas en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Condiciones experimentales evaluadas para establecer las condiciones óptimas de las matrices de em-exc para la calibración multivariada.

[CZL-SH] / μM	[R6G] / nM	Rendija exc / nm	Rendija em / nm	Voltaje detector / V	Δ λ _{exc} / nm
10 – 50	40 – 200	5 – 10	5 – 10	500 - 800	2 – 10

Las matrices de emisión y excitación fueron registradas en el rango de emisión entre 410 nm y 550 nm, con un rango de excitación entre 290 nm y 400 nm.

6.3.5. Diseño y preparación del conjunto de muestras de calibración y de validación

El análisis de tres vías se llevó a cabo con un conjunto de calibración de 16 muestras, analizadas por duplicado. Del conjunto total de calibración, los niveles de trece muestras fueron definidos de acuerdo a un diseño central compuesto (CCD) con cuatro puntos centrales,²⁶ con rangos de concentración entre 0,15 pM y 1,8 pM para el caso de AuNP, y entre 5,4 nM y 66,2 nM para AgNP. Estos rangos de concentración fueron establecidos para evitar la extinción total de la emisión fluorescente de los sensores empleados, y fueron diferentes para cada NP porque cada partícula tiene un K_{sv} particular para un mismo fluoróforo, como se mostró en el capítulo 5 con CZL. El CCD es un tipo de diseño experimental factorial de dos niveles ampliado, que incorpora puntos centrales y puntos axiales (o *puntos estrella*) para el análisis de la curvatura de alguna respuesta en particular.²⁶ Este tipo de diseños se utiliza usualmente para construir modelos cuadráticos para la respuesta analizada, sin necesidad de recurrir a un diseño factorial completo de tres niveles.²⁶ En este caso en particular, se valió únicamente del CCD para obtener un conjunto de muestras definido y representativo del sistema, y así evitar una selección arbitraria de dichas muestras para la calibración. La distribución de las muestras en el espacio de diseño puede apreciarse con más claridad en la figura 6.2. En dicha figura, cada punto representa una muestra del conjunto de calibración.

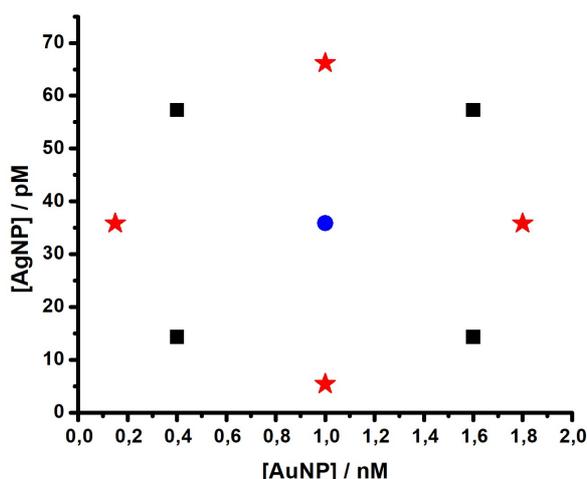


Figura 6.2. Muestras de calibración de mezclas de AuNP y AgNP obtenidas a partir de un diseño central compuesto. Puntos derivados del diseño factorial (■), puntos axiales o “estrella” (★) y punto central (●).

Los niveles de concentración de AuNP y AgNP fueron seleccionados para evitar saturación del sistema de detección o bien extinción total de la emisión de las sondas fluorescentes, teniendo en cuenta los puntos axiales extremos máximos (1,8 nM de AuNP y 66,2 pM de AgNP). Adicionalmente, en el conjunto de calibración se incluyó un blanco de ambos analitos (muestra 14) y dos muestras adicionales con únicamente un analito presente a su concentración intermedia, las muestras 15 y 16 (Tabla 6.2.). Por otro lado, se prepararon 8 muestras de test para evaluar el modelo de la calibración (Tabla 6.2.), por duplicado. Los niveles de concentración en las muestras de test fueron aleatorios y diferentes a aquellos utilizados en el conjunto de calibración, pero dentro del intervalo de concentraciones de éste. Las concentraciones en las muestras de test estuvieron entre 0,2 nM y 1,5 nM para AuNP, y entre 7,0 pM y 54,0 pM para AgNP.

Tabla 6.2. Conjunto de muestras de calibración y de test del análisis de tres vías.

Calibración			Test		
Muestra	AuNP / nM	AgNP / pM	Muestra	AuNP / nM	AgNP / pM
1	1,6	14,3	T1	0,2	20,1
2	0,4	57,3	T2	0,6	20,1
3	1,0	35,8	T3	0,6	37,3
4	0,4	14,3	T4	1,0	54,5
5	1,0	35,8	T5	1,5	37,3
6	1,6	57,3	T6	0,2	54,5
7	0,15	35,8	T7	1,5	7,2
8	1,8	35,8	T8	1,0	7,2
9	1,0	5,4			
10	1,0	35,8			
11	1,0	66,2			
12	1,0	35,8			
13	1,0	35,8			
14	0	0			
15	1,0	0			
16	0	35,8			

Tanto las muestras de calibración como las de test, se prepararon adicionando las cantidades correspondientes de AuNP y AgNP en matraces de 5,0 mL que ya contenían los sensores fluorescentes, a fin de evitar efectos de agregación significativos de las NP. Las concentraciones de CZL-SH y R6G en todas las muestras fue constante, e iguales a 14,0 μM y 50,0 nM, respectivamente. Estos niveles de concentración fueron establecidos para obtener la máxima respuesta espectral posible sin alcanzar la saturación del detector de fluorescencia. Todas las soluciones se prepararon en SBF de pH 7,0 al 90 % v/v. A las muestras de test también se les adicionó agua de río y de red en una concentración igual al 5 % v/v para evaluar la predicción del modelo en presencia de componentes inesperados. El agua de río y de red fue recolectada y almacenada de acuerdo a lo indicado en el capítulo 5 de esta tesis.

6.3.6. Datos de segundo orden y calibración multivariada

Los datos espectrales de segundo orden se obtuvieron mediante el registro de matrices de emisión-excitación (EEM) de cada una de las muestras de calibración y de test. Las dimensiones de cada matriz de datos fue la siguiente: 141 puntos en el modo emisión (λ_{em} entre 410 nm y 550 nm) y 23 puntos en el modo excitación (λ_{exc} entre 290 nm y 400 nm, con registros cada 5 nm). Para el registro de cada EEM, la ganancia del detector se ajustó en 800 V y los anchos de rendija en 5 nm (emisión) y 10 nm (excitación). Todos los experimentos se realizaron a temperatura controlada, igual a 25,0 °C.

Debido a que las NP empleadas absorben luz en la región analizada y que, en general, producen *quenching* de la fluorescencia de los sensores, los datos espectrales no resultan trilineales. Por tal motivo, las EEM fueron analizadas mediante el algoritmo de segundo orden U-PLS,²⁷ que ya fue discutido previamente.

La aparición de señales de emisión de fluorescencia dependientes de la concentración de AgNP,²⁸ permitió utilizar directamente las EEM, sin ningún tipo de procesamiento previo de los datos, para realizar la calibración y cuantificación de este analito. Para el análisis de AuNPc, se valió del efecto de *quenching* de fluorescencia

que producen las NP sobre los sensores utilizados (CZL-SH y R6G), de forma análoga al método propuesto en el capítulo 5 de esta tesis. Las EEM determinadas para las muestras de calibración y de test se transformaron matemáticamente para obtener una “matriz de *quenching*” (QM). Esta nueva matriz de datos de segundo orden se construyó aplicando la relación de Stern-Volmer a las intensidades de cada sensor individual de las EEM. Esto significó calcular el cociente entre las intensidades de cada sensor de la EEM obtenida en ausencia de nanopartículas (muestra de calibración 14) y las intensidades que toman los sensores correspondientes en el resto de las EEM de las muestras de calibración y de test. Como en la región espectral en la cual aparecen las señales de AgNP las intensidades no responden a la ecuación de Stern-Volmer, se limitó el número de sensores para el análisis de AuNPc a partir de las QM. Las dimensiones en este último caso fueron 141 puntos en el modo emisión (λ_{em} entre 410 nm y 550 nm) y 15 puntos en el modo excitación (λ_{exc} entre 295 nm y 365 nm, con registros cada 5 nm).

A partir de la calibración, se determinaron las cifras analíticas de mérito del método, incluyendo el LOD, LOQ, sensibilidad, así también como la exactitud y las recuperaciones en las muestras que contenían agua de red y de río.

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Caracterización espectroscópica de R6G y CZL-SH

A fin de determinar los máximos de absorción de las sensores fluorescentes empleados, se registraron los espectros UV-visible de los mismos, que se muestran en la figura 6.3.

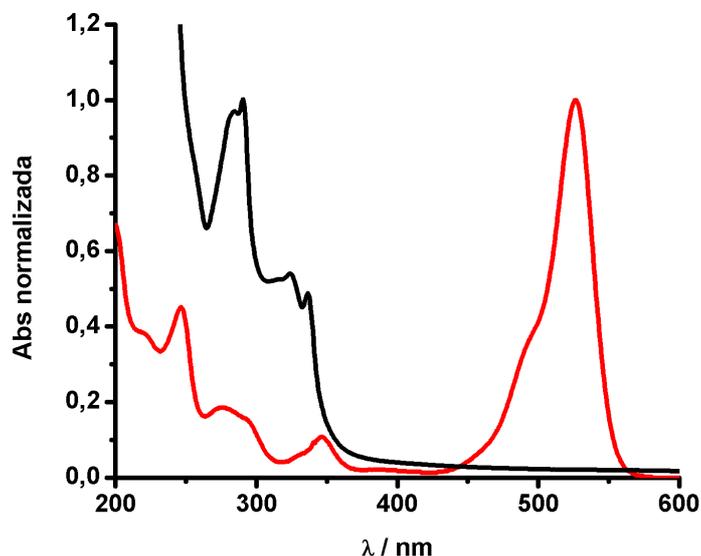


Figura 6.3. Espectros UV-visible de R6G (—) y CZL-SH (—) en SBF pH 7,0 al 90 % v/v y a 25,0 °C.

Se observa que R6G presenta un máximo de absorción a 526,5 nm, con un ligero hombro a 494,0 nm. Estas bandas de absorción están asociadas a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ desde el estado basal al primer estado excitado. La presencia del hombro a 494,0 nm indica la presencia del dímero, mientras que el máximo principal corresponde a la absorción del monómero.²⁹ El espectro de R6G también muestra varias señales en la región ultravioleta del espectro, correspondientes a transiciones $S_0 \rightarrow S_2$.³⁰ CZL-SH presenta múltiples máximos de absorción, siendo los más significativos aquellos a 234,0 nm; 292,0 nm; 324,0 nm y 336,5 nm. El espectro de este compuesto presenta señales análogas a aquellas observadas para el carbazol, discutidas en el capítulo anterior, que pueden asignarse a transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, características de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.^{31,32}

La fluorescencia de los sensores se evaluó excitando las muestras a 290,0 nm y registrando los correspondientes espectros de emisión entre 300 nm y 800 nm (Figura 6.4.). El espectro de R6G muestra una única banda de emisión con un máximo local a 551,0 nm. Esta banda se asemeja a la imagen especular de la banda de absorción a 526,5 nm discutida anteriormente que corresponde a la transición $S_0 \rightarrow$

S_1 , por lo que la rodamina cumple con la Regla de Kasha. El corrimiento de Stokes observado para R6G es igual a $844,5 \text{ cm}^{-1}$. CZL-SH presenta dos bandas de emisión solapadas con máximos a $477,0 \text{ nm}$ y $545,0 \text{ nm}$. El pico observado a $580,0 \text{ nm}$ no es característico del compuesto analizado y sólo corresponde a la primera resonancia de la λ de excitación. Para esta sonda, los corrimientos de Stokes determinados fueron grandes, mayores a 8750 cm^{-1} .

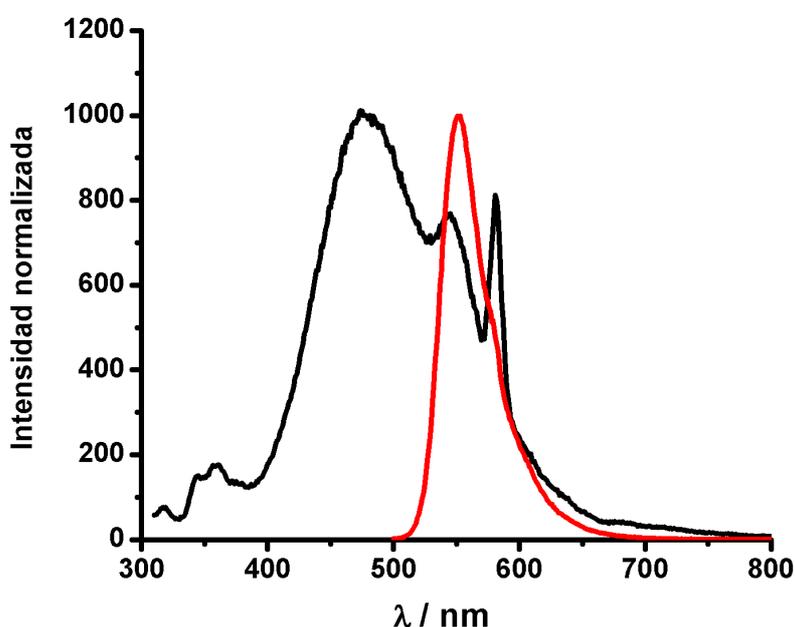


Figura 6.4. Espectros de emisión de fluorescencia de R6G (—) y CZL-SH (—) en SBF pH 7,0 al 90 % v/v y a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

La posición de las bandas de emisión de CZL-SH y R6G alrededor de 450 nm y 550 nm , respectivamente, coinciden con la región de absorción de la resonancia de plasmón superficial de las AgNP y AuNP presentadas previamente en esta tesis. Como se mencionó en el capítulo 5, el solapamiento entre la banda de emisión de un donador y la banda de absorción de un aceptor puede dar lugar a una transferencia de energía desde el donador en estado excitado hacia el aceptor, por ejemplo mediante FRET,³³ ocasionando la desactivación de la fluorescencia del donador. Por este motivo se seleccionaron estas sondas fluorescentes para el desarrollo de una metodología

analítica que permita la detección simultánea de AgNP y AuNP, extendiendo lo propuesto en el capítulo 5 de la presente tesis, y con la premisa de que el *quenching* observado para cada sonda fluorescente es principalmente ocasionado por un tipo de partícula (oro o plata).

6.4.2. Datos de segundo orden: matrices de excitación-emisión y matrices de *quenching*

La obtención de datos de segundo orden para el desarrollo del método multivariado requirió evaluar los perfiles de excitación-emisión de las sondas fluorescentes, a fin de obtener las mejores condiciones experimentales para el análisis. La optimización de la configuración instrumental adecuada para la obtención de las EEM se realizó sobre mezclas conteniendo ambas sondas fluorescentes a diferentes niveles de concentración, que variaron entre 10-50 μM (CZL-SH) y entre 40-200 nM (R6G) . Los niveles de concentración evaluados se establecieron garantizando que la absorbancia de las muestras fuera siempre menor a 0,05 con paso óptico de 1,0 cm.

Inicialmente, se obtuvieron las EEM utilizando las concentraciones más altas de las sondas fluorescentes, con ambos anchos de rendija fijados en 5,0 nm y una potencia del detector igual a 700 V. Si bien con esta configuración experimental se registraron EEM adecuadas, se observó que a estos niveles de concentración de los sensores se producía una agregación considerable de las NP metálicas empleadas como analitos, por lo que se procedió a evaluar concentraciones menores de CZL-SH y R6G. Luego de evaluar individualmente la interacción de cada sensor con las NP, se concluyó que las concentraciones óptimas de R6G y CZL-SH que no presentaban evidencia de agregación de los analitos fue igual a 50 nM para el caso de la rodamina, y de 14 μM para el caso del carbazol. Una vez fijadas las concentraciones de los sensores, se ajustaron el resto de los parámetros instrumentales para obtener una intensidad de fluorescencia máxima de ambos sensores, pero sin ocasionar saturación del detector del espectrofluorímetro. A estos niveles de concentración, la potencia del detector se fijó en su nivel máximo (800 V). Por el mismo motivo, se incrementó el ancho de rendija de excitación hasta 10,0 nm, manteniendo el ancho de

rendija de emisión en 5,0 nm. Finalmente, el $\Delta\lambda_{exc}$ se estableció en 5,0 nm, lo que permitió obtener un número manejable de sensores en el modo excitación, pero sin sacrificar información espectral. La figura 6.5.A muestra la EEM de la mezcla de sondas fluorescentes registrada de acuerdo a la configuración óptima.

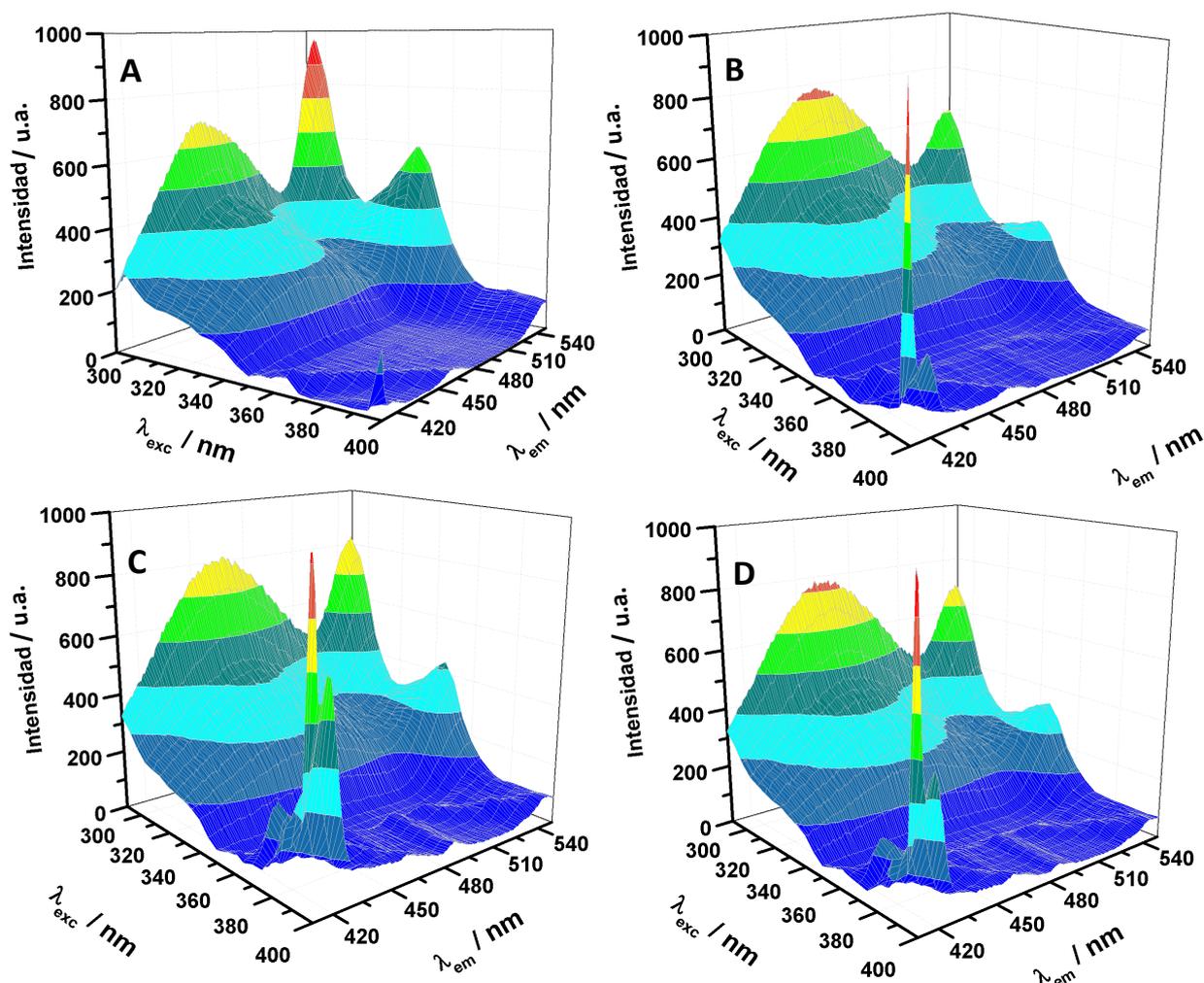


Figura 6.5. EEMs de CZL-SH (14 μ M) y R6G (50 nM) en presencia de AgNP y AuNP. (A) Sin agregado de NP. (B) 14,3 pM AgNP y 1,6 nM AuNP. (C) 57,3 pM AgNP y 0,4 nM AuNP. (D) 35,8 pM AgNP y 1,0 nM AuNP. Soluciones en SBF pH 7,0 al 90 % v/v y a 25 °C. Ancho de rendija de emisión: 5,0 nm. Ancho de rendija de excitación: 10,0 nm. Potencia del detector: 800 V.

En la EEM de la Fig. 6.5.A, se pueden observar claramente definidas una región de emisión de CZL-SH entre 410 nm y 500 nm, y una región de emisión de R6G por

encima de los 500 nm. Por otro lado, se observa que la emisión es prácticamente inexistente cuando las muestras se excitan a λ mayores que 360 nm, como resultado de la baja absorbancia de las muestras a esas longitudes de onda.

Una vez obtenida la EEM en ausencia de nanopartículas, se procedió a registrar las matrices en presencia de mezclas de AuNP y AgNP, de acuerdo a lo indicado en la tabla 6.2. En las figuras 6.5.B, C y D se pueden apreciar los perfiles de la EEM en presencia de nanopartículas metálicas para las muestras de calibración 1 (14,3 pM AgNP; 1,6 nM AuNP), 2 (57,3 pM AgNP; 0,4 nM AuNP) y 3 (35,8 pM AgNP; 1,0 nM AuNP), respectivamente. En primera instancia, se observó el *quenching* de fluorescencia de la banda de emisión correspondiente a R6G por encima de los 500 nm, como resultado de su interacción con las NP a cortas distancias (< 5 nm), que da lugar a fenómenos de transferencia de energía del tipo FRET y de superficie (SET).³⁴ Al contrario, se produjo un ligero incremento de la fluorescencia en la región de emisión de CZL-SH respecto de la EEM en ausencia de NP. Este incremento resultó ser más o menos constante a lo largo de todas las muestras, independientemente de la concentración de partículas presentes en cada una. Por lo tanto, debido a lo anteriormente expuesto y a la falta de componentes espaciadores para ubicar de forma controlada el fluoróforo en la proximidad de la superficie metálica (5 a 90 nm) y favorecer una interacción plasmónica de campo cercano entre los componentes, es improbable que el incremento observado sea debido a fenómenos de tipo MEF (fluorescencia incrementada por el metal)^{35,36} mediante el cual se pueden obtener importantes mejoras de las propiedades ópticas de un fluoróforo (rendimiento cuántico incrementado, mayor fotoestabilidad, tiempo de vida reducido), sino consecuencia de efectos dispersivos ocasionados por las NP. Desde el punto de vista analítico, resultó muy interesante para el desarrollo del método la aparición de nuevas señales de fluorescencia en las EEM en la región comprendida entre $\lambda_{exc} = 380 - 400$ nm y $\lambda_{em} = 410 - 440$ nm, que fueron atribuidas a AgNP ya que únicamente aparecen en presencia de AgNP (aún en agua MQ) y se ha reportado en bibliografía que partículas de plata pueden presentar emisión de fluorescencia en la región

mencionada.²⁸ La intensidad de estos máximos locales de emisión fueron dependientes de la concentración de AgNP en las mezclas, en tanto que no dependieron de la cantidad de AuNP presente en las mismas. Por lo tanto, estas señales se utilizaron para llevar a cabo la calibración del analito AgNP sin que AuNP genere algún tipo de interferencia en la determinación analítica del primero, ya que en esta región no hay emisión de los sensores fluorescentes ni de AuNP (efecto observado en la EEM de la muestra de calibración 15 que no contiene AgNP).

Teniendo en cuenta que uno de los principales fenómenos observados al interaccionar las sondas fluorescentes con las NP es el *quenching* de la emisión de fluorescencia e, inspirándose en la metodología propuesta en el capítulo 5 de esta tesis, se propuso llevar a cabo la calibración de AuNP a partir de las que fueron denominadas “matrices de *quenching*” (QM). Estas QM pueden utilizarse de forma análoga a las curvas de Stern-Volmer en las metodologías univariadas, pero como constituyen datos de segundo orden, éstas pueden aplicarse en algoritmos de calibración multivariados como U-PLS. La figura 6.6. muestra, a modo representativo, la QM obtenida para $[AgNP]=57,3$ pM y $[AuNP]=0,4$ nM.

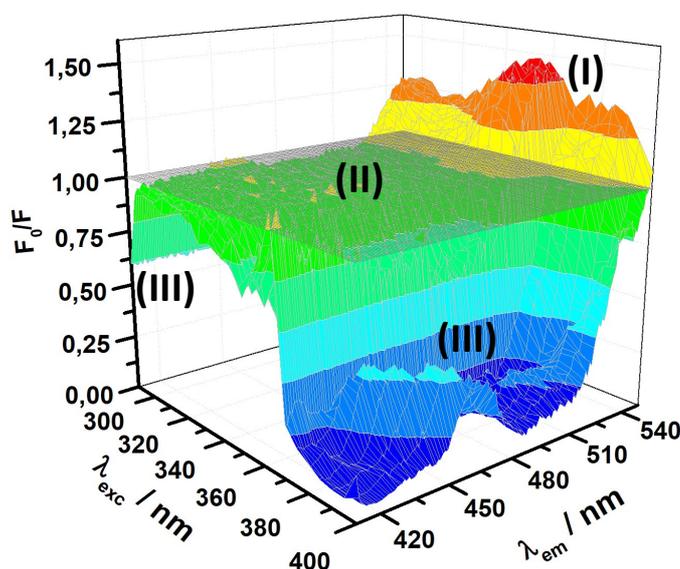


Figura 6.6. QM de una muestra de CZL-SH (14 μ M) y R6G (50 nM) en presencia de $[AgNP]=57,3$ pM y $[AuNP]=0,4$ nM. SBF pH 7,0 al 90 % v/v y a 25 °C. Ancho de rendija de emisión: 5,0 nm. Ancho de rendija de excitación: 10,0 nm. Potencia del detector: 800 V. En el gráfico se indican tres regiones diferenciadas. Se muestra en gris el plano de $F_0/F=1$.

La QM de la figura 6.6. muestra varias regiones claramente diferenciadas: (I) región con F_o/F mayor a 1, a $\lambda_{em} > 510$ nm; (II) meseta en la cual la relación de emisiones es prácticamente igual a 1; y (III) dos regiones donde F_o/F resulta menor a 1, a 300 nm $> \lambda_{exc} > 360$ nm. Las regiones en las cuales se observa una relación de fluorescencia menor a 1 son consecuencia de los fenómenos discutidos anteriormente, por un lado la ligera exaltación de la emisión observada para el sensor CZL-SH y, por otro, la aparición de nuevas señales de fluorescencia cuando AgNP está presente en las muestras. Desde el punto de vista analítico, la región de mayor utilidad es aquella con valores de F_o/F mayores a 1, en la cual existe dependencia de la señal analítica con la concentración de los *quencher*s, particularmente con AuNP, de acuerdo a la relación de Stern-Volmer.

A partir de la visualización de los datos de segundo orden y de lo discutido anteriormente, se definieron las regiones de análisis y el número de sensores a utilizar en la calibración multivariada para cada uno de los analitos estudiados. En el caso de AgNP, se utilizó toda la información de las EEM, con un total de 141 sensores en el modo de emisión y 23 en el modo excitación. Para el otro analito, AuNP, se limitó el número de sensores utilizados de las QM, con el objetivo de descartar aquellas regiones en las que no se observó *quenching* de la emisión de fluorescencia. De esta manera, el análisis de AuNP se llevó a cabo a partir de 141 sensores en el modo emisión ($\lambda_{em} = 410,0 - 550,0$ nm) y 15 sensores en el modo excitación ($\lambda_{exc} = 295,0 - 365,0$ nm).

6.4.3. Calibración multivariada

6.4.3.1. Determinación del número de variables latentes y algoritmo RBL

El conjunto de EEM y el de QM para el análisis multivariado de AgNP y AuNP, respectivamente, fueron estudiados mediante el algoritmo de segundo orden U-PLS/RBL. Antes de implementar el algoritmo multivariado, se estimó para cada conjunto de datos el número óptimo de variables latentes mediante validación cruzada (*leave-one-out*) utilizando únicamente la información del set de calibración, de acuerdo al criterio de Haaland y Thomas.²⁰ Para ello, se calcularon los parámetros

estadísticos $F(\mathbf{A}) = \text{PRESS}(\mathbf{A} < \mathbf{A}^*) / \text{PRESS}(\mathbf{A})$, donde PRESS (suma de cuadrados del error residual de predicción) es igual a $\sum (y_{i, \text{nom}} - y_{i, \text{pred}})^2$, \mathbf{A} corresponde a un número de factores de prueba y \mathbf{A}^* es el valor mínimo de PRESS. A partir de $F(\mathbf{A})$, se seleccionó como cantidad de variables latentes el número de factores que condujeron a una probabilidad $(p) < 0,75$ con $F > 1$. La tabla 6.3. muestra los resultados para ambos analitos, hasta un valor arbitrario de $\mathbf{A} = 6$. De acuerdo a lo observado en la tabla, para el caso de AgNP, el número óptimo de variables latentes resultó igual a cuatro, mientras que para AuNP fue igual a dos.

Tabla 6.3. Estadísticos $F(\mathbf{A})$, PRESS y probabilidad de la validación cruzada.

AgNP				AuNP			
Componente	PRESS	F(A)	p	Componente	PRESS	F(A)	p
1	4,93 x10 ³	310,63	0,9990	1	2,11	4,56	0,9970
2	303,69	19,15	0,9990	2	0,50	1,07	0,5520
3	73,02	4,6	0,9960	3	0,46	1	0,4990
4	16,45	1,03	0,5260	4	0,53	0	0
5	16,25	1,02	0,5170	5	0,50	0	0
6	18,86	1	0,4990	6	0,50	0	0

En negrita se señala el número óptimo de variables latentes para cada analito.

En U-PLS, las variables latentes no tienen necesariamente un significado físico dentro del sistema estudiado, sino que expresan aquellos componentes (físicos o no) que describen una variación estadísticamente significativa de los datos.³⁷ Por este motivo, y si bien el conjunto de muestras es el mismo en ambos casos, se obtienen diferentes números de variables latentes para cada analito, ya que la información de entrada para el algoritmo es distinta en el análisis de AgNP y de AuNP. El hecho de que se hayan requerido más variables latentes que el número conocido de analitos para explicar los datos de calibración, es indicativo que el algoritmo U-PLS también está modelando otros efectos (filtro interno) y la presencia de componentes adicionales (sensores fluorescentes).³⁷

Por otro lado, como se espera que la presencia de cada partícula actúe como interferente en la detección de la otra, o que existan interferentes inesperados en las

muestras con agua de red y de río, es necesario modelar el efecto de estos interferentes involucrando en el análisis el procedimiento RBL (bilinearización residual), que permite alcanzar la ventaja de segundo orden.³⁸ La selección del número óptimo de componentes de RBL se realizó mediante el análisis de los residuales de predicción en función del número de componentes inesperados (N_x),^{19,21} como se muestra en la figura 6.7. Para cada analito, el procedimiento RBL sugirió involucrar diferentes valores de N_x . Para AgNP, el número de componentes de RBL fue igual a 2, mientras que para AuNP, $N_x=1$, tanto en agua de red como de río.

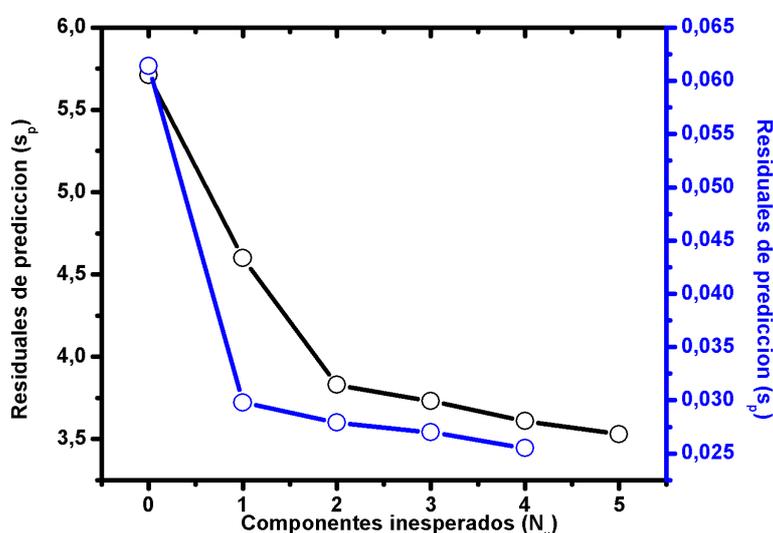


Figura 6.7. Residuales de predicción vs. número de componentes inesperados para una de las muestras de test (T2) del conjunto de datos. AgNP (negro). AuNP (azul).

6.4.3.2. Análisis cuantitativo y cifras de mérito del método propuesto

Luego de aplicar el algoritmo U-PLS, y a fin de evaluar la capacidad predictiva del método analítico propuesto, se determinaron los valores correspondientes de las figuras de mérito (Tabla 6.4.) y se calcularon los niveles de concentración predichos para cada analito de las muestras de test (Tabla 6.5.) de acuerdo a las condiciones establecidas y mencionadas en las secciones previas de este capítulo.

Tabla 6.4. Figuras de mérito en la validación de muestras de AgNP y AuNP mediante U-PLS/RBL en agua de río y red al 5 % v/v.^a

Figuras de mérito	Agua de río		Agua de red	
	AuNP	AgNP	AuNP	AgNP
RMSEP ^b	0,06	1,33	0,07	2,56
REP % ^c	7,00	4,24	7,72	8,18
SEN ^d / nM ⁻¹	4,1	24,2 x10 ³	4,1	24,1 x10 ³
γ^e / nM ⁻¹	135,9	6,1 x10 ³	117,2	6,6 x10 ³
LOD ^e / pM	24,5	0,57	31,8	0,54
LOQ ^e / pM	73,6	1,72	95,2	1,61

^a R6G (50 nM) y CZL-SH (14 μ M) en SBF pH 7,0 al 90 % v/v y 25 °C. Ancho de rendija de emisión: 5,0 nm. Ancho de rendija de excitación: 10,0 nm. Potencia del detector: 800 V.

^b Raíz del error cuadrático medio, en nM (AuNP) y pM (AgNP).

^c Error relativo de predicción porcentual basado en la concentración de calibración media.

^d SEN determinada de acuerdo a la ecuación 6.10.

^e γ , LOD y LOQ determinados de acuerdo a las ecuaciones 6.11., 6.12. y 6.13., respectivamente.

La metodología analítica multivariada propuesta logró excelentes predicciones de las concentraciones de AuNP y AgNP con errores relativos de predicción (REP %) menores al 10 % en todos los casos. Dadas las condiciones de medida, donde ambos analitos estaban presentes simultáneamente actuando como potenciales interferentes en la determinación del otro, queda claro ante estos resultados el gran potencial de RBL para modelar perfiles espectroscópicos de componentes inesperados presentes en la muestra a analizar para alcanzar la ventaja de segundo orden. Cabe recordar que para la metodología univariada discutida en el capítulo 5 de la presente tesis se observaron fuertes interferencias entre AuNP y AgNP que imposibilitaron la detección simultánea de cada analito con un nivel aceptable de confianza. Por otro lado, es notable que existe poca influencia de la matriz de agua (río o red domiciliaria) sobre las cifras de mérito determinadas en ambos casos, indicando también que el algoritmo U-PLS/RBL puede manejar adecuadamente cualquier inconveniente que pueda surgir por efecto matriz.

Tabla 6.5. Concentraciones predichas de muestras de AgNP y AuNP mediante U-PLS/RBL en agua de río y de red al 5 % v/v.^a

Muestra de test	AuNP		AgNP		
	[Nominal] / nM	[Predicho] ^b / nM	[Nominal] / pM	[Predicho] ^b / pM	
Agua de río	T1	0,2	n/a ^c	20,1	21 (1)
	T2	0,6	0,54 (0,02)	20,1	21 (1)
	T3	0,6	0,57 (0,03)	37,3	37 (1)
	T4	1,0	1,09 (0,03)	54,5	55 (1)
	T5	1,5	1,46 (0,04)	37,3	39 (1)
	T6	0,2	n/a ^c	54,5	55 (2)
	T7	1,5	1,42 (0,03)	7,2	8,1 (0,9)
	T8	1,0	1,13 (0,05)	7,2	10 (1)
% Recuperación aparente media		102 (6)		11 (1) x10 ¹	
Agua de red	T1	0,2	n/a ^c	20,1	20 (1)
	T2	0,6	0,63 (0,03)	20,1	23 (1)
	T3	0,6	0,56 (0,03)	37,3	35 (2)
	T4	1,0	1,12 (0,02)	54,5	51 (1)
	T5	1,5	1,59 (0,04)	37,3	41 (1)
	T6	0,2	n/a ^c	54,5	57 (2)
	T7	1,5	1,47 (0,02)	7,2	6 (1)
	T8	1,0	1,09 (0,03)	7,2	10 (2)
% Recuperación aparente media		106 (6)		10 (1) x10 ¹	

^a R6G (50 nM) y CZL-SH (14 μM) en SBF pH 7,0 al 90 % v/v y 25 °C. Ancho de rendija de emisión: 5,0 nm. Ancho de rendija de excitación: 10,0 nm. Potencia del detector: 800 V.

^b Entre paréntesis se indica la desviación estándar de duplicados de cada muestra test.

^c No aplicable. Valor nominal por debajo del límite de detección.

Los LOQ y LOQ determinados para ambos analitos estuvieron en el orden de los pM (10⁻¹² M), por lo que la metodología permite la detección y cuantificación de AuNP y AgNP en concentraciones muy bajas. El método propuesto resulta más sensible para AgNP que para AuNP, obteniéndose LOD y LOQ aproximadamente 40 veces menores para el primer analito. Estas diferencias pueden deberse principalmente al sistema de detección indirecta a partir del *quenching* de los sensores fluorescentes

que se emplea para la determinación analítica de AuNP, mientras que el análisis de AgNP se basa directamente en su propia emisión de fluorescencia.

Como se mencionó anteriormente, no existen publicaciones que involucren la determinación analítica de nanomateriales sintéticos mediante calibración de segundo orden, por lo que la comparación directa de los resultados obtenidos con técnicas análogas no es adecuada. Los LOD determinados mediante la metodología multivariada propuesta en este capítulo resultaron similares a aquellos calculados para los mismos tipos de NP (AuNPc y AgNPg) mediante la metodología univariada basada en el quenching de carbazol, discutida en el capítulo 5 de esta tesis ($\text{LOD}_{\text{univariado AuNPc}}=16,1 \text{ pM}$, $\text{LOD}_{\text{univariado AgNPg}}=10,1 \text{ pM}$). Tanto los LOD obtenidos mediante la metodología multivariada como aquellos determinados mediante un enfoque univariado, se encuentran en el mismo orden que otros reportados en bibliografía para NP de características similares, y que fueron mencionados en el capítulo 5.^{34,39,40} Sin embargo, es importante remarcar que la metodología de segundo orden permite detectar simultáneamente ambos analitos sin la necesidad de llevar a cabo procesos de separación o pretratamientos de la muestra. Luego de una intensiva revisión bibliográfica, se encontraron pocos trabajos que involucren la cuantificación simultánea de AuNP y AgNP en mezclas de ambos analitos y, en general, todas ellas requieren procesos de separación y preconcentración previos, o están acoplados a sistemas de separación. Entre las metodologías que permiten la cuantificación simultánea de los analitos estudiados se pueden mencionar técnicas basadas en extracción en punto de nube (CPE) acoplada a espectrometría de fluorescencia de rayos X de reflexión total, con LOD de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\sim 9 \text{ aM}$) para AuNP (70 nm) y $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\sim 38 \text{ aM}$) para AgNP (60 nm) ambas estabilizadas con citrato de sodio,⁴¹ y en CPE acoplada a un sistema de detección quimioluminiscente de inyección de flujo, con LOD iguales a $1,9 \text{ pM}$ para AgNP sintetizadas con borohidruro de sodio (11-14 nm) y $1,1 \text{ pM}$ para AuNP estabilizadas con citrato (27-32 nm).⁴² También existen metodologías basadas en ICP-MS que permiten la detección simultánea de los analitos de interés en niveles muy bajos en masa, con LOD iguales a 530 ag para AgNP (correspondiente a la detección individual de una partícula de 46 nm) y 340 ag

para AuNP (detección de partícula de 32 nm),⁴³ pero dichas técnicas requieren instrumentación muy costosa, digestión de la muestra y personal altamente capacitado.

Si bien no se obtienen límites de detección del mismo orden que las metodologías anteriores, el método analítico propuesto en este capítulo presenta LOD aceptables mediante un sistema de análisis mucho más sencillo, rápido y de menor costo, con poco consumo de reactivos y sin la necesidad de personal altamente calificado, lo que permitiría más fácilmente su implementación en ensayos de rutina.

Exactitud y precisión intra-ensayo

La exactitud y la precisión intra-ensayo del método propuesto se evaluaron a partir de los resultados de predicción obtenidos de las muestras de test. Para determinar la exactitud del método se compararon las concentraciones nominales de ambos analitos con las concentraciones determinadas por U-PLS/RBL mediante la aplicación del ensayo de región elíptica de confianza conjunta (EJCR), que es una generalización multidimensional del intervalo de confianza tradicional.^{44,45}

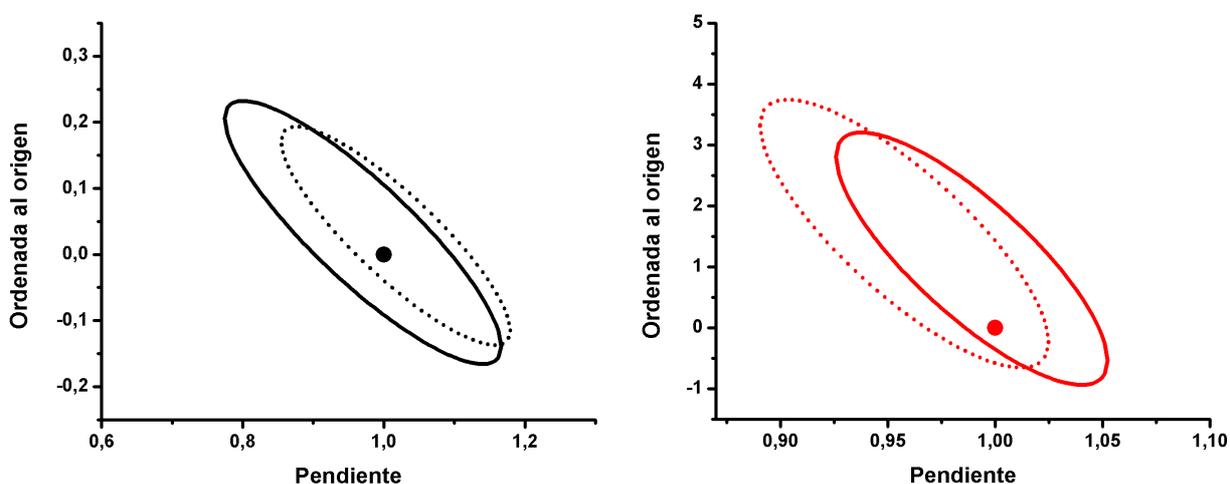


Figura 6.8. EJCR (al 95 % de confianza) para la pendiente y ordenada al origen correspondientes a la regresión de concentraciones nominales vs. concentraciones predichas para AuNP (negro) y AgNP (rojo). En línea sólida se muestran los EJCR de las muestras determinadas en agua de río al 5 % v/v y en línea punteada los EJCR determinados en agua de red domiciliaria al 5 % v/v.

En la comparación de nominales vs. predichos, se espera un comportamiento lineal ideal de pendiente 1 y ordenada al origen nula. Si la región de confianza contiene este punto ideal (0,1) se considera que la metodología es exacta para la determinación analítica. La figura 6.8. muestra los gráficos correspondientes a la EJCR de las recta de nominales vs. predichos de ambos analitos en las dos matrices estudiadas. En todos los casos analizados, las regiones de confianza contienen el punto ideal de pendiente igual a uno y ordenada al origen cero, indicando la exactitud de la metodología analítica a un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 6.6. Coeficientes de variación de los duplicados de AuNP y AgNP determinadas mediante U-PLS/RBL en agua de río y de red al 5 % v/v.^a

Muestra de test	AuNP		AgNP		
	[Predicho] ^b / nM	CV %	[Predicho] ^b / pM	CV %	
Agua de río	T1	n/a ^c	-	21 (1)	6,7
	T2	0,54 (0,02)	3,7	21 (1)	6,2
	T3	0,57 (0,03)	5,3	37 (1)	3,0
	T4	1,09 (0,03)	2,8	55 (2)	3,0
	T5	1,46 (0,04)	2,7	39 (1)	3,3
	T6	n/a ^c	-	55 (1)	2,0
	T7	1,42 (0,03)	2,1	8,1 (0,9)	11,1
	T8	1,13 (0,05)	4,4	10 (1)	10,0
Agua de red	T1	n/a ^c	-	20 (1)	6,5
	T2	0,63 (0,03)	4,8	23 (1)	6,1
	T3	0,56 (0,03)	5,4	35 (2)	5,0
	T4	1,12 (0,02)	1,8	51 (1)	2,7
	T5	1,59 (0,04)	2,5	41 (1)	2,9
	T6	n/a ^c	-	57 (2)	2,7
	T7	1,47 (0,02)	1,4	6 (1)	20,0
	T8	1,09 (0,03)	2,8	9 (2)	17,8

^a R6G (50 nM) y CZL-SH (14 μM) en SBF pH 7,0 al 90 % v/v. 25 °C. Ancho de rendija de emisión: 5,0 nm. Ancho de rendija de excitación: 10,0 nm. Potencia del detector: 800 V.

^b Entre paréntesis se indica la desviación estándar de duplicados de cada muestra test.

^c No aplicable. Valor nominal por debajo del límite de detección.

Por otro lado, la precisión intra-ensayo o repetibilidad se evaluó determinando los coeficientes de variación porcentuales (CV %) de los duplicados de todas las muestras analizadas. Estos resultados se muestran en la tabla 6.6. En todos los casos, los CV % se encontraron en su mayoría por debajo del 10 %, indicando que la metodología multivariada tiene una excelente precisión para la determinación simultánea de AuNP y AgNP bajo las condiciones establecidas. En términos generales, la repetibilidad es mejor para AuNP en comparación con los valores observados para AgNP, lo que podría indicar que la utilización de las QM mejora la precisión en la determinación del analito mediante U-PLS/RBL. Los mayores CV % observados se obtuvieron para aquellas muestras de menor concentración, cercanas a los LOQ del método.

Recuperación

Se realizaron ensayos de recuperación aparente (R) a partir del cociente entre la concentración de analito predicha y la concentración nominal de las muestras de test. Para cada tipo de NP y cada matriz, se calcularon las recuperaciones aparentes promedio (\bar{R}) (Tabla 6.6.), y se evaluó mediante el estadístico t-Student si los \bar{R} determinados fueron significativamente diferentes a 100 %, a un nivel de significancia igual a 0,05. Los resultados de la comparación de medias se informan en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Comparación de medias de las recuperaciones promedio.

Tipo NP	Matriz real	R %	SD _R %	p-valor ^a
AuNP	Agua de río	102	6	0,537
	Agua de red	106	6	0,054
AgNP	Agua de río	11 x 10 ¹	1 x 10 ¹	0,123
	Agua de red	10 x 10 ¹	1 x 10 ¹	0,609

^a Un p-valor de la prueba t menor a 0,05 indica que la media experimental es significativamente diferente a 100 %, con un 95 % de confianza.

SD_R%: Desviación estándar de la media de la recuperación porcentual.

Los resultados de la anterior tabla muestran que las recuperaciones promedio son en todos los casos iguales a 100 %, a un 95 % de confianza (p-valor>0,05). Por lo

tanto, puede concluirse que método analítico propuesto resulta exacto en la determinación de AuNP y AgNP en las matrices reales evaluadas.

6.5. Conclusiones

Mediante la conjunción de la espectroscopia de fluorescencia y el modelo multivariado de calibración U-PLS/RBL se pudo desarrollar una metodología analítica rápida, de bajo costo y sencilla para la detección y cuantificación simultánea de AuNP y AgNP en mezclas, y en presencia de matrices de agua de río y de red. Los LOD y LOQ obtenidos para ambos analitos fueron mejores que aquellos determinados por la metodología univariada descrita en el capítulo 5, y del mismo orden que muchas de las metodologías reportadas en la bibliografía actual. De mayor importancia, es la posibilidad que ofrece este nuevo método de realizar la cuantificación de diferentes analitos de manera simultánea y en presencia de interferentes, sin necesidad de recurrir a engorrosos y costosos procesos de separación o preconcentración, lo que sienta un precedente para explorar sistemas aún mas complejos, con variación simultánea de otros parámetros de interés de las NP (ligando, tamaños, cobertura de materia orgánica, etc.). Además, la recuperación en las muestras de agua de río y de red fue muy buena, alcanzando en todos los casos un valor igual al 100 %, a un nivel de significancia igual a 0,05.

6.6. Referencias

- (1) *Engineered Nanoparticles and the Environment: Biophysicochemical Processes and Toxicity*; Xing, B., Vecitis, C. D., Senesi, N., Eds.; Wiley-IUPAC series in biophysico-chemical processes in environmental systems; Wiley: Hoboken, New Jersey, 2016.
- (2) Wiesner, M. R.; Lowry, G. V.; Jones, K. L.; Hochella, Jr., M. F.; Di Giulio, R. T.; Casman, E.; Bernhardt, E. S. Decreasing Uncertainties in Assessing Environmental Exposure, Risk, and Ecological Implications of Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (17), 6458–6462. <https://doi.org/10.1021/es803621k>.
- (3) Howard, A. G. On the Challenge of Quantifying Man-Made Nanoparticles in the Aquatic Environment. *J. Env. Monit* **2010**, *12* (1), 135–142.

- <https://doi.org/10.1039/B913681A>.
- (4) 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* **2016**, *904*, 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>.
 - (5) Liu, J.; Chao, J.; Liu, R.; Tan, Z.; Yin, Y.; Wu, Y.; Jiang, G. Cloud Point Extraction as an Advantageous Preconcentration Approach for Analysis of Trace Silver Nanoparticles in Environmental Waters. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (15), 6496–6502. <https://doi.org/10.1021/ac900918e>.
 - (6) 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.* **2010**, *132* (35), 12176–12178. <https://doi.org/10.1021/ja104052c>.
 - (7) 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. Spectrom.* **2014**, *29* (3), 444–453. <https://doi.org/10.1039/C3JA50342A>.
 - (8) Pallotta, A.; Philippe, V.; Boudier, A.; Leroy, P.; Clarot, I. Highly Sensitive and Simple Liquid Chromatography Assay with Ion-Pairing Extraction and Visible Detection for Quantification of Gold from Nanoparticles. *Talanta* **2018**, *179*, 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.016>.
 - (9) Bro, R. Multivariate Calibration. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500* (1–2), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00681-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00681-0).
 - (10) Olivieri, A. C. Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity? *Anal. Chem.* **2008**, *80* (15), 5713–5720. <https://doi.org/10.1021/ac800692c>.
 - (11) Escandar, G. M.; Goicoechea, H. C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A. C. Second- and Higher-Order Data Generation and Calibration: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *806*, 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.11.009>.
 - (12) Bro, R. PARAFAC. Tutorial and Applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *23*.
 - (13) Chen, Z.-P.; Wu, H.-L.; Jiang, J.-H.; Li, Y.; Yu, R.-Q. A Novel Trilinear Decomposition Algorithm for Second-Order Linear Calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, *52* (1), 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00081-2).
 - (14) Xia, A.-L.; Wu, H.-L.; Fang, D.-M.; Ding, Y.-J.; Hu, L.-Q.; Yu, R.-Q. Alternating Penalty Trilinear Decomposition Algorithm for Second-Order Calibration with Application to Interference-Free Analysis of Excitation-Emission Matrix Fluorescence Data. *J. Chemom.* **2005**, *19* (2), 65–76. <https://doi.org/10.1002/cem.911>.
 - (15) Tauler, R. Multivariate Curve Resolution Applied to Second Order Data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30* (1), 133–146.

- [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X).
- (16) Amigo, J. M.; Skov, T.; Bro, R.; Coello, J.; Maspoch, S. Solving GC-MS Problems with PARAFAC2. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (8), 714–725. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.011>.
- (17) Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J. Multi-Way Principal Components- and PLS-Analysis. *J. Chemom.* **1987**, *1* (1), 41–56. <https://doi.org/10.1002/cem.1180010107>.
- (18) Wilson, B. E.; Lindberg, W.; Kowalski, B. R. Multicomponent Quantitative Analysis Using Second-Order Nonbilinear Data: Theory and Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (11), 3797–3804. <https://doi.org/10.1021/ja00193a006>.
- (19) Olivieri, A. C. On a Versatile Second-Order Multivariate Calibration Method Based on Partial Least-Squares and Residual Bilinearization: Second-Order Advantage and Precision Properties. *J. Chemom.* **2005**, *19* (4), 253–265. <https://doi.org/10.1002/cem.927>.
- (20) Haaland, D. M.; Thomas, E. V. Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (11), 1193–1202. <https://doi.org/10.1021/ac00162a020>.
- (21) Öhman, J.; Geladi, P.; Wold, S. Residual Bilinearization. Part 1: Theory and Algorithms. *J. Chemom.* **1990**, *4* (1), 79–90. <https://doi.org/10.1002/cem.1180040109>.
- (22) Allegrini, F.; Olivieri, A. C. Analytical Figures of Merit for Partial Least-Squares Coupled to Residual Multilinearization. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (24), 10823–10830. <https://doi.org/10.1021/ac302996d>.
- (23) Olivieri, A. C.; Wu, H.-L.; Yu, R.-Q. MVC2: A MATLAB Graphical Interface Toolbox for Second-Order Multivariate Calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2009**, *96* (2), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.02.005>.
- (24) Lazurko, C.; Ahumada, M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Alarcon, E. I. NANoPoLC Algorithm for Correcting Nanoparticle Concentration by Sample Polydispersity. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3166–3170. <https://doi.org/10.1039/C7NR08672E>.
- (25) Molina Torres, María Andrea. Estrategias analíticas basadas en sensores moleculares para la detección de nanomateriales sintéticos, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, 2020.
- (26) Beg, S.; Rahman, M. Chapter 11 - Design of Experiments Application for Analytical Method Development. In *Handbook of Analytical Quality by Design*; Beg, S., Hasnain, M. S., Rahman, M., Almalki, W. H., Eds.; Academic Press, 2021; pp 191–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820332-3.00011-X>.
- (27) Piccirilli, G. N.; Escandar, G. M. Partial Least-Squares with Residual Bilinearization for the Spectrofluorimetric Determination of Pesticides. A Solution of the Problems of Inner-Filter Effects and Matrix Interferents. *The Analyst* **2006**, *131* (9), 1012. <https://doi.org/10.1039/b603823a>.
- (28) Liu, C.; Yang, X.; Yuan, H.; Zhou, Z.; Xiao, D. Preparation of Silver Nanoparticle and Its Application to the Determination of Ct-DNA. *Sensors* **2007**, *7* (5), 708–718. <https://doi.org/10.3390/s7050708>.

- (29) Saini, G. S. S.; Kaur, S.; Tripathi, S. K.; Mahajan, C. G.; Thanga, H. H.; Verma, A. L. Spectroscopic Studies of Rhodamine 6G Dispersed in Polymethylcyanoacrylate. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61* (4), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.05.022>.
- (30) Nag, A.; Goswami, D. Solvent Effect on Two-Photon Absorption and Fluorescence of Rhodamine Dyes. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2009**, *206* (2–3), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2009.06.007>.
- (31) Li, L.; Wu, Y.; Zhou, Q.; He, C. Experimental and Theoretical Studies on the One-Photon and Two-Photon Properties of a Series of Carbazole Derivatives Containing Styrene: PROPERTIES OF A SERIES OF CARBAZOLE DERIVATIVES CONTAINING STYRENE. *J. Phys. Org. Chem.* **2012**, *25* (5), 362–372. <https://doi.org/10.1002/poc.1923>.
- (32) Bonesi, S. M.; Erra-Balsells, R. Electronic Spectroscopy of Carbazole and N- and C-Substituted Carbazoles in Homogeneous Media and in Solid Matrix. *J. Lumin.* **2001**, *93* (1), 51–74. [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(01\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(01)00173-9).
- (33) Ghosh, S. K.; Pal, T. Photophysical Aspects of Molecular Probes near Nanostructured Gold Surfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (20), 3831. <https://doi.org/10.1039/b817373g>.
- (34) Torres, M. A. M.; Veglia, A. V.; Pacioni, N. L. The Fluorescence Quenching of Rhodamine 6G as an Alternative Sensing Strategy for the Quantification of Silver and Gold Nanoparticles. *Microchem. J.* **2021**, *160*, 105645. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105645>.
- (35) Liu, Y.-T.; Luo, X.-F.; Lee, Y.-Y.; Chen, I.-C. Investigating the Metal-Enhanced Fluorescence on Fluorescein by Silica Core-Shell Gold Nanoparticles Using Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *Dyes Pigments* **2021**, *190*, 109263. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109263>.
- (36) Kaja, S.; Damera, D. P.; Nag, A. A Metal-Enhanced Fluorescence Sensing Platform for Selective Detection of Picric Acid in Aqueous Medium. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1129*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.001>.
- (37) *Practical Guide to Chemometrics*, 2nd ed.; Gemperline, P., Ed.; CRC/Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
- (38) Gil, D. B.; de la Peña, A. M.; Arancibia, J. A.; Escandar, G. M.; Olivieri, A. C. Second-Order Advantage Achieved by Unfolded-Partial Least-Squares/Residual Bilinearization Modeling of Excitation–Emission Fluorescence Data Presenting Inner Filter Effects. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (23), 8051–8058. <https://doi.org/10.1021/ac061369v>.
- (39) Pacioni, N. L.; Veglia, A. V. Analytical Strategy to Detect Metal Nanoparticles in Mixtures without Previous Separation. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, *228*, 557–564. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.064>.
- (40) 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* **2015**, *872*, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.052>.
- (41) Bahadir, Z.; Torrent, L.; Hidalgo, M.; Marguá, E. Simultaneous Determination of

- Silver and Gold Nanoparticles by Cloud Point Extraction and Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2018**, *149*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.07.016>.
- (42) Tsogas, G. Z.; Giokas, D. L.; Vlessidis, A. G. Ultratrace Determination of Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles by Micelle Mediated Preconcentration/Selective Back-Extraction Coupled with Flow Injection Chemiluminescence Detection. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3484–3492. <https://doi.org/10.1021/ac404071v>.
- (43) Borovinskaya, O.; Hattendorf, B.; Tanner, M.; Gschwind, S.; Günther, D. A Prototype of a New Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometer Providing Temporally Resolved, Multi-Element Detection of Short Signals Generated by Single Particles and Droplets. *J Anal Spectrom* **2013**, *28* (2), 226–233. <https://doi.org/10.1039/C2JA30227F>.
- (44) Riu, J.; Rius, F. X. Method Comparison Using Regression with Uncertainties in Both Axes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1997**, *16* (4), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00014-9).
- (45) del Río, F. J.; Riu, J.; Rius, F. X. Graphical Criterion for the Detection of Outliers in Linear Regression Taking into Account Errors in Both Axes. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *446* (1–2), 49–58. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00911-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00911-4).

7

Conclusiones generales y perspectivas

En este trabajo de tesis se abordó, de forma general, el estudio de estrategias analíticas para detectar y cuantificar AuNP y AgNP empleando sondas fluorescentes como sensores analíticos, explorando, simultáneamente, algunos aspectos sintéticos de las NP estudiadas.

Desde una perspectiva sintética, se demostró que el empleo de diseño experimental durante la etapa de síntesis de NP permite mejorar sustancialmente la reproducibilidad *batch a batch* de las propiedades de los NM (morfología, tamaños, polidispersidad, potencial zeta). Particularmente, este enfoque quimiométrico nos permitió obtener nanopartículas de plata estabilizadas con ácido gálico altamente reproducibles, tanto desde el punto de vista de sus propiedades fisicoquímicas y su respuesta instrumental (espectroscopias y microscopias), como de los resultados obtenidos en aplicaciones específicas, como el *quenching* de fluorescencia de sondas moleculares. Por otro lado, la obtención de nanovarillas de plata resultó posible de lograr sin emplear surfactantes que direccionen el crecimiento de los centros de nucleación, mediante el control estricto de la concentración de NaOH del medio de reacción durante la reducción con citrato de sodio, que ocurre durante la etapa de crecimiento del cristal. Esto nos permitió obtener AgNR con ligandos que pueden ser reemplazados fácilmente en aplicaciones que requieren acceso a la superficie metálica, sin necesidad de involucrar laboriosos tratamientos post-síntesis. Considerando la finalidad analítica de esta tesis, y ante la necesidad de contar con un método de estimación de la concentración de este tipo de partícula no esférica, se desarrolló un algoritmo para calcular la concentración de cualquier sistema de NP, independientemente de su grado de polidispersidad y de la presencia de múltiples morfologías. La utilización del algoritmo presentado requiere información respecto de las

dimensiones de las NP y de sus proporciones relativas en la muestra. La información aportada por imágenes TEM, una técnica ubicua en la investigación nanotecnológica, es ideal para emplear nuestro algoritmo.

Se observó que la sonda fluorescente CZL interacciona con la cavidad de la HP- β -CD formando complejos de estequiometría 1:1, confirmando resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio. A nivel espectroscópico, esta interacción induce ligeros cambios espectrales a longitudes de onda en el rango del UV-visible, pero una importante exaltación de la fluorescencia del CZL. Por otro lado, se comprobó que AuNP y AgNP interaccionan con CZL (tanto con la especie aislada como formando parte de un complejo con HP- β -CD) ocasionando el *quenching* o desactivación de la emisión de fluorescencia del fluoróforo. Este proceso depende de la concentración de las NP, del tipo de metal de las mismas y de sus dimensiones, así también como del ligando que las estabiliza. De esta manera, los anteriores resultados sentaron las bases para diseñar una metodología analítica basada en este fenómeno espectroscópico. En general se observó que CZL aislado (en ausencia de CD) presentó las mayores constantes de Stern-Volmer, para todas las NP estudiadas.

Se propuso un método para la detección y cuantificación individual de AuNP y AgNP basado en el *quenching* de la emisión de fluorescencia CZL, que proporciona excelentes valores de recuperación y resulta adecuado para detectar NP a bajos niveles de concentración (pM) en agua de red domiciliaria y agua de río. Adicionalmente, los ensayos necesarios para la validación de la metodología, demostraron que el método es preciso, tanto en repetibilidad como en precisión intermedia, y exacto. Por otro lado, ante la dificultad de cuantificar simultáneamente diferentes tipos de nanopartículas, se abordó la problemática, nuevamente, desde un enfoque quimiométrico. La calibración multivariada de segundo orden a partir de la información espectroscópica suministrada por matrices de excitación-emisión y matrices de *quenching* derivadas de las primeras, resultó de gran utilidad para la detección y cuantificación simultánea de AgNP y AuNP. Este método multivariado presentó cifras de mérito excelentes, con LOD del orden de 10^{-12} M, mejores a los de la

metodología univariada. Los métodos analíticos propuestos son simples, rápidos, de bajo costo, no requieren de equipamiento costoso ni personal altamente calificado, y no requieren pretratamientos de la muestra, como separaciones o preconcentración de los analitos. Estas características, sumadas a su gran rendimiento analítico, los transforma en candidatos adecuados para el análisis de rutina de muestras ambientales.

A nivel personal, considero que el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha contribuido significativamente a un área de la ciencia aún poco explorada y con enorme potencial. Al día de hoy, y luego de varias décadas de desarrollo de las nanociencias, el conocimiento adquirido en investigaciones relacionadas a la implicancia de los NM en el ambiente está todavía lejos de ser suficiente como para crear un modelo detallado del comportamiento y el destino de este tipo de materiales luego de su emisión. Desde el área de la química analítica, se contribuyó principalmente mediante la validación de métodos de detección más simples que los mayormente distribuidos (ICP-MS), pero con alcances similares.

Todos los resultados presentados sientan las bases para posteriores desarrollos, principalmente enfocados en el estudio analítico de sistemas nanoparticulados que simulen las transformaciones que los NM experimentan una vez que ingresan al ambiente, y que afectan su detección. Incluso, de la mano de los métodos quimiométricos, es posible ampliar el enfoque analítico y extenderlo hacia estudios de monitoreo ambiental, centrados en sistemas de clasificación de acuerdo al estadio del ciclo de vida del nanomaterial o en la discriminación del origen de estos contaminantes emergentes, entre otras.

Anexo A

ANOVA en diseño de experimentos¹

A.1. Introducción

En análisis de regresión lineal simple y análisis de regresión lineal múltiple, se presentan métodos para modelar la relación entre una respuesta y diferentes factores asociados (llamados predictores en regresión) basados en el conjunto de datos experimentales observados. Sin embargo, en este tipo de estudios observacionales, resulta difícil establecer relaciones de causa-efecto entre factores y respuestas, ya que numerosas justificaciones alternativas pueden utilizarse para explicar los cambios observados en los valores de las respuestas. Para lograr establecer estas relaciones causa-efecto es necesario llevar a cabo *experimentos* especialmente diseñados. En los experimentos la respuesta es investigada al estudiar únicamente el efecto del factor (o factores) de interés, excluyendo todos los otros efectos que pueden proveer justificaciones alternativas a los cambios observados en la respuesta. Esto se hace en dos formas. En primer lugar, los niveles de los factores deben seleccionarse cuidadosamente y deben ser estrictamente controlados durante la ejecución del experimento. Seleccionar los niveles de los factores para un determinado experimento es lo que se llama *diseño* del experimento. En segundo lugar, los experimentos deben realizarse de forma aleatoria, para que los efectos de los factores no evaluados se cancelen entre sí de modo que los cambios observados en respuestas sólo correspondan a los factores estudiados. El registro de las observaciones experimentales de forma aleatoria es denominado *aleatorización*. Éste es el proceso de asignación de los diversos niveles de los factores investigados a las unidades experimentales en un modo aleatorio. Un experimento está totalmente aleatorizado si la probabilidad de que una unidad experimental esté sujeta a cualquier nivel de un factor es igual para todas las unidades experimentales.

A.2. Análisis de experimentos de un único factor

El análisis de estudios experimentales involucra el uso de modelos de análisis de la varianza (ANOVA). En experimentos de un solo factor, los modelos ANOVA son utilizados para comparar los valores de la respuesta media a diferentes niveles del factor. Cada nivel del factor es investigado para ver si la respuesta es significativamente diferente a la respuesta de los otros niveles del factor.

De forma general, el modelo de ANOVA en experimentos de un factor puede expresarse como:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. A.1.}$$

El modelo de ANOVA asume que la respuesta para cada nivel del factor, i , es la suma de las respuestas medias del i -ésimo nivel, μ_i , y un término de error aleatorio ε_{ij} . El subíndice i denota el factor del nivel, mientras que j representa al replicado. El término de error aleatorio se asume de distribución normal e independiente con una media igual a cero y una varianza σ^2 . La ecuación A.1. se denomina *modelo de las medias*. El modelo de ANOVA también puede escribirse considerando los efectos de los i tratamientos, τ_i . La ecuación A.2. muestra lo que se denomina *modelo de los efectos*, donde μ representa la media global.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. A.2.}$$

En el modelo de los efectos, los efectos τ_i representan las desviaciones de la media global μ . Por lo tanto, existe la condición de que la sumatoria de los efectos de los i tratamientos debe ser siempre igual a cero.

A.2.1. Ajuste de los modelos de ANOVA

El ajuste de los modelos de ANOVA para un factor puede visualizarse mediante un ejemplo. Si consideramos un experimento de un factor y tres niveles, existen tres tratamientos que pueden incorporarse al modelo de los efectos presentado en la Ec. A.2. Para el primer tratamiento (primer nivel), el modelo puede escribirse de la

siguiente manera:

$$y_{1j} = \mu + \tau_1 + 0 \times \tau_2 + 0 \times \tau_3 + \varepsilon_{1j} \quad \text{Ec. A.3.}$$

Como existe la condición $\tau_1 + \tau_2 + \tau_3 = 0$, entonces $\tau_3 = -(\tau_1 + \tau_2)$, y el modelo resulta:

$$y_{1j} = \mu + \tau_1 + 0 \times \tau_2 - 0 \times (\tau_1 + \tau_2) + \varepsilon_{1j} \quad \text{Ec. A.4.}$$

$$y_{1j} = \mu + \tau_1 + 0 \times \tau_2 + \varepsilon_{1j}$$

Los modelos para el segundo y tercer tratamiento se pueden obtener de forma similar, y resultan iguales a:

$$\begin{aligned} \text{Primer tratamiento: } y_{1j} &= 1 \times \mu + 1 \times \tau_1 + 0 \times \tau_2 + \varepsilon_{1j} \\ \text{Segundo tratamiento: } y_{2j} &= 1 \times \mu + 0 \times \tau_1 + 1 \times \tau_2 + \varepsilon_{2j} \\ \text{Tercer tratamiento: } y_{3j} &= 1 \times \mu - 1 \times \tau_1 - 1 \times \tau_2 + \varepsilon_{3j} \end{aligned} \quad \text{Ec. A.5.}$$

Los coeficientes de los efectos de los tratamientos τ_1 y τ_2 pueden expresarse usando dos indicadores de variable, x_1 y x_2 , de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Efecto tratamiento } \tau_1: \mathbf{X}_1 &= 1; \mathbf{X}_2 = 0 \\ \text{Efecto tratamiento } \tau_2: \mathbf{X}_1 &= 0; \mathbf{X}_2 = 1 \\ \text{Efecto tratamiento } \tau_3: \mathbf{X}_1 &= -1; \mathbf{X}_2 = -1 \end{aligned} \quad \text{Ec. A.6.}$$

y el modelo de ANOVA puede reescribirse como la Ec. A.7., usando los indicadores de variable x_1 y x_2 .

$$y_{ij} = \mu + \mathbf{X}_{i1} \times \tau_1 + \mathbf{X}_{i2} \times \tau_2 + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ec. A.7.}$$

La ecuación A.7. representa la versión de *regresión* del ANOVA para un sistema de un factor y tres niveles. Este modelo de regresión considera que el factor evaluado es cualitativo y de tres niveles, y por lo tanto se necesitan dos variables para representar el factor. Si el factor evaluado resulta cuantitativo en la práctica, solo se necesitaría una única variable de predicción en el modelo de regresión, y este tomaría la forma $y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \varepsilon_{ij}$ en un modelo de primer orden, por ejemplo. A diferencia

de este último modelo de regresión, el modelo de regresión de ANOVA no hace ninguna asunción sobre la naturaleza de la relación entre la respuesta y el factor investigado. Tratar un factor particular como cualitativo o cuantitativo depende de los objetivos del experimento. Si el objetivo es únicamente determinar si cambios en el nivel del factor producen cambios significativos en la respuesta, el factor puede considerarse cualitativo. Si al contrario se desea realizar predicciones o una optimización, el factor debería modelarse de modo cuantitativo para relacionar la respuesta y con las variables x , pudiendo obtenerse los coeficientes μ , β , etc. mediante alguna metodología de regresión.

El modelo planteado puede expandirse al convertir el modelo a notación matricial, de la forma:

$$y = \beta X + \varepsilon \quad \text{Ec. A.8.}$$

donde y es el vector de respuestas, X la matriz de variables de los efectos x_i , β un vector que contiene μ y los τ_i efectos (niveles) analizados y ε es un vector error. Esta notación es de particular importancia para el análisis de diseños de múltiples factores y niveles. Las matrices (o vectores) y , X y β son empleadas para el cálculo de las sumas de cuadrado que se discuten a continuación.

A.2.2. Test de hipótesis en experimentos de un factor

El test de hipótesis en experimentos de un factor examina el modelo de ANOVA para ver si la respuesta a cualquier nivel del factor es significativamente diferente de aquella respuesta obtenida a otros niveles. Si a todos los niveles la respuesta obtenida no es significativamente diferente, entonces se concluye que el factor estudiado no afecta la respuesta. El test del modelo de ANOVA se lleva a cabo comprobando si cualquiera de los efectos del tratamiento τ_i son distintos de cero. Las hipótesis son las siguientes:

$$H_0: \quad \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_i = 0$$

$$H_1: \quad \tau_i \neq 0 \text{ para al menos un } i$$

El test para la hipótesis nula se lleva a cabo evaluando el estadístico F , que se define de acuerdo a la ecuación A.9., donde MS_{TR} representa el cuadrado medio del modelo de ANOVA y MS_E es el error cuadrático medio.

$$F_0 = \frac{MS_{TR}}{MS_E} \quad \text{Ec. A.9.}$$

El valor de MS_{TR} se obtiene al dividir la suma de cuadrados de los tratamientos SS_{TR} por sus grados de libertad $gl(SS_{TR})$. La suma de cuadrados se obtiene al resolver la ecuación A.10., con n_a igual al número de niveles evaluados para el factor, m es el número de replicados a cada nivel, y representa el vector de respuestas, H es la matriz *hat* o “sombrero” que puede obtenerse de la matriz X en Ec. A.7. - de acuerdo a $H=X(X'X)^{-1}X'$ - y que permite transformar los valores del vector respuesta observada a valores del vector respuesta ajustada, y J es una matriz de unos. El número de gl de la suma de cuadrados del tratamiento es igual al número de predictores empleados para el modelo. El supraíndice ' indica la matriz transpuesta.

$$SS_{TR} = y' \left[H - \left(\frac{1}{n_a \times m} \right) J \right] y \quad \text{Ec. A.10.}$$

Por su parte, MS_E se obtiene al dividir la suma de cuadrados del error SS_E por sus correspondientes grados de libertad $gl(SS_E)$. El valor de SS_E a partir de la diferencia entre la SS_{TR} y la suma de cuadrados total (SS_T), con $SS_E=SS_T-SS_{TR}$. De forma análoga, los grados de libertad de SS_E se obtienen por diferencia, siendo $gl(SS_E)=gl(SS_T)-gl(SS_{TR})$. La suma de cuadrados total SS_T , se puede obtener a partir de la ecuación A.11., en la que se reemplaza la matriz H de Ec. A.10. por la matriz identidad I . El número de grados de libertad de SS_T es igual al $n-1$, con n igual al número de observaciones experimentales.

$$SS_T = y' \left[I - \left(\frac{1}{n_a \times m} \right) J \right] y \quad \text{Ec. A.11.}$$

Una vez determinado el estadístico F_0 , es posible calcular la probabilidad de

aceptación o no de la hipótesis nula, a partir del p-valor (Ec.A.12.), con F obtenido a partir de una distribución de Fischer con los correspondientes grados de libertad del sistema estudiado.

$$p\text{-valor} = 1 - P(F \leq F_0) \quad \text{Ec. A.12.}$$

Cuando el p-valor obtenido es menor que el nivel de significancia deseado, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el nivel del factor evaluado tiene un efecto significativo sobre la respuesta.

A.2.3. Análisis de los residuales

Para asegurarse de que los supuestos de ANOVA no se violan, siempre es necesario graficar los residuales del modelo e_{ij} . El modelo ANOVA asume que los términos de error aleatorio ε_{ij} están normal e independientemente distribuidos con la misma varianza para cada tratamiento. La normalidad de los residuales puede confirmarse mediante un gráfico de probabilidad normal de los residuales, esperándose un comportamiento lineal de los residuales alrededor de la recta normal. La igualdad de varianza se comprueba al graficar los residuales contra los tratamientos y las valores ajustados de los tratamientos, \bar{y}_i , inspeccionando como se distribuyen en el espacio los residuales. Si se observan ciertos patrones de los residuales en estos gráficos, entonces es necesario llevar a cabo algún tipo de transformación de la respuesta que asegure la igualdad de las varianzas, como el método de Box-Cox. La independencia de los residuales se puede comprobar al graficar los términos de error residual contra el orden de corrida, asegurando que no exista algún tipo de patrón en estas gráficas.

A.3. Análisis de experimentos con múltiples factores

Los experimentos en los cuáles se evalúan simultáneamente dos o más factores son usuales. La mejor manera de analizar estos experimentos es mediante algún tipo de diseño específico, como los diseños factoriales. Un diseño factorial es aquel en el

cual todas las combinaciones de factores y niveles son estudiadas en cada replicado del experimento. Estos diseños permiten además estudiar completa y sistemáticamente las interacciones entre factores, y no sólo identificar los factores principales significativos.

De forma similar a como se discutió para experimentos de un factor, si se considera un experimento de dos factores, el modelo de ANOVA es el que se presenta en la ecuación A.13., donde y es la respuesta evaluada, μ es el efecto medio global, τ_i es el efecto del nivel i del primer factor, δ_j es el efecto del nivel j del segundo factor, $(\tau\delta)_{ij}$ representa la interacción entre factores, ε_{ijk} es el término de error aleatorio y k es el número de replicados del experimento. En experimentos de más factores, el modelo de ANOVA puede extenderse al incorporar los términos de efectos principales adicionales y los correspondientes términos de interacción entre factores.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_j + (\tau\delta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Ec. A.13.}$$

En este caso, los términos τ_i , δ_j y $(\tau\delta)_{ij}$ representan desviaciones de la media global y, por lo tanto, las sumatorias de cada uno de ellos tienen como condición que deben ser igual a cero. El modelo presentado en la ecuación A.13. también puede expresarse en notación matricial como se mostró para el caso de experimentos de un factor, con la forma general de la Ec. A.8.

A.3.1 Test de hipótesis en diseños factoriales generales

Los test de hipótesis se plantean de forma similar a lo discutido en la sección A.2.2., pero se realizan para cada término del modelo de ANOVA. Para el caso ejemplificado de dos factores, se realizan test de hipótesis para el primer factor, para el segundo factor, y para el término de interacción entre factores, del siguiente modo:

1. $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_i = 0$ (efecto principal 1 está ausente)
 $H_1: \tau_i \neq 0$ para al menos un i
2. $H_0: \delta_1 = \delta_2 = \dots = \delta_j = 0$ (efecto principal 2 está ausente)
 $H_1: \delta_j \neq 0$ para al menos un j
3. $H_0: (\tau\delta)_{11} = (\tau\delta)_{12} = \dots = (\tau\delta)_{ij} = 0$ (interacción está ausente)
 $H_1: (\tau\delta)_{ij} \neq 0$ para al menos un ij

De manera análoga a lo discutido anteriormente, los test de hipótesis se evalúan mediante el estadístico F, para cada uno de los términos evaluados. En las siguientes ecuaciones, MS_1 es el cuadrado medio del primer factor, MS_2 es el cuadrado medio del segundo factor, MS_{12} es el cuadrado medio de la interacción 1-2 y MS_E es el error cuadrático medio.

$$(F_0)_1 = \frac{MS_1}{MS_E} \quad (F_0)_2 = \frac{MS_2}{MS_E} \quad (F_0)_{12} = \frac{MS_{12}}{MS_E} \quad \text{Ecs. A.14.}$$

Los cuadrados medios se obtienen al dividir las sumas de cuadrados de cada efecto por el número de grados de libertad asociado. La suma de cuadrados de cada uno de los anteriores cuadrados medios se calculan a partir de la suma de cuadrados del modelo (SS_{TR}), que se divide en sumas de cuadrados adicionales debidas a cada factor que se van añadiendo de forma secuencial, como se muestra a continuación para el caso de dos factores, donde SS_1 , SS_2 y SS_{12} representan la suma de cuadrados debidas al primer factor, al segundo y al término de interacción, respectivamente:

$$SS_{TR} = SS_1 + SS_2 + SS_{12} \quad \text{Ec. A.15.}$$

La suma de cuadrados del modelo SS_{TR} de dos factores para la versión de regresión del ANOVA puede obtenerse a partir de:

$$SS_{TR} = y' \left[H - \left(\frac{1}{n_a \times n_b \times m} \right) J \right] y \quad \text{Ec. A.16.}$$

con n_a y n_b igual al número de niveles evaluados para cada factor, m es el número de

replicados a cada nivel, y representa el vector de respuestas, H es la matriz *hat* y J es una matriz de unos. Se puede observar que esta ecuación es una versión extendida de la Ec. A.10. para experimentos de un factor. De la misma manera, la suma de cuadrados total SS_T es igual a:

$$SS_T = y' \left[I - \left(\frac{1}{n_a \times n_b \times m} \right) J \right] y \quad \text{Ec. A.17.}$$

y la suma de cuadrados del error resulta $SS_E = SS_T - SS_{TR}$, con $gl(SS_E) = gl(SS_T) - gl(SS_{TR})$. $gl(SS_T)$ es igual al $N-1$, con N igual al número de observaciones, mientras que $gl(SS_{TR})$ es igual al número de predictores o términos de efecto (efectos principales y de interacción) empleados en el diseño.

Para el cálculo de las sumas de cuadrados individuales de los factores evaluados (SS_1 , SS_2 y SS_{12} en Ec. A.15.), es necesario tomar la diferencia entre la suma de cuadrados SS_{TR} después y antes de que cierto efecto haya sido agregado al modelo en la suma secuencial de la Ec. A.15. Así, SS_{12} se obtendría al calcular la diferencia entre la suma secuencial de SS_{TR} que incorpora el efecto de los factores principales 1 y 2 y el término de interacción 1-2, y la suma secuencial de SS_{TR} que no considera el efecto de la interacción. Para el caso de dos factores discutido en esta sección, las sumas de cuadrados se obtienen de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$SS_1 = SS_{TR}(\mu, \tau_i) + SS_{TR}(\mu) \quad \text{Ec. A.18.}$$

$$SS_2 = SS_{TR}(\mu, \tau_i, \delta_i) + SS_{TR}(\mu, \tau_i) \quad \text{Ec. A.19.}$$

$$SS_{12} = SS_{TR}[\mu, \tau_i, \delta_i, (\tau\delta)_{ij}] + SS_{TR}(\mu, \tau_i, \delta_i) \quad \text{Ec. A.20.}$$

Conociendo las sumas de cuadrados de cada efecto evaluado y los grados de libertad asociados, y la suma de cuadrados del error total, es posible calcular los estadísticos F para cada efecto con las ecuaciones A.14. A partir de los F de cada efecto y el F crítico de una distribución de Fischer para los correspondientes grados de libertad, es posible calcular el p-valor del efecto para aceptar o rechazar la hipótesis nula de acuerdo al nivel de significancia deseado. Con p-valores menores a

la significancia α , se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el efecto analizado tiene una influencia significativa sobre la respuesta estudiada. Aquellos efectos con p-valores mayores que α , no afectan la respuesta significativamente.

A.3.2 Cálculo de los coeficientes de los efectos

Los coeficientes del modelo de regresión de ANOVA pueden obtenerse a partir de la ecuación A.20., donde β es la matriz de coeficientes de una ecuación de la forma de Ec. A.7., y es el vector de respuestas y X es la matriz de diseño. El supraíndice -1 indica la matriz inversa. La ecuación A.21. es la usualmente empleada en metodologías de regresión múltiple por cuadrados mínimos.

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1} X'y \quad \text{Ec. A.21.}$$

A.3.3 Análisis de los residuales

Al igual que para experimentos de un factor, en experimentos de múltiples factores también resulta necesario analizar los gráficos de diagnóstico de residuales para comprobar que el modelo sea adecuado para el estudio realizado.

A.4. Tablas ANOVA del diseño BBD del capítulo 3

A continuación, se presentan las tablas de ANOVA del diseño Box-Behnken discutido en el capítulo 3 de la presente tesis para cada respuesta evaluada: A_{\max} , λ_{\max} y FHWM, y los gráficos de diagnóstico correspondientes.

A.4.1. A_{max} Tabla A.1. Análisis de la varianza para el diseño Box-Behnken de la respuesta A_{max} .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.*	Cuadrado medio	F	p
Modelo	0,031	7	$4,48 \times 10^{-3}$	138,05	<0,0001
B [AgNO ₃]	0,012	1	0,012	358,24	<0,0001
C [AG]	$2,67 \times 10^{-3}$	1	$2,67 \times 10^{-3}$	82,09	<0,0001
D Tiempo de reacción	$1,15 \times 10^{-4}$	1	$1,15 \times 10^{-4}$	3,55	0,1016
BC	$4,28 \times 10^{-3}$	1	$4,28 \times 10^{-3}$	131,96	<0,0001
BD	$5,99 \times 10^{-3}$	1	$5,99 \times 10^{-3}$	18,46	0,0036
C ²	$4,67 \times 10^{-3}$	1	$4,67 \times 10^{-3}$	143,90	<0,0001
D ²	$1,18 \times 10^{-3}$	1	$1,18 \times 10^{-3}$	36,45	0,0005
Residuales	$2,27 \times 10^{-4}$	7	$3,25 \times 10^{-5}$		
Falta de ajuste	$1,81 \times 10^{-4}$	3	$6,04 \times 10^{-5}$	5,25	0,0714
Error puro	$4,60 \times 10^{-5}$	4	$1,15 \times 10^{-5}$		
Total	21,80	14			

* Grados de libertad

Se puede observar en la tabla A.1. que resultan significativos (p -valor < 0,05) los términos lineales de [AgNO₃] y [AG], los términos de interacción [AgNO₃] \times [AG] y [AgNO₃] \times Tiempo, y los términos cuadráticos [AG]² y Tiempo². Si bien el término lineal Tiempo no es significativo, este debe incorporarse en el modelo de ajuste para mantener la jerarquía del mismo. El ANOVA muestra significancia del modelo (p -valor < 0,0001), y el p -valor de LOF igual a 0,0714 indica que esta no es significativa en relación al error, por lo que el modelo ajusta bien los datos experimentales.

La figura A.1. muestra los gráficos de diagnóstico para el modelo de ANOVA de A_{max} . Se muestra los gráficos de distribución normal de los residuos, el de Box-Cox de transformación de respuesta, y los gráficos de residuos vs. predichos y predichos vs. experimentales.

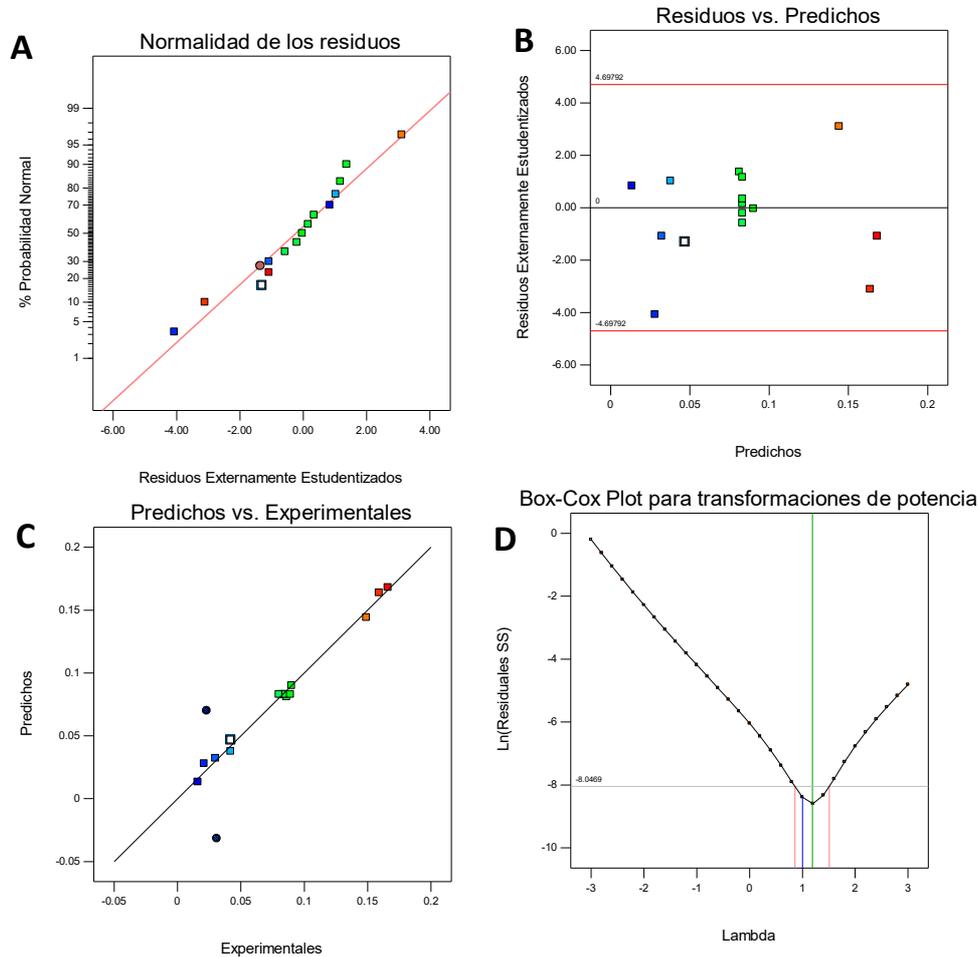


Fig. A.1. Gráficos de diagnóstico del modelo ANOVA del BBD para la respuesta A_{max} . A) Gráfico de probabilidad normal de los residuos. B) Residuos vs. Predichos. C) Predichos vs. Experimentales. D) Transformación Box-Cox.

De acuerdo a lo indicado en la sección A.2.3., los gráficos de diagnóstico indican que existe normalidad de los residuales ya que se posicionan de forma general sobre la recta de probabilidad normal y que no hay un error constante asociado a los experimentos (independencia del error) porque los residuales se distribuyen de forma aleatoria alrededor del cero. Además, se observa una buena correlación entre los predichos respecto a los puntos experimentales, lo que se asocia a una buena capacidad predictiva del modelo de ajuste, y que no es necesaria una transformación de potencia para igualar las varianzas de acuerdo al gráfico de Box-Cox, ya que el λ

del modelo (indicado en línea verde), cae dentro de los límites de transformación indicados por las líneas rojas.

A.4.2. λ_{\max}

Tabla A.2. Análisis de la varianza para el diseño Box-Behnken de la respuesta λ_{\max} .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.*	Cuadrado medio	F	p
Modelo	209,91	2	104,96	62,39	<0,0001
B [AgNO ₃]	201,58	1	201,58	119,82	<0,0001
C [AG]	29,07	1	29,07	17,28	0
Residuales	20,19	12	1,68		
Falta de ajuste	14,89	8	1,86	1,40	0,3936
Error puro	5,3	4	1,32		
Total	230,10	14			

* Grados de libertad

Se puede observar en la tabla A.2. que resultan significativos (p-valor<0,05) únicamente los términos lineales [AgNO₃] y [AG]. Además, el ANOVA muestra que el modelo es significativo (p-valor< 0,0001), mientras que la LOF no lo es (p-valor=0,3936), por lo que el modelo ajusta bien los datos experimentales y se puede aplicar para explicar el comportamiento de la respuesta λ_{\max} .

Los supuestos de ANOVA se comprobaron a partir de las gráficas de diagnóstico correspondientes, igual a las mostradas para la anterior respuesta discutida. Dichos gráficos se muestra en la figura A.2.

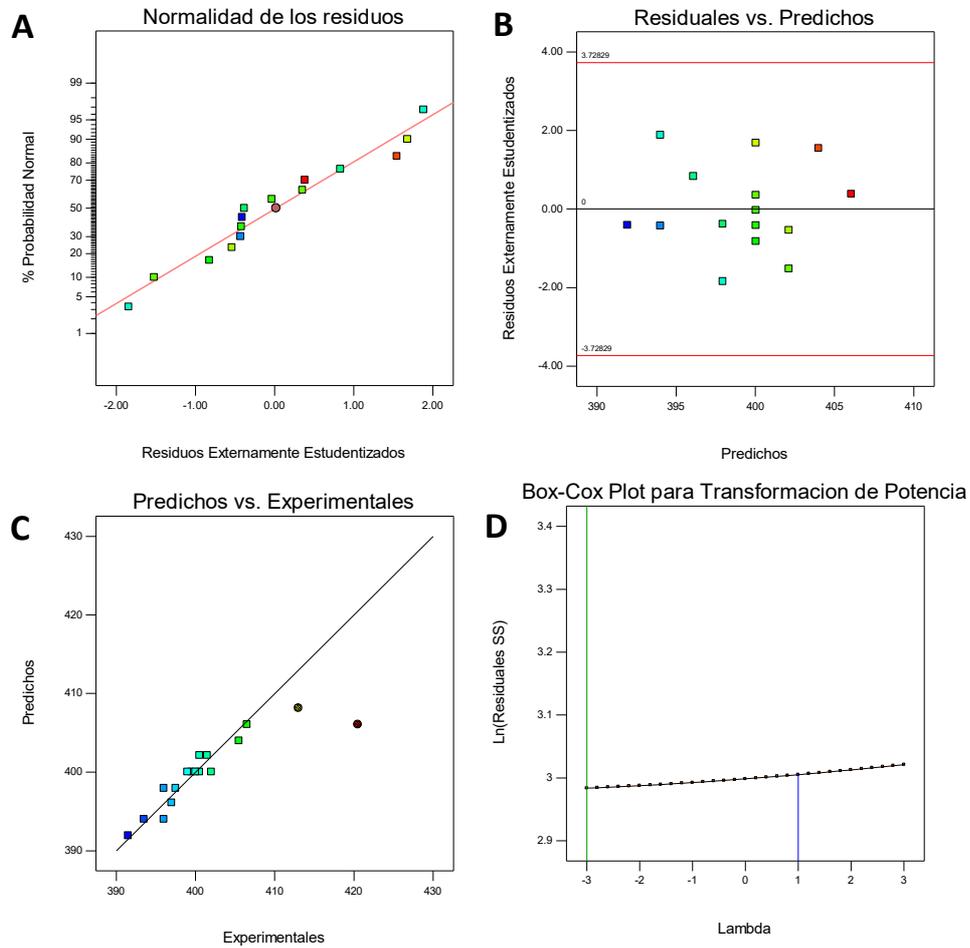


Fig. A.2. Gráficos de diagnóstico del modelo ANOVA del BBD para la respuesta λ_{max} . A) Gráfico de probabilidad normal de los residuos. B) Residuos vs. Predichos. C) Predichos vs. Experimentales. D) Transformación Box-Cox.

A partir de los gráficos de diagnóstico, se pueden arribar a las mismas conclusiones que para el caso de A_{max} , observándose igualdad de varianzas, y distribución normal e independiente de los residuales.

A.4.3. FWHM

Tabla A.3. Análisis de la varianza para el diseño Box-Behnken de la respuesta FWHM.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.*	Cuadrado medio	F	p
Modelo	385,19	7	55,03	28,02	0
B [AgNO ₃]	234,00	1	234,00	119,16	<0,0001
C [AG]	43,80	1	43,8	82,09	<0,0001
D Tiempo de reacción	6,31	1	6,31	3,21	0,1162
BC	56,20	1	56,20	28,62	0
BD	12,23	1	12,23	6,32	0,0413
C ²	35,74	1	35,74	18,20	0,0037
D ²	64,08	1	64,08	32,63	0,0007
Residuales	13,75	7	1,96		
Falta de ajuste	6,05	3	2,02	1,05	0,4632
Error puro	7,7	4	1,93		
Total	398,93	14			

* Grados de libertad

Se puede observar en la tabla A.3. que resultan significativos (p -valor $< 0,05$) los términos lineales de [AgNO₃] y [AG], los términos de interacción [AgNO₃] \times [AG] y [AgNO₃] \times Tiempo, y los términos cuadráticos [AG]² y Tiempo². Si bien el término lineal Tiempo no es significativo, este debe incorporarse en el modelo de ajuste para mantener la jerarquía del mismo. El ANOVA muestra significancia del modelo (p -valor $< 0,0001$), y el p -valor de LOF igual a 0,4632 indica que esta no es significativa, por lo que el modelo es adecuado para los datos experimentales.

Los supuestos de ANOVA se comprobaron a partir de las gráficas de diagnóstico correspondientes (Fig. A.3.).

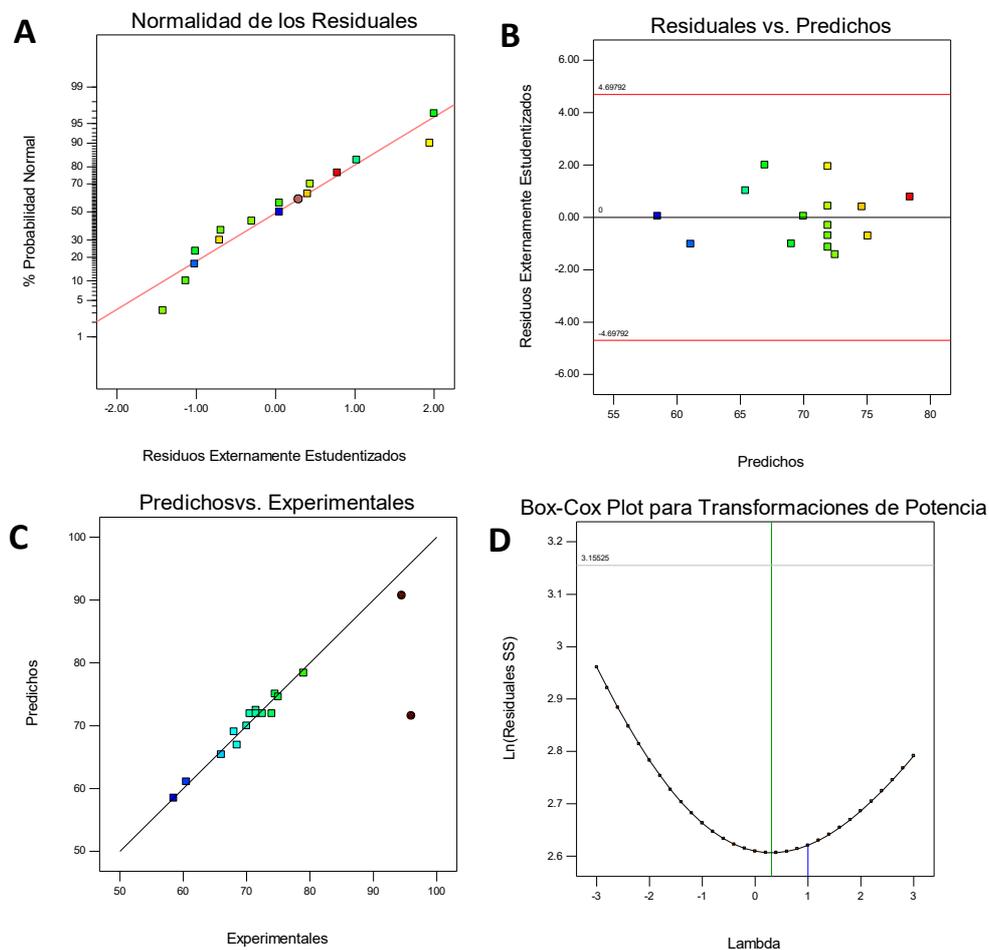


Fig. A.3. Gráficos de diagnóstico del modelo ANOVA del BBD para la respuesta FWHM. A) Gráfico de probabilidad normal de los residuos. B) Residuos vs. Predichos. C) Predichos vs. Experimentales. D) Transformación Box-Cox.

Los gráficos de diagnóstico indican normalidad de los residuales, que no hay un error constante asociado a los experimentos, una buena correlación entre los predichos respecto a los puntos experimentales y que no es necesaria una transformación de potencia.

A.5. Referencias

- (1) Adaptado de *ReliaSoft's Experiment Design and Analysis Reference* de *ReliaSoft Corporation*. Accedido el 20 de febrero de 2022 desde ReliaWiki.org. Disponible bajo una [licencia Creative Commons Atribución/Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Anexo B

Estimación de la concentración de nanopartículas metálicas

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 agente ligando de la superficie. Es posible tener en cuenta la variabilidad de la polidispersidad si uno considera la distribución de tamaños de las nanopartículas. El algoritmo denominado NANoPoLC (Nanoparticle Polidispersity Corrector)¹, fue diseñado para ser usado directamente con datos de dispersión dinámica de luz (DLS), con miles de “eventos” individuales registrados en una sola medida. NANoPoLC también es compatible con mediciones de partículas individuales mediante microscopías electrónicas de transmisión y de barrido (TEM/SEM). Sin embargo, 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 NP de diámetro d de acuerdo a la ecuación B.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 ecuación g . En la ecuación B.1., ($d^- \leq d \leq d^+$), y $d = d^+ - d^-$ es un valor infinitesimalmente pequeño.

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

Es notable, que el termino $g(d)h$ está directamente relacionado con la dispersión de tamaños de la muestra. Se puede demostrar que la concentración total de cualquier sistema de NP dado satisface la ecuación B.2., donde $[S]$ denota la concentración inicial del precursor de la nanopartícula y $F(d)$ es el número total de átomos para un precursos de nanopartículas de diámetro d .

$$[NP] \int F(s)g(s) ds = [S] \quad \text{Ec. B.2.}$$

Para proveer una buena aproximación a la integral anterior, se puede utilizar la suma de *Riemann* como en la ecuación B.3.

$$[S] = [NP] \sum F(d_i)g(d_i)h_i \quad \text{Ec. B.3.}$$

Como $h_i = d_{i+1} - d_i$, la suma en la ecuación anterior se calcula para cada $i=1, \dots, n-1$. Por lo tanto los datos recolectados, $g(di)$, no fueron considerados totalmente en la integral total, sino que falta la contribución de $n-1$ a n . Para resolver esta situación, se utilizó la “regla del trapezoide”, que permite convertir la ecuación B.3. en la ecuación B.4., donde la suma se realiza para cada $i=1, \dots, n$.

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

Finalmente, $[NP]$ se determina utilizando la ecuación siguiente, que es el algoritmo de NANoPoLC.

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

Si se considera una geometría esférica para la población de NP, el algoritmo de NANoPoLC puede ser calculado a partir de $F(d_i)$, sólo conociendo el diámetro d de las esferas. 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 esferas, y se expresa como denota la ecuación B.6., con $V_{NP}(d_i)$ igual al volumen de la nanopartícula de diámetro d , y $V_{\text{átomo}}$ el volumen de un átomo único del precursor.

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

B.1. Referencias

- (1) Lazurko, C.; Ahumada, M.; Valenzuela-Henríquez, F.; Alarcon, E. I. NANoPoLC Algorithm for Correcting Nanoparticle Concentration by Sample Polydispersity. *Nanoscale* **2018**, *10* (7), 3166–3170. <https://doi.org/10.1039/C7NR08672E>.

Anexo C

Conceptos básicos de fluorescencia

C.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 C.1. Los estados electrónicos se denotan como S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 , S_2 , etc. (estados excitados). 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 , 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

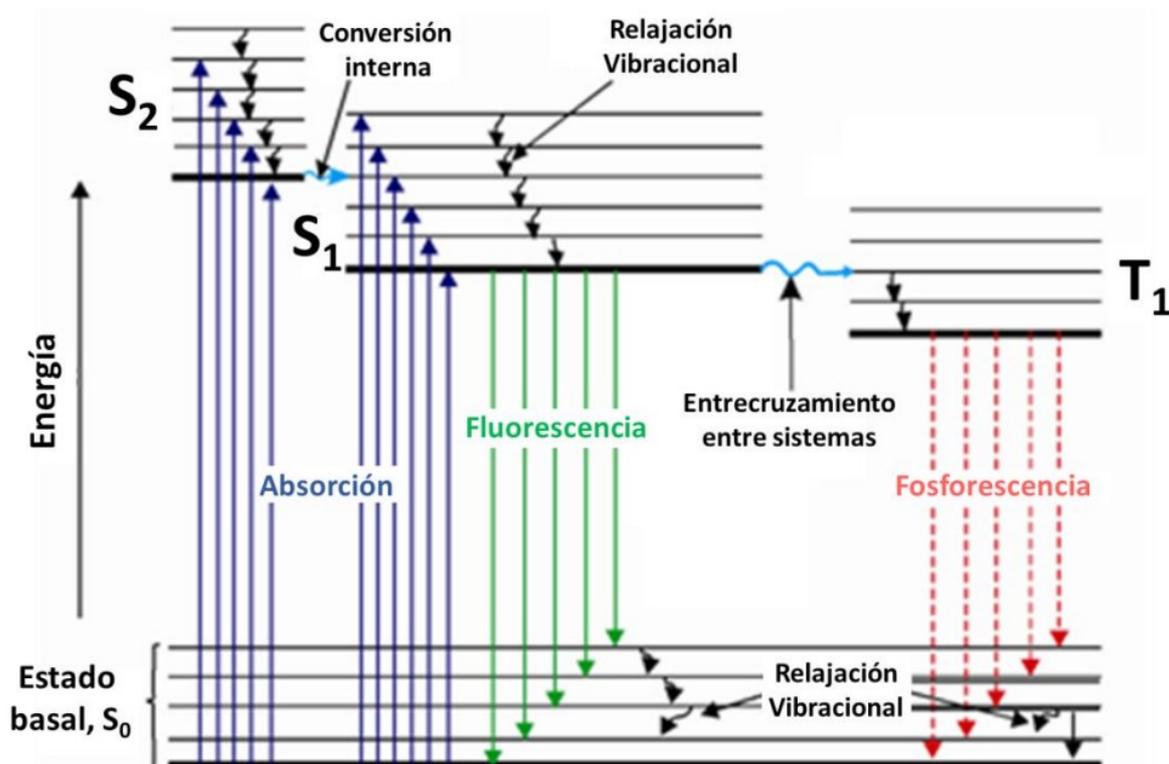


Figura C.1. Diagrama de Perrin-Jablonski.

C.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 C.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.²

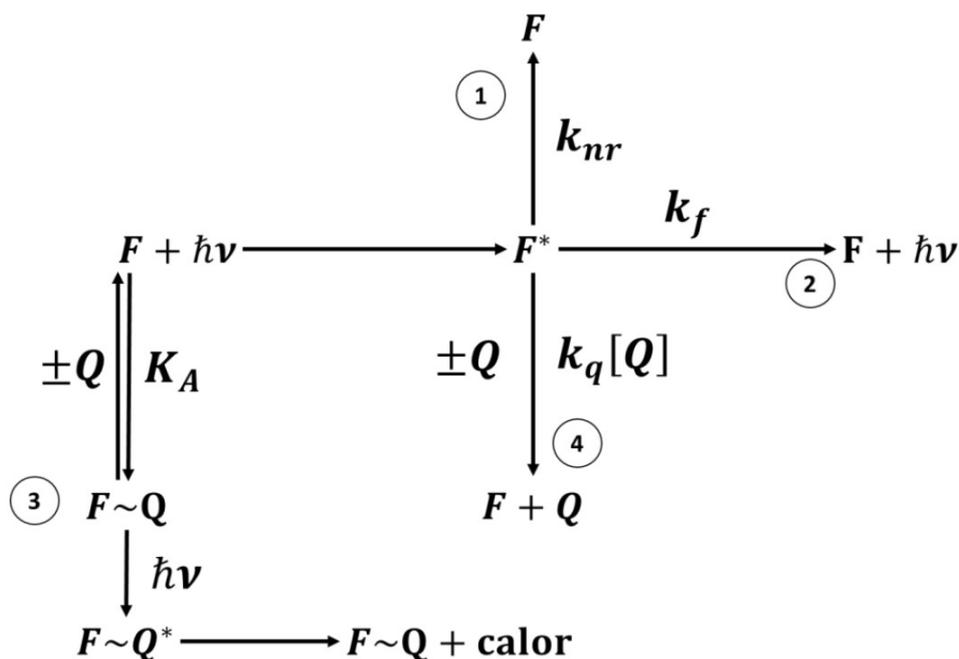


Figura C.2. Representación esquemática de los posibles mecanismos de desactivación de la emisión de fluorescencia de un fluoróforo F . Mecanismos de desactivación intrínsecos de F^* : **1**, desactivación no radiativa gobernada por la constante de velocidad k_{nr} ; **2**, emisión de fluorescencia dependiente 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 . $\hbar\nu$, constante de Planck. K_A , constante de asociación.

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 C.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 C.2.).

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 C.1., donde $[F-Q]$ es la concentración del complejo, $[F]$ es la concentración del fluoróforo no complejado 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 complejado: $f=F/F_0$.

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

Si la concentración total de fluoróforo esta dada por $[F_0] = [F] + [F-Q]$, entonces se puede obtener la ecuación C.2. Al sustituir $[F-Q]$ en la ecuación C.1.

$$K_A = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad \text{Ec. C.2.}$$

Al sustituir las concentraciones de fluoróforo por las intensidades de fluorescencia, la ecuación C.2. puede reescribirse como la ecuación C.3.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_A [Q] \quad \text{Ec. C.3.}$$

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 mencionados en la figura C.2., k_{nr} , k_f , k_q . En este sentido, la variable

Conceptos básicos de fluorescencia

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 el 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 ecuación C.4.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Ec. C.4.}$$

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 la ecuación C.5., donde K_{SV} es la constante de Stern-Volmer.² Por lo tanto, si el quenching es estático se cumple que $K_A = K_{SV}$ y las ecuaciones C.3. y C.5. son equivalentes; pero si es dinámico, $K_{SV} = k_q \tau_0$. Si ambos mecanismos ocurren simultáneamente, se obtienen desviaciones de la linealidad.²

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Ec. C.5.}$$

C.3. Referencias

(1) Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*; McGraw-Hill: Boston, 2000.

- (2) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (3) Fraiji, L. K.; Hayes, D. M.; Werner, T. C. Static and Dynamic Fluorescence Quenching Experiments for the Physical Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.* **1992**, 69 (5), 424. <https://doi.org/10.1021/ed069p424>.

Anexo D

Conceptos básicos de calibración univariada

D.1. Parámetros analíticos

A continuación se definen brevemente las cifras de mérito analíticas necesarias para la validación de métodos.¹

- El intervalo dinámico es aquel en donde las concentraciones del analito se encuentran entre la menor cantidad detectable y la concentración a la cual se pierde la relación entre respuesta analítica medida y concentración de analito (Fig. D.1.). Este intervalo puede ser lineal o no lineal,² aunque es aconsejable para el trabajo cuantitativo realizar las determinaciones dentro del intervalo lineal de respuestas. Se denomina intervalo dinámico lineal al intervalo de concentraciones donde la respuesta analítica y la concentración de analito responden a una función lineal.

- La sensibilidad corresponde a la variación de la respuesta instrumental por unidad de concentración de analito. Por lo tanto, este parámetro es igual a la pendiente de la recta de regresión de un gráfico de señal medida en función de concentración de analito.³

- El LOD define la mínima cantidad de analito que genera una señal significativamente diferente a la señal del blanco.^{2,4}

- El LOQ indica la mínima cantidad de analito que es cuantificable con una desviación estándar relativa de predicción del 10 % como máximo.^{2,4}

- La precisión de los resultados analíticos describe la magnitud de los errores aleatorios del método analítico. En términos estadísticos, mide la dispersión de los valores respecto de la media.⁴

- La exactitud se refiere al grado de concordancia entre el valor individual o promedio determinado mediante la aplicación del método analítico y el valor verdadero o

de referencia presente en la muestra. Los errores sistemáticos y aleatorios pueden afectar la exactitud de un método.⁵

- La selectividad establece en que medida la señal correspondiente al analito de interés es afectada por la presencia de otras especies que actúan como *interferentes* en la muestra.²

- La robustez define en que medida los resultados se reproducen cuando se realizan pequeñas modificaciones en las condiciones experimentales del método propuesto a fin de evaluar la fiabilidad del método durante su uso normal.¹

- La recuperación, expresada como porcentaje, es una medida de la eficiencia del método analítico para recuperar y medir el analito adicionado en una matriz.⁶

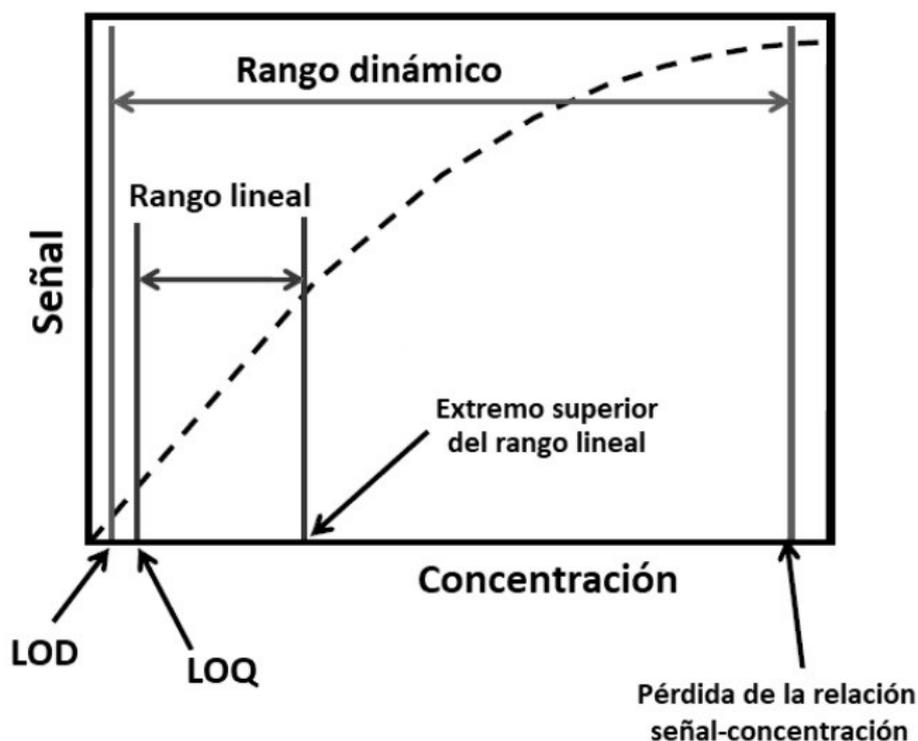


Fig. D.1. Representación del rango dinámico, rango lineal, LOD y LOQ en una curva de calibración.

En las próximas secciones, se profundizará sobre los parámetros anteriormente mencionados y los modelos estadísticos que se requieren para el tratamiento de los

datos experimentales durante la validación de un método analítico.

D.1.1. Calibración y linealidad

La calibración es el procedimiento mediante el cual se determina la expresión matemática que relaciona la respuesta o señal analítica (y) con la concentración o cantidad de analito en la muestra (x) (Ec. D.1.).^{1,2}

$$y = f(x) + e_y \quad \text{Ec. D.1.}$$

En la ecuación C.1., $f(x)$ representa la función de calibración y e_y corresponde al error de predicción del modelo de calibración, es decir, a la diferencia entre el resultado experimental observado y el predicho por el modelo. El error e_y es una variable aleatoria que presenta una distribución normal con media y desviación estándar iguales a cero.^{1,7} La naturaleza de la función de calibración $f(x)$ dependerá de como se encuentran relacionadas las variables x e y . Si esta relación resulta lineal, entonces la función de calibración se expresa según la ecuación D.2. y el gráfico correspondiente se denomina *curva de calibración*.⁷

$$f(x) = mx + b \quad \text{Ec. D.2.}$$

La ordenada al origen (b) corresponde a la señal analítica del blanco de calibración, mientras que la pendiente (m) representa la sensibilidad. Estos parámetros se estiman a partir de n pares de medidas experimentales (x_i, y_i) empleando un modelo de regresión adecuado. El método más comúnmente utilizado para estimar los coeficientes de regresión lineal es el método de cuadrados mínimos.^{7,8}

Para que el modelo de regresión sea válido se deben cumplir con ciertas condiciones o supuestos:⁷

- Los errores aleatorios e_y son despreciables en x y predominantes en y .
- La relación entre x e y es lineal en el intervalo evaluado.
- Los residuos son homocedásticos (varianza constante a lo largo de las observaciones).

- La distribución de los residuales es normal con una media igual a cero.

Una vez comprobados los supuestos del modelo de regresión lineal, debe efectuarse un análisis de la varianza (ANOVA) a fin de evaluar las fuentes de error que afectan a la variable dependiente y y el grado de variación observada que puede explicarse mediante el modelo estadístico.⁹ En un modelo de regresión, las fuentes de error pueden ser de dos tipos: aquel error que puede ser explicado por el modelo y que corresponde a la regresión, y aquel que no puede ser explicado por el modelo y se considera error aleatorio (residuos). En términos generales, un mejor ajuste de regresión será aquel en el cual la contribución de los residuos al error total observado para el modelo de regresión sea mínima. A partir de los resultados de una tabla de ANOVA para la regresión, es posible derivar un test de hipótesis para $H_0: m=0$, (m =pendiente de la curva de calibración). Como candidato para probar la hipótesis nula planteada, se debe considerar el estadístico F , que se define como el cociente entre el cuadrado medio del error de regresión (MS_R) y el cuadrado medio del error de los residuos (MS_E). Bajo los supuestos del modelo lineal, y cuando H_0 es verdadera, F tiene una distribución de Fischer con 1 grado de libertad en el numerador y $n-2$ grados de libertad en el denominador. Así, para un test de hipótesis con un nivel α de significancia $H_0: m=0; H_1: m \neq 0$, la hipótesis nula será rechazada si el valor del estadístico F_{obs} cumple con $F_{obs} > F_{1, n-2, 1-\alpha}$, o bien cuando su p -valor sea menor a α , con $p\text{-valor} = P(F(1, n-2) > F_{obs})$. Cuando la hipótesis nula es rechazada, se puede afirmar que existe una relación lineal entre la variable predictora x y la variable de respuesta y .⁹

Resulta más interesante el test de falta de ajuste (LOF), que permite decidir si un supuesto modelo lineal es compatible con los datos experimentales, o si estos últimos están sesgados.⁹ La única información disponible sobre la discrepancia entre el modelo lineal y los resultados experimentales está provista por los residuales del ajuste $y_i - \hat{y}_i$, a partir de los cuales se obtiene la suma de errores cuadrados (SS_E).⁹ Los residuales de cualquier ajuste pueden descomponerse en dos términos, uno igual a la suma de variables aleatorias q_i , y el otro es el sesgo B_i .⁹ Si el modelo es correcto, $B_i=0$,

y en caso contrario, $B_i \neq 0$ y su valor depende de la variable independiente, por lo que el modelo lineal no es apropiado. Usualmente, para inferir si un determinado ajuste tiene sesgo (o LOF), durante la calibración se obtienen replicados de cada muestra de concentración x_i para obtener una estimación de la varianza (σ^2). Esta estimación representa el error puro, porque si x_i es el mismo para varias mediciones, entonces la variabilidad entre las respuestas observadas es debido a fluctuaciones aleatorias de las medidas. A partir de y_{ij} señales registradas de cada muestra de calibración x_i , se puede construir la suma de cuadrados media del error puro MS_{PE} ,⁹ que considera la variabilidad interna de las observaciones replicadas. Se puede demostrar también,⁹ que la suma del error cuadrado SS_E tiene dos contribuciones, la suma del error puro cuadrado (SS_{PE}) y un término denominado suma de error cuadrado de la falta de ajuste (SS_{LOF}), que es una suma ponderada de las diferencias al cuadrado entre las respuestas medias \bar{x}_i a cada nivel x_i y los correspondientes valores ajustados \hat{y}_i . A partir de la media de los cuadrados del error puro (MS_{PE}) con $N-k$ grados de libertad y la media de cuadrados de LOF (MS_{LOF}) con $k-2$ grados de libertad (con k igual al número de concentraciones de calibrado y N el número total de muestras analizadas), se puede calcular un nuevo estadístico $F_{calc} = MS_{LOF}/MS_{PE}$. Si F_{calc} es mayor que $F_{\alpha, k-2, N-k}$, la hipótesis nula (H_0 : la calibración tiene LOF), se rechaza al nivel de significancia α y se concluye que el modelo lineal propuesto está sesgado y no es apropiado. Alternativamente, si F_{calc} no excede $F_{\alpha, k-2, N-k}$, entonces no hay evidencia suficiente para indicar que la calibración tiene LOF.⁹

D.1.2. Límite de detección y límite de cuantificación

La Unión Intenacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define el LOD como la menor concentración de analito que puede ser detectada a un grado de confianza específico para un determinado proceso analítico.¹⁰

La detectabilidad analítica requiere de dos parámetros: el límite crítico (L_C) sobre el cual se puede afirmar que el analito está presente en la muestra, pero sin evidencia suficiente; y el LOD, sobre el cual se afirma que el analito estudiado está presente en la muestra con un determinado nivel de confianza. Así, definir el LOD requiere

distinguir tres regiones de concentración diferentes, aquellas menores al L_C , aquellas mayores al LOD, y aquellas concentraciones que se encuentran entre el L_C y el LOD.¹¹

El valor de L_C se define de acuerdo a la ecuación D.3., donde $z_{1-\alpha}$ es el valor de la distribución normal de una cola para un nivel de significancia α y σ_0 corresponde a la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito no está presente en la muestra.

$$L_C = z_{1-\alpha} \sigma_0 \quad \text{Ec. D.3.}$$

L_C se define para marcar un valor mínimo a partir del cual una concentración predicha se considera causada por el analito. De este modo, existe una probabilidad α de cometer un error tipo I (o falso positivo), que implica aceptar erróneamente la presencia del analito en la muestra cuando en realidad está ausente. Por otro lado, también existe una probabilidad β de cometer un error tipo II (o falso negativo), al afirmar que el analito está ausente en la muestra cuando en realidad está presente. La probabilidad de cometer errores tipo I se visualiza en la región sombreada azul en la figura D.2., mientras que la de cometer errores tipo II está representada por la región roja. Considerando ambas probabilidades de error, el LOD se define por la ecuación D.4., donde $z_{1-\beta}$ es el valor de distribución normal de una cola para un nivel de significancia β y σ_D es la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito está presente en la muestra.

$$\text{LOD} = z_{1-\alpha} \sigma_0 + z_{1-\beta} \sigma_D \quad \text{Ec. D.4.}$$

Si las varianzas se desconocen y deben estimarse a partir de replicados, entonces los valores de σ_0 y σ_D en Ec. D.3. y D.4. deben reemplazarse por sus correspondientes estimaciones, s_0 y s_D respectivamente. De la misma forma, los valores de z , basados en distribuciones normales, deben ser reemplazados por los correspondientes valores t de una distribución t-Student con v grados de libertad. En general, se sugiere que las probabilidades α y β se asignen iguales a 0,05. De este modo, las expresiones de L_C y LOD (asumiendo varianza constante entre $c=0$ y $c=\text{LOD}$) resultan:^{11,12}

$$L_C = t_{0,05;v} S_0 \quad \text{Ec. D.5.}$$

$$\text{LOD} \approx 2 t_{0,05;v} S_0 \quad \text{Ec. D.6.}$$

En la ecuación D.6. S_0 es la desviación de la concentración de los blancos, y es una aproximación que tiende al valor verdadero de LOD a medida que el número de grados de libertad aumenta. Para valores grandes de v , $2t_{0,05;v}$ es aproximadamente igual a 3,3.

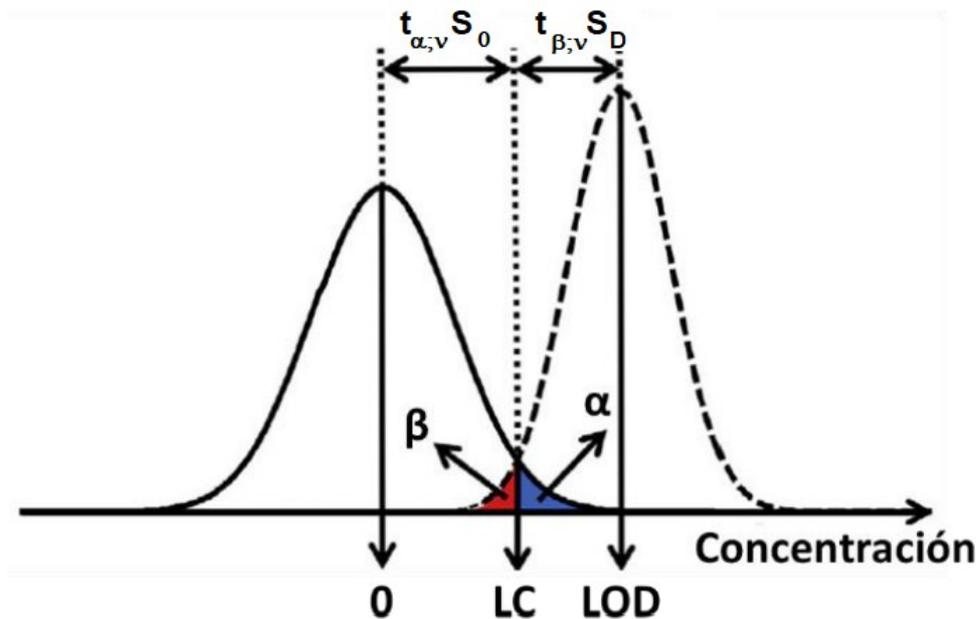


Fig. D.2. Representación gráfica de la estimación del límite de detección. Las distribuciones normales representan el nivel de concentración cero (blanco) y el nivel de concentración al LOD del método. El área azul representa la probabilidad de cometer errores tipo I en la determinación del LOD, mientras que el área roja la probabilidad de cometer errores tipo II.

Actualmente, en función de la ecuación D.6., la IUPAC recomienda determinar el LOD empleando la siguiente ecuación:^{11,12}

$$\text{LOD} = 2 t_{0,05;v} S_0 = \frac{3,3 s_x}{\text{SEN}} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad \text{Ec. D.7.}$$

En la ecuación D.7. la desviación de la concentración del blanco (s_o) es reemplazada por la desviación estándar de los residuales de la regresión (s_x), h_o corresponde a un parámetro de efecto palanca que se calcula de acuerdo a la ecuación D.8., I representa el número de muestras de calibración y SEN corresponde a la pendiente de regresión del modelo lineal.

$$h_0 = \frac{\bar{c}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c}_{cal})^2} \quad \text{Ec. D.8.}$$

En la ecuación D.8. \bar{c}_{cal} es el promedio de las concentraciones de calibración y c_i corresponde a cada valor de concentración de calibración.

Por otro lado, el LOQ se define como la concentración de analito en la cual el error predictivo relativo es del 10 % como máximo. Esto implica que la concentración de analito resulte 10 veces la incertidumbre de predicción. Así, la determinación del LOQ se calcula empleando la ecuación D.9.^{11,12}

$$\text{LOQ} = \frac{10 s_x}{\text{SEN}} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad \text{Ec. D.9.}$$

D.1.3. Precisión

La precisión del método analítico, aplicado en determinadas condiciones experimentales, se valida comparando la varianza de los resultados con la varianza de referencia, que es la esperada o requerida para el método aplicado en condiciones similares.⁸ En general, la precisión expresa la cercanía de coincidencia entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Se distinguen tres diferentes niveles de precisión de acuerdo a las condiciones evaluadas durante la validación: la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad.¹³ Por un lado, evaluar la repetibilidad implica determinar la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, y en el mismo instrumento o equipo. Un parámetro estadístico útil a la hora de evaluar la

repetibilidad es el coeficiente de variación porcentual CV (Ec. D.10.), que informa sobre la dispersión relativa de un conjunto de datos. En la ecuación D.10. s_x representa la desviación estándar de replicados de la muestra analizada y \bar{x} la media de la población.

$$CV \% = 100 \frac{S_x}{\bar{X}} \quad \text{Ec. D.10.}$$

La precisión intermedia corresponde a la precisión obtenida dentro del mismo laboratorio, pero realizando las determinaciones analíticas en diferentes días, y por diferentes analistas o en diferentes equipos. Finalmente, la reproducibilidad se refiere a la precisión obtenida en ensayos independientes realizados por diferentes analistas en diferentes laboratorios aplicando el mismo método analítico sobre la misma muestra, con diferentes equipos, reactivos y condiciones ambientales, en un intervalo de tiempo prolongado. Tanto la precisión intermedia como la reproducibilidad pueden evaluarse mediante ensayos de comparación de medias a través del estadístico t-Student, analizando si las medias experimentales obtenidas tras el análisis en las diferentes condiciones experimentales, según corresponda, son significativamente iguales ($H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \dots = \bar{x}_i$) o si al menos una de las determinaciones difiere del resto (H_1).⁸

D.1.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico se refiere a la igualdad entre las medias de dos o más series de medidas y el valor de concentración verdadero de analito en una determinada muestra. Existen diferentes métodos para el estudio de la exactitud, entre los que se encuentran la verificación con materiales de referencia certificados (MRC), los ensayos de recuperación sobre matrices o muestras reales, la comparación de los resultados del método propuesto con un método de análisis de referencia y la comparación entre ensayos de colaboración interlaboratorio.¹⁴

Si la exactitud se evalúa comparando el valor determinado con el método analítico propuesto con los valores nominales adicionados a una muestra fortificada, la

exactitud puede evaluarse mediante comparación de medias con el valor nominal a cada nivel de concentración evaluado, a través del parámetro estadístico t-Student. En este caso, $H_0: \bar{x}=a$, y $H_1: \bar{x}\neq a$, con a igual a la concentración nominal del analito en cada muestra preparada.^{4,8}

D.1.5. Selectividad e interferencia

La selectividad indica hasta qué punto el método propuesto es capaz de detectar el analito inequívocamente de otros componentes presentes en la muestra. Aquellas especies que puedan llegar a interferir con la señal analítica del sustrato en estudio se le llaman interferentes. Teniendo en cuenta la presencia de interferentes, los métodos analíticos pueden clasificarse según su selectividad de la siguiente manera:²

- Método Universal: presenta sensibilidades comparables para un gran número de analitos con propiedades muy diversas.
- Método Selectivo: cuando la sensibilidad es alta para un determinado grupo de especies químicas.
- Método Específico: es sensible a una sola especie química.

D.2. Referencias

- (1) Danzer, K.; Currie, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70* (4), 993–1014. <https://doi.org/10.1351/pac199870040993>.
- (2) Gustavo González, A.; Ángeles Herrador, M. A Practical Guide to Analytical Method Validation, Including Measurement Uncertainty and Accuracy Profiles. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26* (3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.
- (3) Booksh, K. S.; Kowalski, B. R. Theory of Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (15), 782A-791A. <https://doi.org/10.1021/ac00087a001>.
- (4) Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant, T. J. D. *Practical Statistics for the Analytical Scientist*; 2009. <https://doi.org/10.1039/9781847559555>.
- (5) Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (9), 305A-309A. <https://doi.org/10.1021/ac961912f>.
- (6) Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A. Use of the Terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in Analytical Procedures: (IUPAC Recommendations 2002). <https://doi.org/10.1515/iupac.74.0103>.

- (7) Calibration in Analytical Chemistry. In *Analytical Chemistry: Theoretical and Metrological Fundamentals*; Danzer, K., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 123–175. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35990-6_6.
- (8) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; Pearson Educación, 2002.
- (9) Ortiz, M. C.; Sánchez, M. S.; Sarabia, L. Quality of Analytical Measurements: Univariate Regression; 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00091-0>.
- (10) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. 2009.
- (11) Allegrini, F.; Olivieri, A. C. 2.20 - Figures of Merit. In *Comprehensive Chemometrics (Second Edition)*; Brown, S., Tauler, R., Walczak, B., Eds.; Elsevier: Oxford, 2020; pp 441–463. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14612-8>.
- (12) Olivieri, A. C. Practical Guidelines for Reporting Results in Single- and Multi-Component Analytical Calibration: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *868*, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.017>.
- (13) Meier, P. C.; Zünd, R. E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, 2005.
- (14) González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-Laboratory Testing of Method Accuracy from Recovery Assays. *Talanta* **1999**, *48* (3), 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00271-9).

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

- “Improving reproducibility between batches of silver nanoparticles using an experimental design approach.” **Rodrigo N. Núñez**, Alicia V. Veglia, Natalia L. Pacioni. *Microchemical Journal* 141 (2018) 110–117.
- “MultiShapeC, an algorithm to assess concentration in multi-shape nanoparticle samples: Nanosilver, a case study.” **Rodrigo N. Núñez**, Alicia V. Veglia, Natalia L. Pacioni. En redacción, 2021.
- “Carbazole as a sensor for silver and gold nanoparticles in spiked drinking and river water.” **Rodrigo N. Núñez**, Alicia V. Veglia, Natalia L. Pacioni. En redacción, 2021.
- “Application of U-PLS/RBL for the quantification of silver and gold nanoparticles in mixtures without previous separation.” **Rodrigo N. Núñez**, Alicia V. Veglia, Natalia L. Pacioni. En redacción, 2021.

Otras publicaciones:

- “Synthesis and characterization of nanomaterials for biomedical applications.” Natalia L. Pacioni, M. Andrea Molina Torres, **Rodrigo N. Núñez**, en *Nanoengineering Materials for Biomedical Uses*. Emilio I. Alarcón y Manuel Ahumada eds. Cap. 2, pp 13-34 (2019) ISBN: 978-3-030-31261-9; Springer Nature Switzerland AG, Suiza.
- “Voltammetric quantification of 4-nitrophenol using a multivariate optimized plated bismuth film electrode.” Rodrigo N. Núñez, Jessica Moreno Betancourth, Patricia I. Ortiz, Valeria Pfaffen. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 58, 27 (2019) 12411-12418.