



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

***“Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas obtenidas a partir de miel. Análisis químico computacional”***

**Bioquímico Alejandro González Fá**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2017**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de doctor en química de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del departamento de química durante el período comprendido entre el 28/5/2013 y el 11/12/2017, bajo la dirección de los Profesores, Dra. María Susana Di Nezio, Profesora Adjunta del Departamento de Química y la co-dirección del Dr. Alfredo Juan, Investigador Superior del CONICET y Profesor Titular del Departamento de Física.

Bioqco. Alejandro J. González Fá.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaria General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ..... , mereciendo la calificación de ..... (.....).

*“Sólo una diversidad de puntos  
de vista ayuda a impedir el  
autoengaño; sólo la capacidad  
crítica puede derrotar al error”*

*David Brin. El triunfo de la  
Fundación*

A mis padres, por su apoyo y  
confianza incondicional en todas  
mis decisiones

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud a la Comisión de Investigaciones científicas (CIC), Agencia y CONICET y SGCYT UNS por los fondos FONCYT PICT 2014 1351 y PICT-2016-4094 CONICET PIP 2014-11220130100436CO, PGI: 24/Q049 y PGI: 24/Q059, PGI 24/Q077 y al Grupo Montevideo, por su financiamiento y apoyo económico.

Por otra parte, muchas personas hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

En primer lugar, a mi directora, la Dra. María Susana Di Nezio por abrirme las puertas del grupo de trabajo y ayudarme a dar los primeros pasos en la investigación científica.

A Mi codirector, el Dr. Alfredo Juan, por dedicarme su tiempo, generosidad, valiosa experiencia y consejos en todo momento, brindándome su ayuda incondicionalmente.

Al Dr. Ignacio López Corral, por trabajar codo a codo conmigo, con amabilidad y optimismo, siempre dispuesto a darme una mano en cualquier circunstancia.

Al Dr. Ricardo Faccio, por brindarme su gran hospitalidad y preciado tiempo, enseñándome muchísimo; haciéndome sentir, junto con su grupo de trabajo en Uruguay, como en mi casa.

A la Dra. Valeria Springer, que, con su característica humildad y buena predisposición, trabajó a mi lado, y de quien aprendí mucho.

A la Dra. María Eugenia Centurión y el Dr. Marcelo Pistonesi, siempre atentos a cualquier necesidad o problema que se presentara.

A la Cooperativa de Trabajo Pampero, por su ayuda y asesoramiento.

A mis amigos Diego, Pablo y Sofi, por estar siempre. A la Dra. Marisa Frechero, el Lic. Fernando Pignanelli, a Moni, Eliana, Cali, Javi, Manu, Nico, Gime, Caro, Cintia, María Rosa, mis compañeros de oficina y de quienes injustamente me esté olvidando.

Por último y, no por eso menos importantes, mi familia y amigos, que me acompañaron en este camino con cariño y afecto.

## RESUMEN

Los materiales nanoestructurados y, entre ellos, las nanopartículas de plata (AgNPs), han despertado gran interés en el ámbito científico/tecnológico, debido a sus importantes propiedades ópticas y electrónicas, haciéndolas atractivas en diversas áreas del conocimiento como física, química, biotecnología e ingeniería, entre otras. Sus aplicaciones pueden ir desde el almacenamiento de energía o el tratamiento de aguas hasta el desarrollo de catalizadores y sensores químicos de distintos tipos.

El objetivo general de la presente Tesis es el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis de AgNPs que resulten económicas, sencillas, rápidas y amigables con el medio ambiente. Por otro lado, se plantea la posibilidad de implementar nuevos métodos de caracterización de estas partículas empleando técnicas como Electroforesis Capilar (EC) y Espectroscopía Raman. En algunos casos se emplean modelos teóricos computacionales basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Por último, se buscan posibles aplicaciones de las AgNPs, como su empleo en el fenómeno de espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS) para la detección de antibióticos en miel y el uso de otro tipo de nanosistemas, como nanotubos de carbono decorados con metales de transición, para el futuro desarrollo de sensores de glucosa en miel.

## **Abstract**

The nanostructured materials, among them silver nanoparticles (AgNPs), have awakened great interest in scientific/technological fields, due to their significant optical and electronic properties, making them attractive in several areas of knowledge such as physics, chemistry, biotechnology and engineering. Its Applications can start from energy storage or water treatment to the development of catalysts and chemical sensors of various types.

The general objective of this Thesis is the development of economical, simple, fast and friendly with the environment, new AgNPs synthesis methodologies. Therefore, we study the possibility of implementing new methods of characterization of these particles using techniques such as Capillary Electrophoresis (CE) or Raman Spectroscopy, the latter accompanied by theoretical computational models based on the Density Functional Theory (DFT). Finally, possible applications of the AgNPs are investigated, like its use in Surface Enhancement Raman spectroscopy (SERS) for the detection of antibiotics in honey or the use of different types of nanosystems, such as carbon nanotubes decorated with transition metals for a future development of glucose sensors.



# Índice

## Capítulo 1

Introducción .....	1
1.1. Generalidades de nanotecnología y nanopartículas.....	1
1.2. Técnicas de caracterización .....	2
1.2.1. Espectroscopía UV-visible.....	2
1.2.2. Espectroscopía Raman .....	4
1.2.3. Microscopía de Transmisión Electrónica .....	7
1.2.4. Análisis Térmicos.....	8
1.2.5. Dispersión dinámica de la luz.....	8
1.2.6. Electroforesis Capilar.....	10
1.3. Métodos teóricos utilizados en la tesis .....	11
1.3.1. Teoría del Funcional de la Densidad.....	11
1.3.2. Códigos basados en DFT utilizados en esta tesis .....	16
1.4. Referencias .....	17
1.5. Objetivos generales de esta Tesis .....	21

## Capítulo 2

Síntesis de nanopartículas de plata.....	23
2.1. Introducción.....	23
2.2. Objetivos.....	26
2.3. Experimental.....	26
2.3.1. Instrumentación.....	26
2.3.2. Reactivos y soluciones .....	26
2.3.2. Síntesis de AgNPs.....	27
2.3.3. Caracterización de AgNPs .....	28
2.4. Resultados y discusión.....	28
2.4.1. Síntesis de AgNPs a partir de miel.....	28
2.4.1.1. Optimización de las variables de la síntesis.....	30
2.4.2. Caracterización de las AgNPs .....	32
2.4.2.1. Función de los hidratos de carbono en la síntesis de AgNPs.....	33
2.4.2.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM) .....	35
2.4.2.3. Termogravimetría .....	36
2.4.3. Cinética de la reacción de síntesis de AgNPs .....	38
2.5. Conclusiones parciales.....	40
2.6. Referencias .....	40

## Capítulo 3

Nuevos métodos de caracterización de AgNPs Utilizando Electroforesis Capilar y Espectroscopía Raman .....	44
3.1. Objetivo general. ....	44
3.2. Electroforesis capilar .....	45
3.2.1. Introducción.....	45
3.2.2. Objetivos .....	46

3.2.3. Experimental.....	47
3.2.3.1. Reactivos y soluciones .....	47
3.2.3.2. Preparación de suspensiones coloidales (SC) de AgNPs .....	47
3.2.3.3. Caracterización de las SC de AgNPs .....	48
3.2.3.4. Electroforesis Capilar.....	48
3.2.4. Resultados .....	49
3.2.4.1. Caracterización AgNPs por espectroscopía UV-Visible y Microscopía de Transmisión Electrónica .....	49
3.2.4.2. Caracterización de AgNPs por Dispersión Dinámica de la Luz.....	51
3.2.4.3. Desarrollo de un método de Electroforesis Capilar para la caracterización de AgNPs .....	52
3.2.4.3.1 Optimización de las variables de electroforesis capilar .....	52
3.2.4.3.2. Determinación de movilidad electroforética y potencial zeta.....	53
3.2.4.3.3. Determinación de tamaño de AgNPs .....	56
3.2.4.3.4. Evaluación de estabilidad de las AgNPs por EC.....	58
3.2.5. Conclusiones parciales.....	60
3.3. Identificación de agentes bloqueantes en Nanopartículas de Plata (AgNPs) empleando Espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS).....	61
3.3.1. Introducción.....	61
3.3.2. Objetivos .....	62
3.3.3. Experimental.....	63
3.3.3.1. Instrumentación.....	63
3.3.3.2. Reactivos y soluciones .....	63
3.3.3.3. Síntesis de AgNPs .....	63
3.3.3.4. Método computacional.....	64
3.3.4. Resultados y discusión.....	65
3.3.4.1. Síntesis de AgNPs .....	65
3.3.4.2. Espectroscopía Raman de la $\alpha$ -D-Glucosa sólida .....	65
3.3.4.3. Espectroscopía SERS .....	67
3.3.4.4. Cálculo de frecuencias.....	69
3.3.4.5. Análisis de frecuencias teórico-experimentales .....	74
3.3.5. Conclusiones parciales.....	75
3.4. Referencias .....	76

## Capítulo 4

Estudios de potenciales aplicaciones de las AgNPs.....	84
4.1. Objetivos generales .....	84
4.2. Identificación de Oxitetraciclina en miel por medio de Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie (SERS) .....	85
4.2.1. Introducción.....	85
4.2.2. Objetivos .....	86
4.2.3. Experimental.....	86
4.2.3.1. Instrumentación.....	86
4.2.3.2. Reactivos y soluciones .....	87
4.2.3.3. Método computacional.....	87
4.2.3.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata .....	88
4.2.3.5. Procedimiento.....	89
4.2.4. Resultados .....	90
4.2.4.1. Caracterización de AgNPs .....	90
4.2.4.2. Espectroscopía SERS .....	92
4.2.5. Conclusiones parciales.....	96
4.3. Estudio DFT de sensores de $\beta$ -D-Glucosa basados en nanotubos de carbono decorados con Pt .....	97

4.3.1. Introducción.....	98
4.3.2. Objetivos.....	100
4.3.3. Métodos computacionales.....	100
4.3.4. Resultados y discusión.....	104
4.3.4.1. Optimización geométrica.....	104
4.3.4.2. Análisis de los cambios en enlace químico.....	105
4.3.4.3. Estructura electrónica.....	111
4.3.5. Conclusiones parciales.....	112
4.4. Referencias.....	113

## Capítulo 5

5.1. Conclusiones generales .....	124
5.2. Trabajo a futuro .....	125

## Capítulo 6

6.1. Productividad .....	128
6.1.1. Congresos.....	128
6.1.2. Publicaciones en revistas indexadas.....	130

# **CAPÍTULO 1**

## Introducción

### 1.1. Generalidades de nanotecnología y nanopartículas

La nanotecnología engloba el desarrollo y aplicación de sistemas físicos, químicos y biológicos que poseen tamaños que abarcan desde pocos átomos o moléculas a dimensiones submicrónicas. En los últimos años, el interés e impacto de la nanociencia y nanotecnología, en las diferentes ramas de las ciencias e ingenierías, se ha ido incrementado exponencialmente. Existen diversos tipos de nanosistemas, entre los cuales se destacan:

- Nanopartículas metálicas
  
- Nanotubos de carbono
  
- Liposomas
  
- Dendrímeros
  
- Micelas poliméricas<sup>1</sup>.

Las nanopartículas (NPs) metálicas comprenden un importante campo de estudio y desarrollo en las tecnologías de nanoescala. Éstas pueden definirse como un agregado de átomos unidos (en este caso metálicos) que poseen un radio comprendido entre 1 y 100 nm.

Si bien, como se mencionó anteriormente, las NPs han suscitado enorme interés en los últimos años, su uso se remonta a varios siglos atrás. Los mayas, utilizaban pigmentos azules que contenían elementos nanoestructurados<sup>2</sup>. Por otra parte, también puede citarse la copa de Licurgo, fabricada aproximadamente en el siglo IV por artesanos romanos, como otro ejemplo de utilización de NPs en la antigüedad. Este objeto está hecho de un vidrio muy característico, el cual, en su interior, posee nanopartículas de oro y plata. Cuando una fuente de luz se encuentra en el interior de la copa, ésta se ve de color violeta, mientras que, si es

iluminada desde el exterior, el color es diferente. En la modernidad, el primero en postular la posibilidad de que una suspensión de oro nanoestructurado, al dispersar la luz presente en colores característicos en ciertas soluciones, fue Michael Faraday en el siglo XIX<sup>3</sup>. Las propiedades ópticas y electrónicas de las NPs permiten su aplicación en diferentes ciencias (química, física, biotecnología, biomedicina, bioingeniería, etc.), debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana entre otras<sup>4,5,6</sup>.

Las nanopartículas metálicas poseen ciertas ventajas con respecto a otros nanosistemas, entre las que puede destacarse el hecho de poder ser sintetizadas empleando diferentes procedimientos y modificadas químicamente de forma relativamente más sencilla que los otros nanomateriales mencionados previamente. Estas partículas suelen sintetizarse por procesos fisicoquímicos (utilizando agentes reductores), electroquímicos u otros, como la ablación láser<sup>7</sup>. En los últimos años se están desarrollando nuevos métodos de síntesis en los que se utilizan productos naturales<sup>8</sup>. Mayores detalles sobre la síntesis de NPs se enumeran en el capítulo 2: “Síntesis de nanopartículas de plata”.

## **1.2. Técnicas de caracterización**

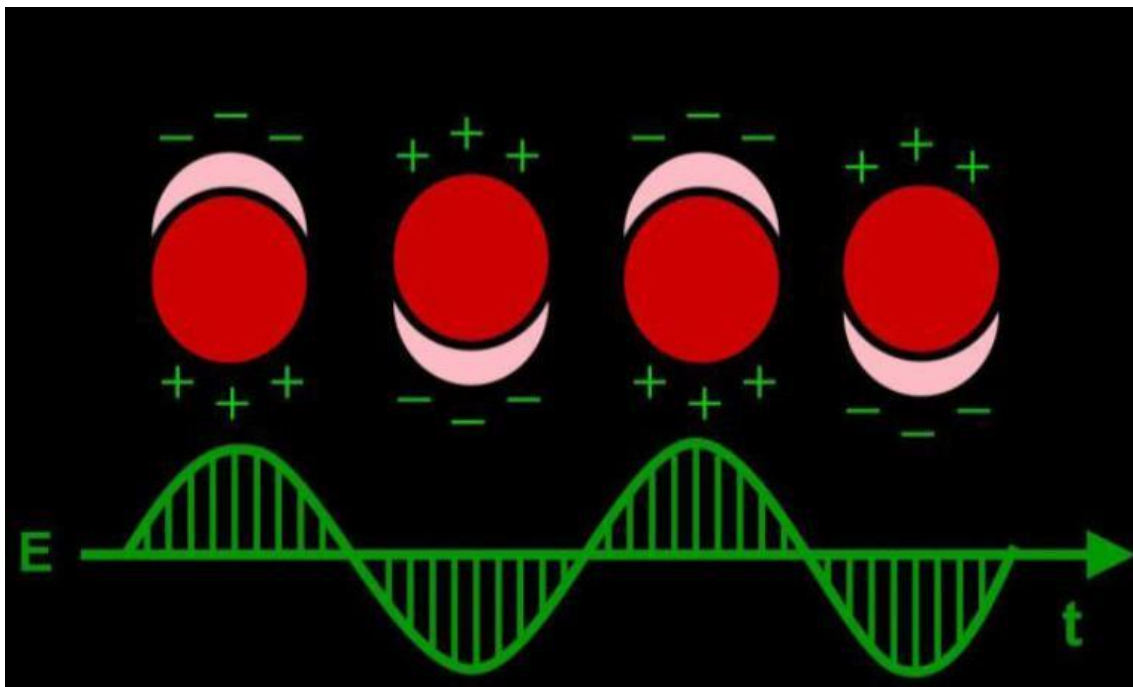
En este trabajo de Tesis se utilizaron las siguientes técnicas de caracterización:

### **1.2.1. Espectroscopía UV-visible**

El fenómeno por plasmón de resonancia superficial localizado (LSPR por sus siglas en inglés) es característico en las nanopartículas (NPs) metálicas. Éste se asemeja, en un principio, a un gas fuertemente ionizado, cuyas cargas en movimiento pueden interactuar con la radiación electromagnética, ocasionando fenómenos vibratorios típicos llamados plasmones.

De manera similar, los metales se asemejan a lo que podría denominarse un “plasma sólido”, encontrándose en el interior de su estructura, núcleos con cargas positivas y electrones de la banda de valencia formando una red y, en su superficie, los electrones

correspondientes a la banda de conducción. Estos últimos pueden considerarse como un gas de electrones, que al interactuar con la radiación, son perturbados de sus posiciones de equilibrio vibrando a una frecuencia característica, formando así oscilaciones colectivas llamadas *plasmones de superficie*<sup>9</sup>. Cuando los plasmones superficiales se encuentran confinados a volúmenes metálicos pequeños del orden de los nanómetros (como en el caso de las NPs) estas oscilaciones se llaman *plasmones de resonancia de superficie localizada*. En esta situación el campo eléctrico oscilante de la radiación incidente induce un dipolo eléctrico en la NP desplazando a una parte de los electrones móviles lejos del resto de la partícula metálica, generando así una carga neta negativa en un lado de ella. Como el resto de los núcleos y sus electrones de valencia no fueron desplazados, constituyen una carga opuesta positiva, es decir, una red catiónica. Esta separación de cargas actuará como una fuerza restauradora del equilibrio (Figura 1.1)<sup>10</sup>



**Figura 1.1.** Esquema del fenómeno de resonancia de plasmón superficial localizado.

Según la teoría de Mie, quien a principios del siglo XX desarrolló una solución analítica para las ecuaciones de Maxwell<sup>11,12</sup> la radiación que interactúa con una suspensión coloidal de estas nanopartículas será absorbida o dispersada, dependiendo del metal que las forme,

de su tamaño, de su forma y del medio en que se encuentren. De esta forma, para NPs de un diámetro menor a 20 nm la mayor parte de la radiación será absorbida, mientras que para NPs con diámetro mayor a 20 nm esta será dispersada. Cabe destacar que en ambas situaciones los dos fenómenos ocurren simultáneamente, con preponderancia de uno sobre el otro, y es por ello que en estas situaciones se suele referir a *extinción* de la radiación.

Cuando una suspensión coloidal de NPs es sometida a radiaciones de diferentes longitudes de onda, como en el caso de la espectroscopía UV-visible, se observan bandas con máximos bien definidos. Las longitudes de onda de éste máximo de extinción, como se comentó anteriormente, dependen entre otros factores, del tipo de metal (por ejemplo, si se trata de Plata u Oro) y del medio de suspensión del coloide. Sin embargo mediante la teoría de Mie, es posible relacionar el tamaño de las NPs, con el ancho de banda y con la longitud de onda de máxima absorción<sup>13</sup>.

### **1.2.2. Espectroscopía Raman**

La espectroscopía Raman hace posible la identificación de moléculas por medio de su "huella digital" ("*fingerprint*"). Ésta se obtiene a través de los diferentes modos normales de vibración de cada grupo funcional presente en la molécula, que oscila a frecuencias características dependiendo del tipo de enlace y los átomos que lo forman. Las moléculas son irradiadas con un láser de alta potencia, que las excitará a estados energéticos superiores virtuales, para retornar a su estado de energía original, mayor o menor a la inicial. De esta forma la mayoría de los fotones son dispersados sin cambios de energía (dispersión elástica de Rayleigh). Por otro lado, una de cada  $10^6$ - $10^8$  veces la emisión se produce de forma inelástica, pudiendo ser el fotón emitido con mayor longitud de onda (Stokes) o con menor longitud de onda (anti-Stokes). Esta última es poco frecuente y en la mayoría de los casos se utiliza el espectro generado por la dispersión de Stokes (Figura 1.2). Dependiendo de la forma en que el fotón haya interactuado con el enlace, éste será dispersado con una diferencia de energía característica al modo normal de vibración de dicha unión entre átomos, y se



desplazará a una determinada frecuencia con respecto a la dispersión de Rayleigh, produciendo así el corrimiento Raman (Raman shift). Los corrimientos de todos los enlaces de la molécula irradiada dará un conjunto de picos correspondientes al modo normal de vibración de cada uno de ellos generando así una “huella digital” característica en el Espectro Raman (Figura 1.3)<sup>14</sup>.

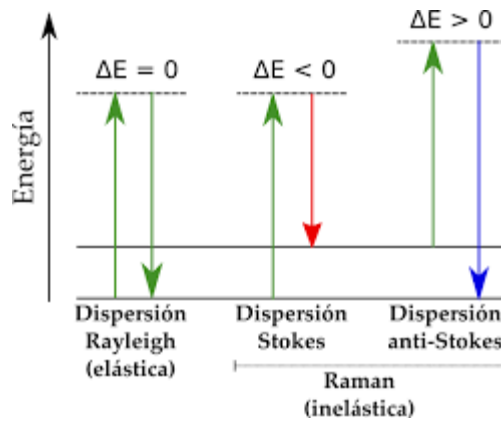


Figura 1.2. Esquema de los niveles energéticos en la dispersión Raman.

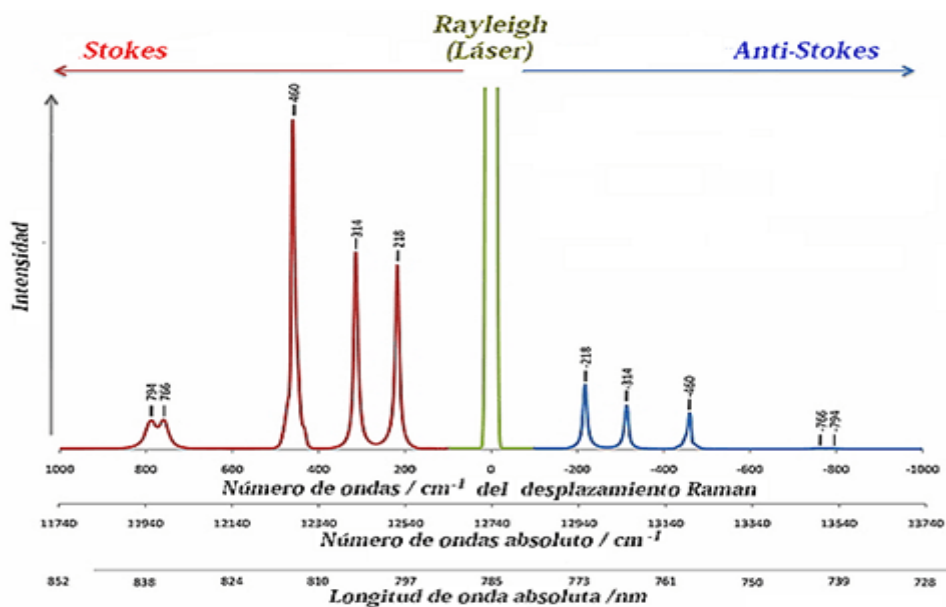
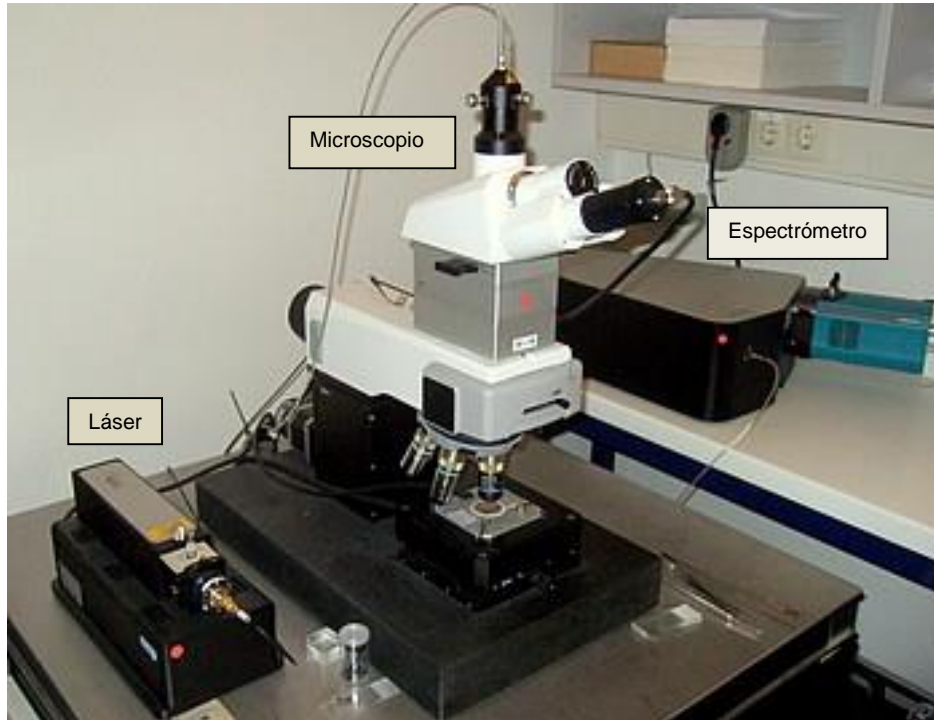


Figura 1.3. Ejemplo de un espectro Raman, con sus desplazamientos Stokes y anti-Stokes.

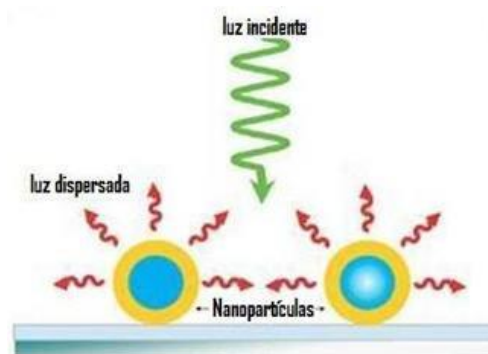
El acoplamiento de un microscopio al espectrómetro Raman (Microscopía Raman Confocal), posee la ventaja de analizar la muestra en sitios específicos o por partes, recorriendo de esta forma la misma en busca de los mejores espectros (Ver Figura 1.4)



**Figura 1.4.** Esquema de un Microscopio confocal Raman.

El fenómeno de espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS por sus siglas en inglés) se utiliza ampliamente para mejorar la detección de moléculas, y, además, para obtener información de adsorbatos sobre superficies, ya sea *in situ* o bien en soluciones acuosas. Las superficies sensibles a este tipo de fenómeno dependen del láser de excitación utilizado, a modo de ejemplo podemos citar el caso de las superficies de plata que emplean un láser de excitación de 532 nm. Para que este fenómeno ocurra, es necesario que la molécula a determinar se ubique cerca de la superficie de un metal (alrededor de los 20 Å). Las nanopartículas poseen una alta densidad de electrones de conducción que se extiende a una considerable distancia de su superficie. Cuando un haz de radiación electromagnética interacciona con ellos, estos comienzan a oscilar colectivamente a través de la superficie generando de esta forma la resonancia de plasmón superficial (SPR) como se esquematiza en la Figura 1.5. Cuando la oscilación electrónica se da en una superficie lisa, la vibración de

estas partículas ocurre a lo largo del plano de la superficie, generando de esta forma un fenómeno de absorción de la radiación incidente. Sin embargo, cuando ésta interactúa con electrones vibrando perpendicularmente a la superficie del metal, la radiación es dispersada. Para que este fenómeno ocurra, es necesario que la superficie metálica sea rugosa o irregular. Es en los plasmones de resonancia situados en los valles de dichas rugosidades, cuando la oscilación de estos se desplaza perpendicularmente a la superficie, que ocurren las condiciones necesarias para que la radiación sea dispersada. Cuando la situación antes mencionada ocurre en cercanías de un láser excitando un modo normal de vibración, la intensidad de la dispersión Raman se incrementa en un orden cercano a  $10^6$ <sup>13</sup>.



**Figura 1.5.** Esquema de la interacción de la radiación con nanopartículas en el fenómeno SERS.

### 1.2.3. Microscopía de Transmisión Electrónica

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de NPs. Esta técnica es de enorme utilidad debido a su elevada capacidad de resolución, la cual permite distinguir objetos muy pequeños con poca separación entre ellos (del orden de los nm).

El microscopio electrónico genera un haz de electrones con una longitud de onda menor a la del haz de luz utilizado por los microscopios ópticos, lo cual, según la teoría de De Broglie, aumenta su resolución.

Por otra parte la utilización de lentes electromagnéticos permite alcanzar grandes aumentos de tamaño pudiendo alcanzar magnificaciones de hasta  $1000000\times^{15}$

#### **1.2.4. Análisis Térmicos**

Los métodos de análisis térmicos pueden definirse como “un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción en función de la temperatura mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlado”<sup>16</sup>. En los métodos termogravimétricos (TGA) se lleva un registro constante de la masa de la muestra (en una atmósfera controlada) mientras se aumenta la temperatura de la misma a lo largo del tiempo. De esta forma se obtienen las denominadas *curvas de descomposición térmicas*. Por su parte, los análisis térmicos diferenciales (DTA) miden la diferencia de temperatura entre una sustancia y un material patrón de referencia en función de la temperatura cuando ambos se someten a un programa de temperatura controlado<sup>17</sup>

#### **1.2.5. Dispersión dinámica de la luz**

La técnica conocida como dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés) es una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de nano y micropartículas<sup>18</sup>. Entre la amplia gama de información que brinda esta técnica podemos mencionar la determinación del tamaño y del potencial zeta de pequeñas partículas en suspensión.

*-Medidas de Tamaño*

Cuando una partícula se irradia con un láser, dispersa dicha radiación en todas direcciones. En una de estas direcciones se encuentra una pantalla que recibe estos fotones dispersados por parte de miles de partículas, y de esta forma generan un patrón de puntos luminosos. Debido al movimiento browniano, las partículas viajan en todas direcciones, migrando las más pequeñas a mayor velocidad y las más grandes a menor velocidad. Ésta relación está dada por la ecuación de Stokes-Einstein. De esta manera el patrón de difracción capturado en la pantalla se modifica a través del tiempo debido a dichos movimientos de las partículas, permitiendo relacionar la velocidad de cambio de dicho patrón con el tamaño de las partículas<sup>18</sup>

*-Medidas de potencial zeta*

El instrumento posee una celda especial, con electrodos en sus extremos, en la que se realiza una micro electroforesis. Se aplica un potencial en donde las partículas cargadas migran hacia el electrodo de carga opuesta. La velocidad de migración es medida por el instrumento obteniéndose así la movilidad electroforética y, por aplicación de la ecuación de Henry, se calcula el potencial zeta<sup>18</sup>; el potencial zeta provee información acerca de la carga y el potencial eléctrico que rodea a las partículas en solución. Estas mediciones son realizadas a través de la movilidad electroforética por medio de la ecuación de Henry

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde:

- z: Potencial zeta.
- $\mu_e$ : Movilidad electroforética.

- $\epsilon$ : Constante dieléctrica.
- $\eta$ : Viscosidad.
- $f(\kappa a)$ : Función de Henry.

### 1.2.6. Electroforesis Capilar

La electroforesis es un método de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de especies cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Para un ión, dicha velocidad es:

$$u = \mu_e \cdot E \quad \text{Ec. 1.2}$$

Donde  $E$  ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) es el campo eléctrico aplicado y  $\mu_e$  la movilidad electroforética ( $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

Los iones con mayor tamaño tardan más tiempo en migrar debido a la resistencia que opone el buffer presente en el medio de separación, mientras que los iones que poseen mayor carga se moverán más rápido hacia su correspondiente electrodo, ya que el campo eléctrico aplicado ejerce mayor efecto en éstos. Por lo anteriormente expuesto puede decirse que la electroforesis separa las partículas por su relación carga/tamaño<sup>19</sup>.

En la electroforesis capilar (EC), el buffer de separación se aloja en capilares de 20 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, lo cual presenta grandes ventajas frente a la técnica convencional, pues es más rápida, menos laboriosa y fácil de automatizar. Además de proporcionar resultados cuantitativos y separaciones en menor tiempo, presenta una mayor capacidad de resolución. Cabe destacar que la EC requiere mínimos volúmenes de muestra y reactivos (del orden de los  $\mu\text{L}$ ) y, por lo tanto, genera menor cantidad de residuos<sup>19</sup>.

### 1.3. Métodos teóricos utilizados en la tesis

Los cálculos basados en la mecánica cuántica se utilizan cada vez más en los diferentes campos de la ciencia, tanto básica como aplicada, y la tecnología. Si bien, en un principio, el cálculo de soluciones exactas es muy limitado, el desarrollo de métodos que permiten efectuar cálculos complejos a partir de aproximaciones, es de gran ayuda en la obtención de resultados de alta calidad.

#### 1.3.1. Teoría del Funcional de la Densidad

La ecuación de Schrödinger, independiente del tiempo y sin consideraciones relativistas, para un sistema con varios electrones está dada por:

$$\left[ \frac{\hbar^2}{2m} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N V(\mathbf{r}_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j<i}^N U(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) \right] \Psi = E(\Psi) \quad \text{Ec. 1.3}$$

Donde los términos entre los corchetes incluyen la energía cinética de los electrones, la interacción núcleo - electrón y las interacciones entre electrones, respectivamente; siendo E la energía del estado fundamental de estos electrones. Cabe destacar que se tuvo en cuenta la aproximación de Born-Oppenheimer, ignorando así el movimiento nuclear.

Por su parte  $\Psi$  incluye los productos individuales de cada función de onda correspondiente a cada electrón con sus coordenadas espaciales siendo:

$$\Psi = \psi_1(\mathbf{r}_1)\psi_2(\mathbf{r}_2) \dots \dots \dots \psi_N(\mathbf{r}_N) \quad \text{Ec. 1.4}$$

Donde  $\psi$  es la función de onda individual de cada electrón y N es el número total de electrones. Nótese que, para encontrar el estado fundamental de un sistema sencillo, como, por ejemplo, una molécula de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) se tendría una función de onda de 66 dimensiones (3 para cada uno de los 22 electrones de la molécula).

Entre las aproximaciones y teorías desarrolladas durante el siglo XX, la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés) tomó gran relevancia, pues simplifica el problema en gran medida<sup>20</sup>.

El método DFT se basa fundamentalmente en dos teoremas:

*Teoremas de Hohenberg y Kohn:*

El primer teorema, formulado en 1964 por Hohenberg y Kohn<sup>21</sup>, establece que para el estado energético fundamental de las moléculas, la función de onda y todas las demás propiedades electrónicas pueden ser determinadas unívocamente por la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental. *Se dice entonces que la energía del estado fundamental puede calcularse como un funcional de la densidad electrónica en ese mismo estado*, es decir:

$$E_0 = E_0[\rho_0] \qquad \text{Ec. 1.5}$$

Es por ello que se le da el nombre de “Teoría del Funcional de la Densidad”.

La importancia crucial de esta teoría radica en que ahora, para encontrar la solución a la ecuación de Schrödinger, sólo se necesita una ecuación de tres variables espaciales, y no una de 3N variables, simplificando así el cálculo en gran medida.

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn<sup>20</sup> brinda más información acerca del funcional ofreciendo una importante propiedad del mismo. De esta manera se establece que *la densidad de electrones que minimiza la energía del funcional global, es la densidad electrónica verdadera que corresponde a la solución completa de la ecuación de Schrödinger*. De esta forma, si se conociera el verdadero funcional, se podrían calcular todas las propiedades moleculares del estado fundamental. Lamentablemente este funcional no se conoce, sin embargo, en 1965 Kohn y Sham (K-S) idearon una forma práctica para obtener  $\rho_0$  y de esta forma hallar  $E_0$ <sup>22</sup>. Este método, es utilizado como una manera de aproximarse a



este funcional verdadero y se basa en separar las energías conocidas de las no conocidas, es decir:

$$E[n] = E[n]_{conocido} + E[n]_{desconocido} \quad \text{Ec. 1.6}$$

Donde el primer término incluye la energía cinética de los electrones del sistema no interactuante ( $\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2$ ) junto la interacción coulombiana entre los electrones y un potencial externo ( $V_{ext}$ ). Por su parte el segundo término agrupa lo no conocido, a lo que se le llama *energía de intercambio correlación* ( $E_{xc}$ ). Entonces podemos reescribir la parte radial la ecuación 1.3 como:

$$\left[ \frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_{ext}(r) + V_H(r) + V_{xc}(r) \right] \varphi_i(r) = E \varphi_i(r) \quad \text{Ec. 1.7}$$

Donde  $V_H$  es el potencial de Hartree que describe la interacción coulombiana y se escribe como:

$$V_H(r) = e^2 \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} d^3r' \quad \text{Ec. 1.8}$$

La densidad electrónica real del sistema puede ser expresada en términos de los orbitales K-S:

$$\rho(r) = \sum_{i=1}^N |\varphi_i(r)|^2 \quad \text{Ec. 1.9}$$

Por su parte el potencial de intercambio-correlación viene dado por la derivada de la energía de intercambio y correlación con respecto a la densidad<sup>23</sup>:

$$V_{xc}(r) = \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad \text{Ec. 1.10}$$

Sin embargo, como las ecuaciones de K-S dependen de la densidad electrónica, debemos utilizar el *método autoconsistente* o *método variacional*; para esto:

- 1) Partir de una densidad electrónica de prueba
- 2) Colocar dicha densidad en la ecuación 1.8 y calcular el potencial de Hartree
- 3) Resolver la ecuación K-S 1.7 con el potencial calculado en “2)” para obtener las autofunciones
- 4) Con dichas autofunciones se calcula nuevamente la densidad electrónica con la ecuación 1.9.
- 5) Se compara la densidad de partida con la calculada utilizando criterios de convergencia.
- 6) Si dichos criterios no se satisfacen se vuelve al punto “2)” con la densidad electrónica calculada y se repiten los pasos a partir de allí.

#### *Métodos para la aproximación del funcional intercambio correlación*

El funcional de intercambio correlación ( $E_{xc}$ ), presente en la ecuación 1.10, contiene toda aquella información que no conocemos con exactitud en el sistema. Es por ello que surge la necesidad de aplicar métodos de aproximación para encontrar una forma explícita de expresión de este funcional, el cual es necesario para resolver las ecuaciones de K-S. Dentro de las aproximaciones más utilizadas en el área de la Física de Materia Condensada podemos mencionar la aproximación de la densidad local (por sus siglas en inglés LDA) y la aproximación del gradiente generalizado (GGA, por sus siglas en inglés).

La aproximación LDA para el funcional  $E_{xc}$ , fue propuesta en 1964 por Hohenberg y Kohn<sup>20</sup> siendo así el primer método en aplicarse para DFT. Aquí, se asume que la energía de intercambio y correlación puede ser hallada aproximando localmente la densidad del sistema inhomogéneo con la densidad correspondiente a un gas homogéneo de electrones. Se expresa como:

$$E_{xc}^{LDA}[\rho] = \int \rho(r)\epsilon_{xc}(\rho(r))dr \quad \text{Ec. 1.11}$$

Donde  $\epsilon_{xc}(\rho(r))$  es la energía de correlación del gas homogéneo de electrones y puede expresarse como la suma de las energías individuales de correlación e intercambio, es decir:

$$\epsilon_{xc}(\rho(r)) = \epsilon_x(\rho(r)) + \epsilon_c(\rho(r)) \quad \text{Ec. 1.12}$$

El término correspondiente al intercambio tiene la forma:

$$\epsilon_x(\rho(r)) = -\frac{3}{4}\sqrt{\frac{3\rho(r)}{\pi}} \quad \text{Ec. 1.13}$$

Si bien para el término correspondiente a la correlación no existe una expresión explícita, el método de Monte Carlo ejecuta cálculos muy precisos para un gas homogéneo de electrones, los cuales pueden ser aplicados a DFT. Si bien a simple vista la aproximación por LDA parece poco adecuada, es muy utilizada en el campo de la Física del Estado Sólido, pues obtiene resultados muy precisos. Cabe destacar que cuanto más inhomogéneo es el sistema, como por ejemplo moléculas pequeñas, mayor es el error de este método. En términos generales puede decirse que las energías son sobrestimadas y, por lo tanto, las distancias de enlaces subestimados, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la aproximación LDA arroja excelentes resultados.

Por su parte el método GGA, a diferencia del LDA, no asume que los efectos de correlación-intercambio son locales y, por ende, dependientes de la densidad electrónica en

cada punto, sino que introduce información acerca de la variación de estas densidades en el entorno del punto. De esta forma, como lo indica su nombre, considera el comportamiento del gradiente de densidades electrónicas, es decir:

$$E_{xc}^{GGA}[\rho] = \int \rho(r) \epsilon_{xc}(\rho(r), \nabla\rho(r)) dr \quad \text{Ec. 1.14}$$

Al igual que como ocurre en la aproximación por LDA, en GGA también se tratan por partes separadas los términos referidos a la correlación, por un lado y al intercambio, por el otro<sup>24</sup>. Los funcionales con la aproximación GGA usualmente muestran mejores resultados en las predicciones para las longitudes de enlace y para la constante de red; sin embargo, en determinadas estructuras los resultados obtenidos con esta aproximación pueden ser menos precisos que los obtenidos mediante el método LDA.

### 1.3.2. Códigos basados en DFT utilizados en esta tesis

- VASP

El código VASP (Vienna Ab initio Simulation Package) aplica la teoría DFT a sistemas periódicos, utilizando ondas planas y pseudopotenciales (potenciales más débiles utilizados para los electrones cercanos al núcleo, cuyas funciones de onda se hacen idénticas a los verdaderos al acercarse a la parte exterior de la esfera) del tipo ultrasuaves, los cuales reducen el número de ondas planas necesarias para el cálculo. Este programa resuelve las ecuaciones de K-S de manera autoconsistente. El programa puede calcular además la fuerza actuando sobre los átomos y esta magnitud puede utilizarse para relajar la geometría del sistema.

Para la aproximación del funcional de intercambio y correlación, utiliza la aproximación del Gradiente Generalizado de Perdew y Wang debido a que conducen a una buena descripción de las energías de enlace<sup>23</sup>. Para los análisis de cargas se utilizó el método de Bader<sup>25</sup>.

En el caso de los análisis de densidades de estado tanto totales (DOS) como locales (LDOS) y proyectadas (PDOS), los cuales son en Física del Estado Sólido el equivalente para el diagrama de energía de los orbitales moleculares, se calcularon en el VASP por medio de un método autoconsistente <sup>26</sup>.

Para el análisis de enlace por medio de solapamiento poblacional (Overlap Population, OP por sus iniciales en inglés) y orden de enlace (BO por sus siglas en inglés de “Bonding Order”) se utilizó el método DDEC6<sup>27,28</sup>.

En las situaciones en las que se hizo necesario incorporar las interacciones de van der Vals se hizo uso del funcional vdW-DF<sup>29</sup>.

- Gaussian 09

Este programa permite realizar cálculos de energía, dinámica molecular, frecuencias en el infrarrojo y Raman entre otras cosas, haciéndolo muy versátil. Los modelos matemáticos utilizados para hacer los cálculos se llaman FEM (Finite Element Method) y método Simplex. Utilizando matrices, este método divide el espacio N dimensional en pequeños subsistemas que pueden ser descritos por N ecuaciones lineales. A continuación, las ecuaciones son resueltas por medio del método autoconsistente. A diferencia del VASP que utiliza ondas planas, este código hace uso de las funciones de onda del tipo gaussianas. La aproximación para la correlación-intercambio más ampliamente utilizada es el B3LYP, el cual es un funcional híbrido<sup>30</sup>

#### 1.4. Referencias

---

<sup>1</sup> B. Bhushan, Springer Handbook of Nanotechnology, Columbus USA (2004) ISBN 978-3-540-29838-0.

<sup>2</sup> M. Yacaman, L. Rendon, J. Arenas, M.C. Serra Puche, Maya Blue Paint: An Ancient Nanostructured Material, Science (80). 273 (1996) 223–225.

---

<sup>3</sup> M. Faraday, The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philos. Trans. R. Soc. London.* 147 (1857) 145–181.

<sup>4</sup> A. E. Kestell, G. DeLorey, *Nanoparticles: Properties, Classification, and Fabrication*, Nova Science Pub Inc; Edición: UK ed. (2011) ISBN: 978-1-61668-344-3.

<sup>5</sup> T. Maiyalagan, Synthesis, characterization and electrocatalytic activity of silver nanorods towards the reduction of benzyl chloride, *Appl. Catal. A Gen.* 340 (2008) 191–195.

<sup>6</sup> T. Pradeep, Anshup, Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review, *Thin Solid Films.* 517 (2009) 6441–6478.

<sup>7</sup> D.T. Thuc, T.Q. Huy, L.H. Hoang, B.C. Tien, P. Van Chung, N.T. Thuy, A.T. Le, Green synthesis of colloidal silver nanoparticles through electrochemical method and their antibacterial activity, *Mater. Lett.* 181 (2016) 173–177.

<sup>8</sup> P. Raveendran, J. Fu, S.L. Wallen, C. Hill, N. Carolina, Completely “ Green ” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *J. Am Chem Soc.* 125 (2003) 13940–13941.

<sup>9</sup> W.A. Murray, W.L. Barnes, Plasmonic materials, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3771–3782.

<sup>10</sup> D.A. Cruz, M.C. Rodríguez, J.M. López, V.M. Herrera, A.G. Orive, A.H. Creus, Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda., *Av. En Ciencias E Ing.* 3 (2012) 67–78.

<sup>11</sup> Y.J. Campbell, Dean J.; Xia, *Advanced Chemistry Classroom and Laboratory Plasmons: Why Should We Care?*, *J. Chem. Educ.* 84 (2007) 91–96.

<sup>12</sup> Y. Xia, N.J. Halas, Shape-Controlled Surface Plasmonic Nanostructures, *MRS Bull.* 30 (2005) 338–348.

---

<sup>13</sup> K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 668–677.

<sup>14</sup> E. Smith, G. Dent; *Modern Raman Spectroscopy– A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd (2005), Print ISBN: 9780471497943.

<sup>15</sup>V. Sorrivias de Lozano, A. Morales, M.J. Yañez, *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica*. 1ra. Ed. (2014), ISBN:978-987-43-4752-7.

<sup>16</sup>I.N. Thermal, *Nomenclature in Thermal Analysis*, part IV, 28 (1979) 1–6.

<sup>17</sup> T. Ozawa, *Thermal Analysis — Review and Prospect*, *Thermochim. Acta.* 355 (2000) 35–42.

<sup>18</sup>R. Pecora, *Dy Light Scattering Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, New York: Plenum Press (1985) ISBN 978-1-4613-2389-1.

<sup>19</sup>C. Blanco, *Electroforesis Capilar*, Editorial Universidad de Almeria, (1998), ISBN: 9788482401096.

<sup>20</sup>D. Sholl, J. Steckel, *Density Functional Theory, A Practical Introduction*. (2009) John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. ISBN 978 0 470 37317 0.

<sup>21</sup>P. Hohenberg, W. Kohn. Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev.* 136(3B) (1964) B864–B871.

<sup>22</sup>W. Kohn & L. J. Sham. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140(4A) (1965) A1133–A1138.

<sup>23</sup>I. Levine, *Química Cuántica*, 5ta ed. (2001) Prentice Hall, Madrid, ISBN 8420530964.

<sup>24</sup>J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.*, 77(18) (1996) 3865–3868.

---

<sup>25</sup>R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules—A Quantum Theory*, (1990) Oxford University Press, Oxford.

<sup>26</sup>G. Kresse, M. Marsman, J. Furthmüller. *VASP the GUIDE*, (2016) Vienna.

<sup>27</sup>T.A. Manz, N. Gabaldon-Limas, Introducing DDEC6 atomic population analysis: part 1. Charge partitioning theory and methodology, *RSC Adv.* 6 (2016) 47771–47801.

<sup>28</sup>N. Gabaldon-Limas, T.A. Manz, Introducing DDEC6 atomic population analysis: part 2. Computed results for a wide range of periodic and nonperiodic materials, *RSC Adv.* 6 (2016) 45727–45747.

<sup>29</sup>M. Dion, H. Rydberg, E. Schröder, D.C. Langreth, B.I. Lundqvist, Van der Waals density functional for general geometries, *Phys. Rev. Lett.* 92 (2004) 246401–246404.

<sup>30</sup>G. Strang, G. J. Fix, *An Analysis of the Finite Element Method*. (1973) Prentice-Hall, Inc.



## **1.5. Objetivos generales de esta tesis**

En el presente trabajo se pretenden desarrollar nuevos métodos de síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) que sean sencillos, económicos, rápidos y amigables con el medio ambiente, empleando productos naturales. En una segunda etapa, se busca implementar métodos novedosos para la caracterización de estos nanomateriales utilizando Electroforesis Capilar (EC), Espectroscopía Raman, Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie (SERS) y la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), que brinden información valiosa acerca del producto obtenido. Por último, se pretenden evaluar posibles aplicaciones de las AgNPs obtenidas en esta Tesis para el control de calidad de productos apícolas. Desde el punto de vista experimental, se estudia el empleo de las AgNPs para la identificación de Oxitetraciclina en muestras de miel mediante SERS. Por otro lado, empleando DFT se intentan estudiar las propiedades de sistemas de nanotubos de carbono decorados con metales de transición en el desarrollo de sensores de glucosa.

# **CAPÍTULO 2**

## Síntesis de nanopartículas de plata

### 2.1. Introducción

La síntesis de nanopartículas (NPs), por métodos fisicoquímicos, involucra normalmente una sal, que contiene el catión del metal que formará la NP, un agente reductor, que reaccionará con dicho catión llevándolo al estado metálico y un agente estabilizante que mantendrá las partículas formadas en suspensión<sup>1</sup>.

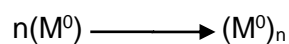
El mecanismo general de reacción por el cual se obtienen las nanopartículas metálicas puede dividirse en tres etapas<sup>2</sup> y puede representarse a través de una curva sigmoidea (absorbancia en función del tiempo) como se observa en la Figura 2.1<sup>3</sup>.

1- Nucleación: es lenta, continua y homogénea y se subdivide en:

a) Reducción del catión a su especie metálica:

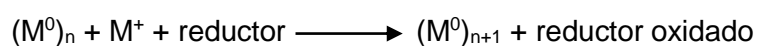


b) Formación del núcleo crítico:



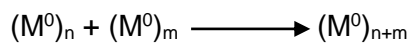
Corresponde al paso determinante de la reacción y está limitado por la lenta reducción del catión metálico proveniente de la sal. Esta etapa, se asocia al primer tramo de la curva con pendiente cercana a cero, donde la absorbancia casi no se incrementa con el tiempo. Posteriormente, se genera la formación del núcleo crítico ligeramente más veloz y apreciándose, por ende, un leve incremento de la señal<sup>3</sup>.

2- Reducción autocatalítica de superficie. Es del tipo de reacciones:  $A+B \rightarrow 2B$  donde el producto es también reactivo.



Es la etapa más rápida de la síntesis y se asocia al salto drástico observado en la Figura 2.1. Es aquí donde los cationes se reducen utilizando como catalizador la superficie del núcleo crítico. Posteriormente, el átomo reducido se incorpora a la superficie, dando lugar al crecimiento de la partícula.

3- Crecimiento por aglomeración difusiva: en esta zona, las partículas se unen para formar otra más grande, es decir se aglomeran.



Esta etapa es lenta y corresponde a la meseta de la Figura 2.1. Puede ser un proceso indeseado, pues esta fusión puede dar lugar a la formación de partículas de mayor tamaño como micropartículas o mesopartículas. Para evitar este efecto los agentes bloqueantes o “capping” son relevantes. Estas moléculas se adsorben sobre la superficie de la nanopartícula, de manera física o química, provocando un efecto repulsivo entre ellas.

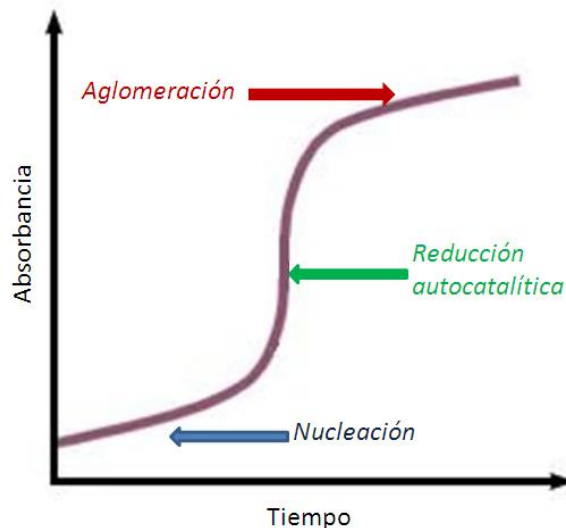


Figura 2.1. Esquema de la cinética de síntesis en NPs.

A lo largo de los últimos años, diversos métodos para la síntesis y estabilización de nanopartículas en general, y de plata (AgNPs) en particular han sido desarrollados. Dichos métodos emplean reducciones fisicoquímicas y electroquímicas<sup>4</sup>.

Los métodos clásicos usualmente usados para la obtención de nanopartículas son costosos, riesgosos para la salud y consumen altas cantidades de energía<sup>5,6</sup>. Un ejemplo de estos es la reducción de sales de plata con borohidruro de sodio, compuesto altamente tóxico y corrosivo al contacto con la piel, además de inflamable<sup>7</sup>. Recientemente, el desarrollo de métodos más económicos y menos nocivos para el medioambiente, utilizando productos naturales, ha captado el interés de muchos investigadores. Raveendran y col. llevaron a cabo la síntesis de nanopartículas de plata utilizando glucosa como agente reductor y almidón como agente bloqueante, trabajando a 40 °C durante 20 horas<sup>8</sup>. Otros autores utilizaron este carbohidrato y hemicelulosa como agente capping, empleándose además un calentamiento por microondas<sup>9</sup>. Otras estrategias implicaron el uso de extractos naturales de plantas o semillas. Dhand y col., estudiaron la síntesis de estas nanopartículas empleando un extracto hidroalcohólico de semillas de café tostado, agitando durante 10 minutos. Posteriormente se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente<sup>10</sup>. Begum y col. utilizaron extractos de hojas de té negro para obtener AgNPs. La síntesis requiere diversos pasos de filtración para remover la materia insoluble. La reacción se lleva a cabo en un tiempo mayor a 1 hora<sup>11</sup>. Baghizadeh y col. emplearon extracto de semillas de *Caléndula officinalis*, siendo necesarios varios pasos de lavado y extracción<sup>12</sup>. En la literatura abierta existen reportes de síntesis de AgNPs monodispersas esféricas usando miel como agente reductor y estabilizante a pH 8,50<sup>13</sup>. Esta síntesis emplea grandes cantidades de miel, lo cual podría perjudicar la separación y purificación de dichas AgNPs para su posterior aplicación. En este trabajo no se informan los componentes responsables de la reducción de los iones plata, así como tampoco los responsables de la estabilidad de los coloides. Los autores<sup>13</sup> reportan que a pH ácido no pudo llevarse a cabo la síntesis correspondiente. Sreelakshmi y col. sintetizaron AgNPs con diferentes concentraciones de miel. Las mismas insumen un tiempo de 3 horas<sup>14</sup>.

## 2.2. Objetivos

En este trabajo se realiza la síntesis de AgNPs a partir de soluciones acuosas de miel en medio acuoso. Estas nanopartículas se caracterizan evaluando tamaño, distribución de tamaño, forma y función de los hidratos de carbono mayoritarios de la miel en su formación. El método propuesto contempla los principios de la Química Verde.

## 2.3. Experimental

### 2.3.1. Instrumentación

- Espectrofotómetro UV-Vis. Agilent Cary 60.
- Microscopio de transmisión electrónica JEOL 100 CX II.
- Rigaku Thermoflex TG 8110 acoplado a Thermal Analysis Station TAS 100.

### 2.3.2. Reactivos y soluciones

Los reactivos empleados poseen pureza de grado analítico. Se utilizó agua de calidad miliQ (18 M $\Omega$ ).

-Solución de Nitrato de Plata ( $\text{AgNO}_3$  Merck 99,9%)  $5,88 \times 10^{-3}$  M: Se preparó disolviendo 0,0998 g de la sal en 100,0 mL de agua.

- Solución de hidróxido de sodio 0,1 M (NaOH): Se preparó disolviendo 0,40 g en 100,0 mL de agua.

-Solución de miel: empleando una miel comercial proveniente de la región de Bahía Blanca se preparó una solución acuosa al 25% (m/v). Se determinó el contenido de glucosa en este producto apícola, empleando un kit enzimático (Wiener kit Glicemia enzimática AA,

Argentina) basado en el método propuesto por Tinder en 1969<sup>15</sup>. A partir de esta solución se realizaron las correspondientes diluciones en agua, cuyas concentraciones varían entre 0,015% (m/v) y 0,250% (m/v).

- Soluciones de Glucosa ((Sigma-Aldrich) al 7,82% (m/v) y D (-) Fructosa (Sigma-Aldrich) 9,55% (m/v): se prepararon disolviendo la cantidad apropiada en 10,0 mL de agua.

### **2.3.2. Síntesis de AgNPs**

#### *A partir de miel*

Para realizar esta síntesis se emplearon 265  $\mu\text{L}$  de  $\text{AgNO}_3$  ( $5,88 \times 10^{-3}$  M) y 40  $\mu\text{L}$  de la solución de miel (25% (m/v)) ajustando el pH a 5,00 y 10,0 con hidróxido de sodio 0,1 M. Se llevó a un volumen final de 10,0 mL con agua mili Q y se agitó enérgicamente en un vórtex durante 1 minuto. Las concentraciones óptimas de  $\text{AgNO}_3$  y miel son  $1,56 \times 10^{-4}$  g% y 0,100 g%, respectivamente.

#### *A partir glucosa y fructosa*

Se sintetizaron AgNPs utilizando glucosa, fructosa, así como también una mezcla de ambas. Se emplearon concentraciones similares de estos hidratos de carbono a los encontrados en la composición de la miel comercial. Se procedió de la misma manera que en el caso anterior.

### **2.3.3. Caracterización de AgNPs**

-Plasmones de resonancia superficial localizado

Los plasmones de resonancia superficial localizado (LSPR) de las soluciones coloidales de las AgNPs sintetizadas, se midieron empleando un Espectrofotómetro UV-Vis, La cubeta utilizada para las medidas fue de cuarzo para detectar posibles bandas en la región del UV.

-Microscopía de transmisión electrónica

Se obtuvieron las imágenes de los nanomateriales sintetizados empleando un microscopio de transmisión electrónica. Para su medición, dos gotas de cada dispersión se colocaron en una malla de cobre y se dejó secar a temperatura ambiente.

-Análisis termogravimétrico.

Las AgNPs sintetizadas con miel y con glucosa a pH 10,00 fueron liofilizadas a -40°C en ultra vacío en un Liofilizador Rificor L-A-B4 y pesadas en balanza analítica para sus posteriores análisis térmicos por Termogravimetría (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA) en atmósfera de nitrógeno. En este trabajo se utilizaron estos métodos con el fin de evaluar la capacidad de la glucosa para actuar como “*capping*”.

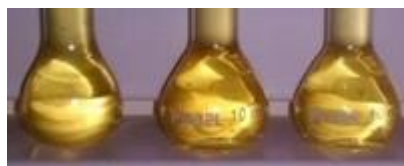
## **2.4. Resultados y discusión**

### **2.4.1. Síntesis de AgNPs a partir de miel**

Con las condiciones experimentales óptimas se realizaron las síntesis correspondientes. La aparición del color característico amarillo-marrón claro, evidencia la formación de las AgNPs, como puede observarse en la Figura 2.2. La reacción de síntesis

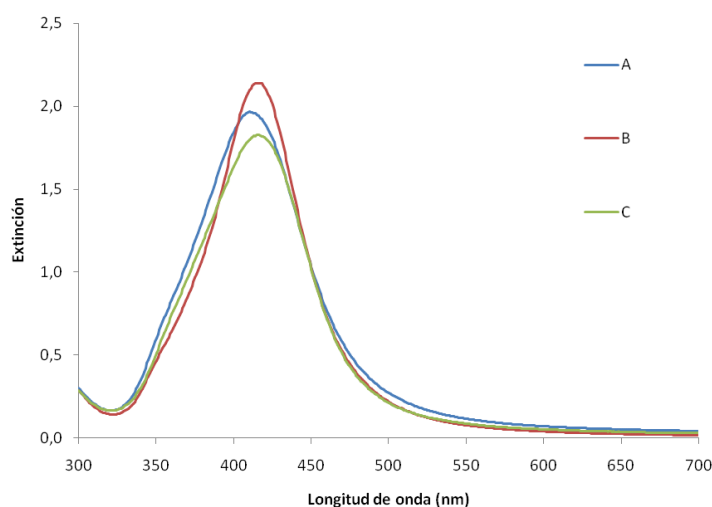


realizada en medio ácido permitió estudiar la cinética de la reacción. En medio alcalino, la reacción no pudo seguirse cinéticamente debido a la rapidez de la misma.



**Figura 2.2.** AgNPs sintetizadas con miel como agente reductor y estabilizante.

La Figura 2.3 muestra el espectro de extinción de AgNPs sintetizadas con miel en las condiciones previamente mencionadas en la sección anterior. Puede observarse, el máximo característico de las AgNPs alrededor de 411 nm<sup>13</sup>. Los LPRS muestran un ancho de banda estrecho correspondiente a partículas esféricas, monodispersas y de tamaños pequeños<sup>16</sup>. Por otro lado, estas NPs mostraron ser estables por un año.



**Figura 2.3.** (A) AgNPs sintetizadas con miel a pH 5,00. (B) AgNPs sintetizadas con miel a pH 10,00. (C) AgNPs sintetizadas con miel a pH 5,00 luego de un año.

#### 2.4.1.1. Optimización de las variables de la síntesis

Se estudiaron las variables involucradas en la formación de AgNPs: concentraciones de hidróxido de sodio y miel, y tiempo de agitación, observando los correspondientes LSPR. En todos los casos la concentración de nitrato de plata se mantuvo fija ( $1,56 \times 10^{-4}$  M) a fin de no saturar las señales de extinción durante las mediciones por espectroscopía UV-Visible.

- Hidróxido de sodio

Se utilizó NaOH 0,1M con la finalidad de trabajar a pH ácido o alcalino. Para llevar el medio de reacción a pH 10,00 se utilizaron 500  $\mu$ L de esta solución. Cuando se trabaja en medio ácido, es necesario un agregado de 50  $\mu$ L NaOH para la apertura de los anillos de glucosa y la posterior reducción de los cationes de plata.

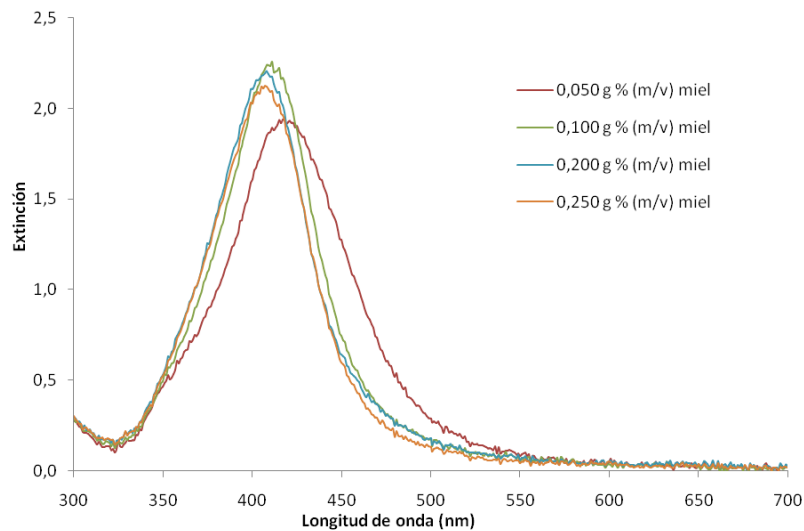
- Concentración de miel

Se evaluó el efecto de la concentración de miel en la obtención de AgNPs a pH 5,00 y 10,00, siguiendo el comportamiento de los LPRS de las mismas.

- pH 10,00

Las concentraciones de miel analizadas fueron: 0,050; 0,100; 0,200 y 0,250 g% (m/v). Los plasmones de resonancia obtenidos con concentraciones 0,100; 0,200 y 0,250 g% (m/v) presentan bandas angostas y un máximo a 408 nm, característico de AgNPs. Por otro lado, no se observan diferencias notorias entre las tres concentraciones estudiadas. Trabajando con una concentración de miel de 0,050 g% (m/v) la longitud de onda máxima, se desplaza a valores mayores (415 nm) y se obtiene un mayor ancho medio del plasmón debido probablemente a una mayor dispersión de tamaños en las NPs (Figura 2.4). Por ende, se

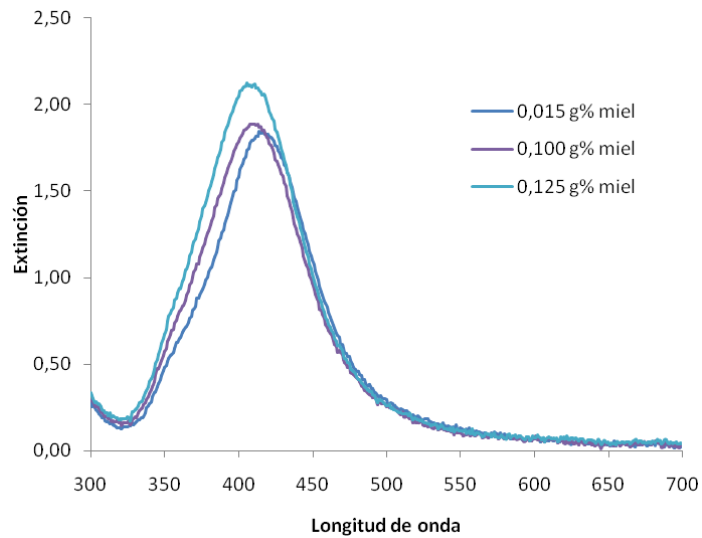
eligió trabajar a una concentración de miel de 0,100 g% (m/v) para llevar a cabo las reacciones de síntesis.



**Figura 2.4:** Espectros de extinción de AgNPs a pH 10,00, con diferentes concentraciones de miel.

-pH 5,00

Un análisis similar se llevó a cabo cuando la reacción procedió en medio ácido. Trabajando con una concentración de miel de 0,100 g% (m/v) se observa un plasmón angosto con un máximo a 411 nm. Una concentración de miel de 0,015 g% (m/v) muestra un leve desplazamiento del plasmón hacia longitudes de onda mayores. Asimismo, una concentración mayor (0,125 g% (m/v)), si bien muestra un aumento en la señal, no evidencia un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda menores.



**Figura 2.5.** Espectros de extinción de AgNPs a pH 5,00 con diferentes concentraciones de miel.

- Tiempo de agitación en vórtex

El tiempo de agitación óptimo fue de 1 minuto, no existiendo cambios al aumentar el mismo. Valores menores no mostraban plasmones reproducibles.

#### 2.4.2. Caracterización de las AgNPs

Con la finalidad de evaluar las características de la AgNPs obtenidas, se estudió la influencia de la fructosa y glucosa, hidratos de carbono predominantes en la miel, en la síntesis. Para ello se sintetizaron AgNPs empleando fructosa, glucosa y una mezcla de ambas. Por otro lado, se evaluó el tamaño, distribución de tamaño y forma de las mismas.

#### 2.4.2.1. Función de los hidratos de carbono en la síntesis de AgNPs

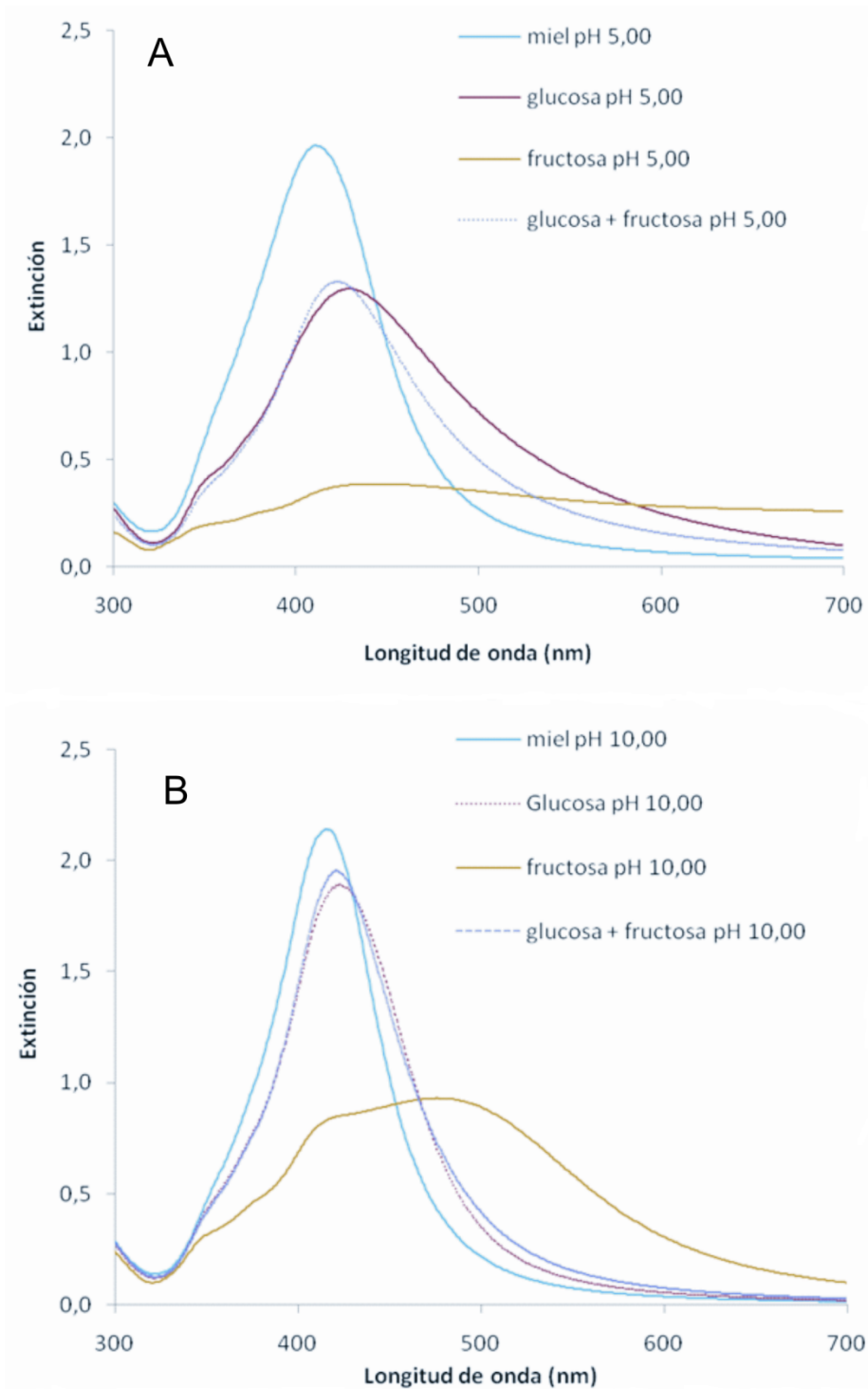
Se sintetizaron AgNPs empleando fructosa, glucosa y su combinación. Los LSPR obtenidos en cada caso se comparan con los aquellos correspondientes a AgNPs sintetizadas a partir de miel (Figura 2.6).

Las AgNPs obtenidas a partir de fructosa, a pH 10,00 muestran una banda muy ancha y de baja intensidad. Por otro lado, a pH 5,00 el LSPR no está definido. La fructosa, si bien no es un azúcar reductor, puede pasar a glucosa por medio de tautomerizaciones ceto enólicas en medio alcalino. Por este motivo, a pH 5,00 prácticamente no se observa LPRS alguno. Sin embargo, a pH 10,00, una banda poco simétrica, sin un máximo bien definido, con una señal relativamente baja y de un ancho medio considerable, se hace presente. Esto indica gran polidispersión de tamaños y escasa efectividad en la síntesis de AgNPs.

En el caso de las AgNPs obtenidas con **glucosa**, a ambos pH, puede observarse el LSPR alrededor de 420 nm y un “hombro” alrededor de los 350 nm debido a la presencia de algunas AgNPs con forma de nanoprismas, las cuales suelen presentar señales de extinción a la longitud de onda mencionada <sup>16</sup>.

En el caso de realizar la síntesis con glucosa y fructosa, se observa que la presencia de fructosa, no evidencia cambios notorios en el LSPR. A pH 10,00 se observa una banda con forma levemente más simétrica y con un máximo más cercano a los 411 nm. Este efecto es mucho más evidente a pH 5,00.

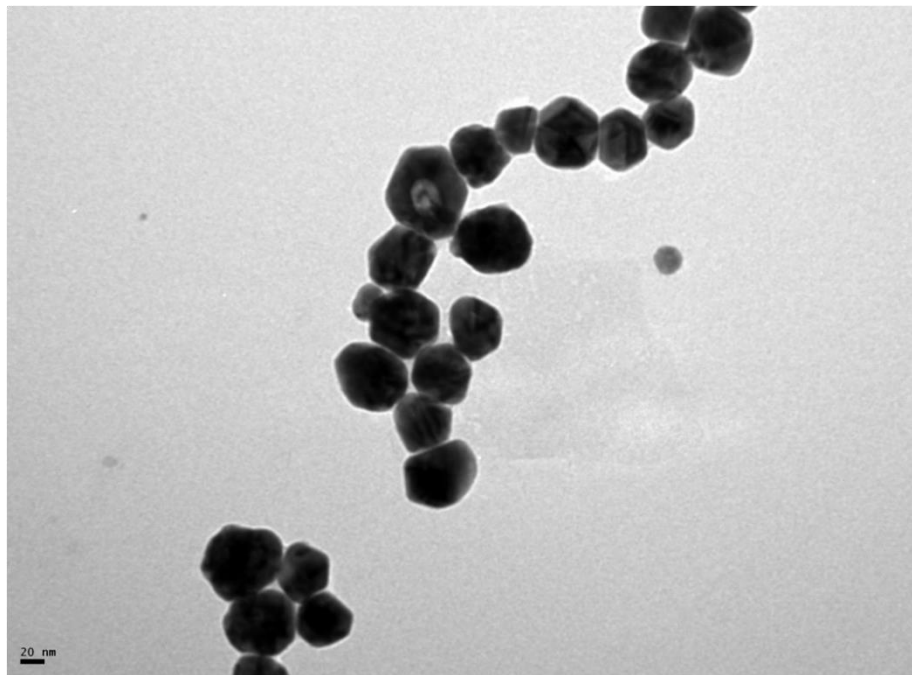
Las AgNPs sintetizadas con miel presentaron los mejores plasmones, en cuanto a intensidad, ancho de banda medio y longitud de onda máxima. Por lo descrito anteriormente, puede asumirse un rol significativo por parte de la glucosa, ya que por sí sola es capaz de sintetizar AgNPs. A ambos valores de pH, la miel muestra ser más eficiente que sus principales azúcares por separado, por lo cual puede inferirse que existe un aporte de otros componentes minoritarios presentes en el producto apícola que favorece la obtención de estas nanopartículas.



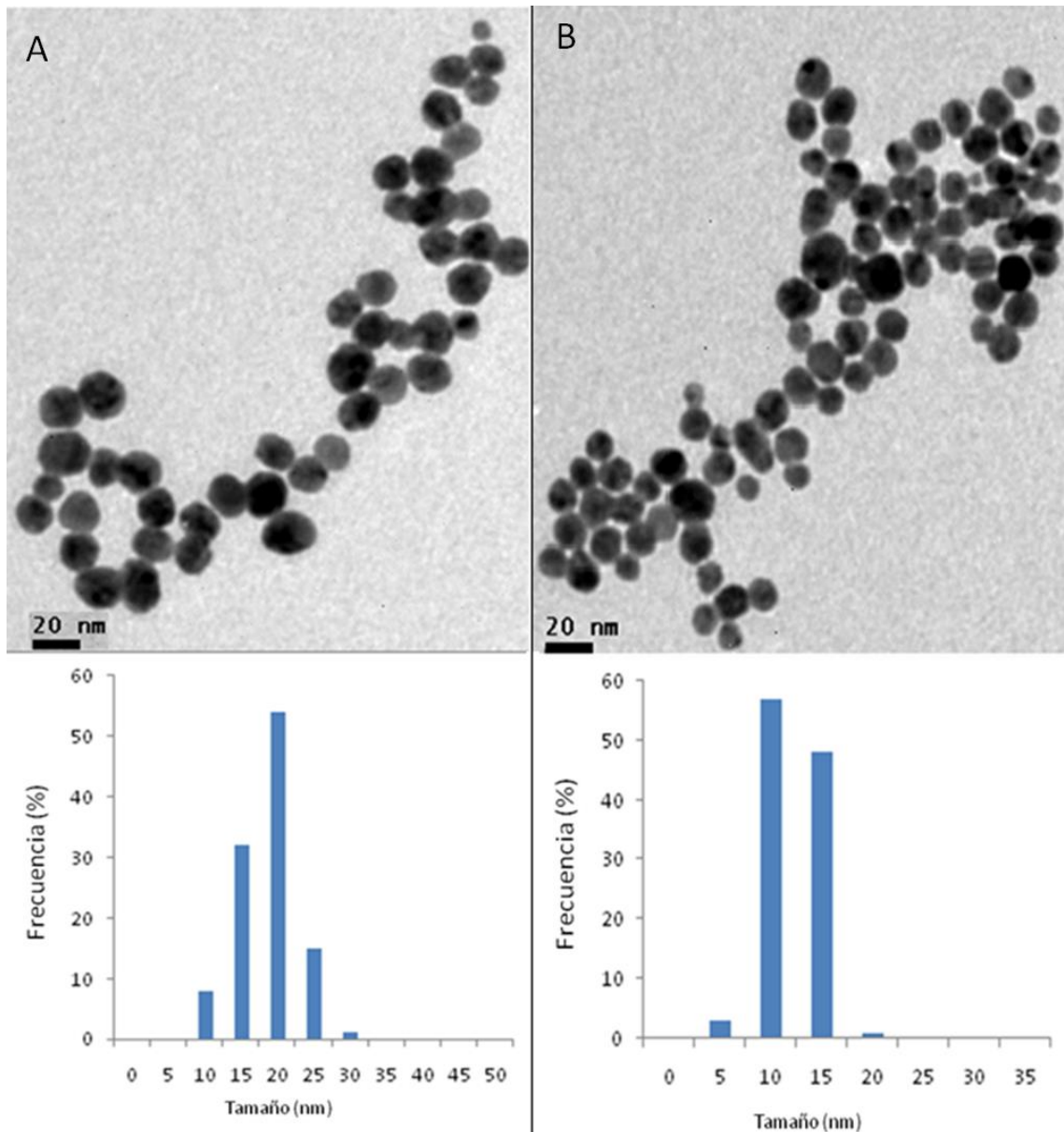
**Figura 2.6.** LPRS de AgNPs obtenidas con miel y sus principales carbohidratos, A) pH 5,00. B) pH 10,00.

#### 2.4.2.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) es una técnica ampliamente utilizada en la caracterización de NPs. Las AgNPs sintetizadas fueron sometidas a este procedimiento con el fin de determinar su tamaño y distribución de tamaños. Las dispersiones estudiadas fueron AgNPs sintetizadas con glucosa a pH 10,00 y con miel a pH 5,00 y 10,00. La Figura 2.7 muestra la micrografía TEM de AgNPs sintetizadas a partir de **glucosa** a pH 10,00 que presentan formas prismáticas con un tamaño de partícula medio de 50 nm. El gráfico de distribución de tamaños refleja un sistema polidisperso. En la Figura 2.8 se observan micrografías TEM de AgNPs sintetizadas con miel a pH 5,00 (A) y 10,00 (B) con su correspondiente distribución de tamaños. Se puede apreciar un tamaño promedio de 20 nm y 10 nm a pH 5,00 y 10,00, respectivamente. Además, una mayor polidispersión de tamaños para las AgNPs obtenidas a pH 5,00 comparadas con las sintetizadas a pH 10,00. Estos estudios se corresponden con lo observado en el análisis del LPRS.



**Figura 2.7.** Micrografías TEM de AgNPs obtenidas con glucosa a pH 10,00.



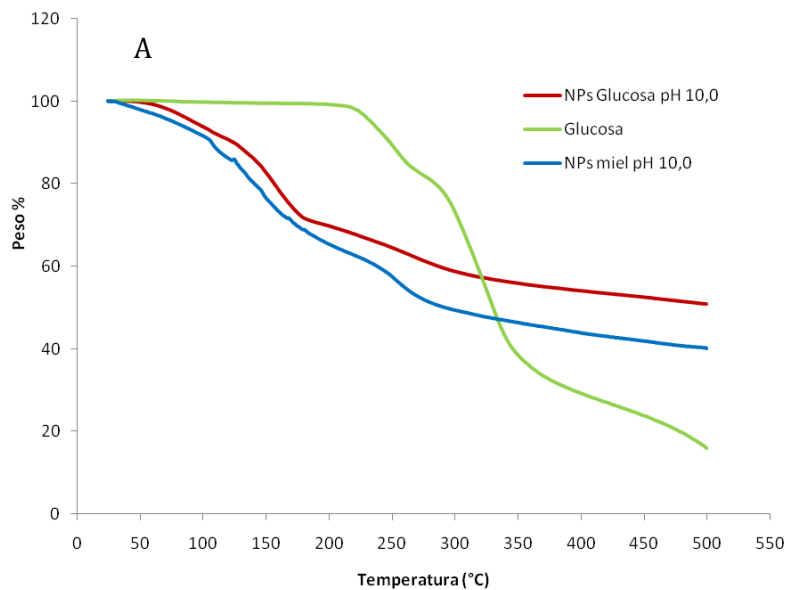
**Figura 2.8.** Micrografías TEM de AgNPs obtenidas de miel junto con sus histogramas de distribución de tamaños: (A) pH 5,00 y (B) pH 10,00.

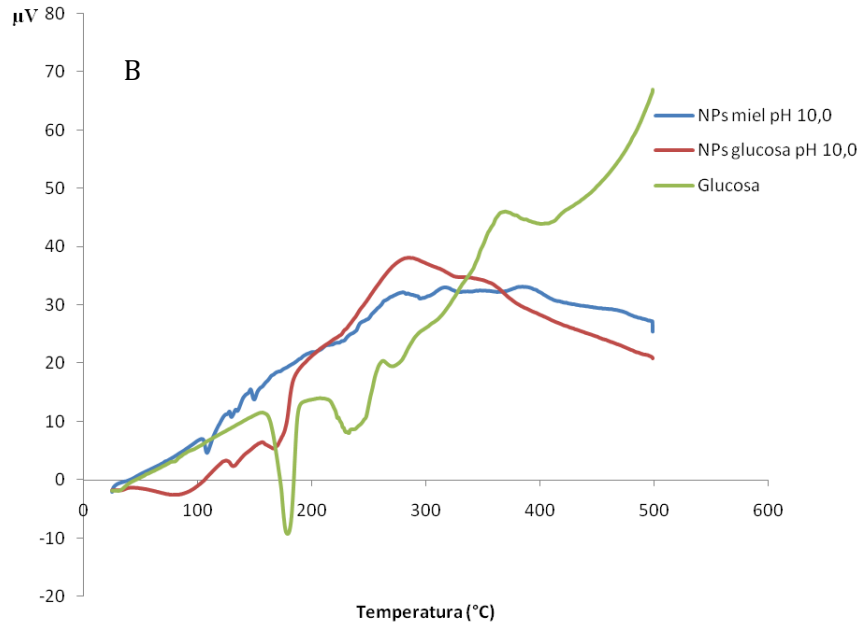
### 2.4.2.3. Termogravimetría

La Figura 2.9A muestra los resultados termogravimétricos de la glucosa y de las AgNPs obtenidas con glucosa y con miel, en ambos casos a pH alcalino. En este gráfico puede observarse un comportamiento muy similar para ambas AgNPs. Una disminución de masa inicial desde los 50 °C a los 170 °C puede deberse a la evaporación de agua, tanto libre como ligada. En una segunda etapa otra pérdida de masa, que representa el 40% del peso



total de las AgNPs, es apreciable y es posible que se deba a la pirólisis de glucosa adsorbida a la superficie de éstas<sup>17</sup>. La Figura 2.9B presenta nuevamente resultados similares para ambas AgNPs con un pico endotérmico cerca de los 300 °C. El análisis termogravimétrico de la glucosa no muestra pérdida de masa alguna antes de su punto de pirolisis, para luego presentar cambios significativos debido a sus procesos de descomposición<sup>18</sup>. El gráfico DTA del carbohidrato muestra en 170 °C un pico endotérmico correspondiente a su fusión. Del análisis de ambos estudios puede apreciarse que existen grandes diferencias en el comportamiento de la glucosa libre y la utilizada en la síntesis de AgNPs, a la vez que se evidencian similitudes entre estas AgNPs y las obtenidas con miel. Por lo tanto, puede inferirse un rol bloqueante por parte de la glucosa sobre estas partículas, ya que, al estar adsorbidas las moléculas del azúcar a la superficie de plata, cambian su comportamiento térmico con respecto a la glucosa libre.





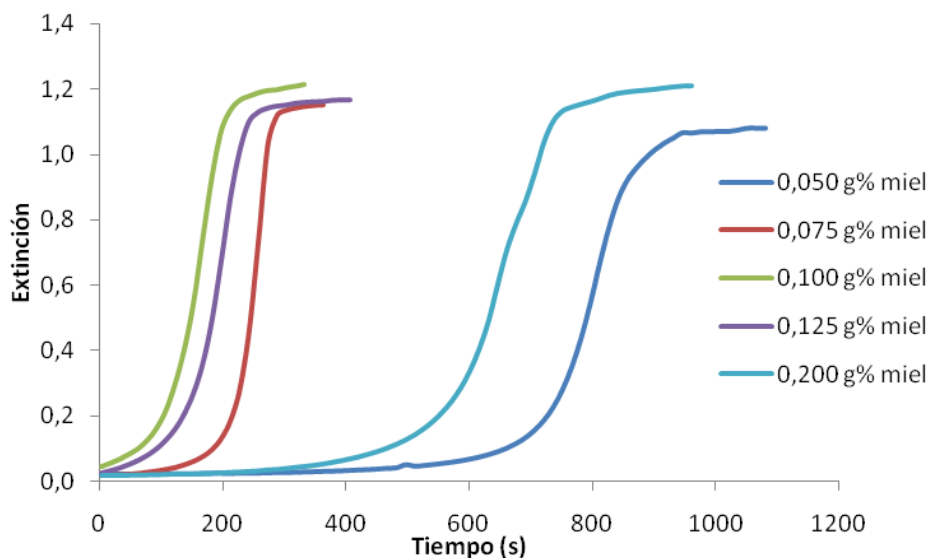
**Figura 2.9.**TGA (A) y DTA (B) de AgNPs, y Glucosa aislada.

### 2.4.3. Cinética de la reacción de síntesis de AgNPs

Se llevó a cabo un estudio de la cinética de la reacción de síntesis de AgNPs obtenidas a partir de miel, midiendo la señal de extinción de los LPRS en función del tiempo. Este seguimiento sólo pudo hacerse a pH ácido, ya que, en condiciones alcalinas la reacción es instantánea, haciendo imposible realizar dicho análisis. La presencia de grupos oxhidrilos puede acelerar la síntesis en las primeras etapas al reaccionar con los cationes  $\text{Ag}^+$  formando un óxido ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), para luego dar lugar a un complejo del tipo  $\text{Ag}(\text{OH})_x$ , el cual incrementa la velocidad de nucleación, al ser más rápida la aparición de  $\text{Ag}^0$ . Nishimura y col.<sup>19</sup> propusieron dicho mecanismo para la reacción en medio alcalino, mientras que en medio ácido afirman que transcurre la reducción directa del catión  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  siendo más lenta que el mecanismo propuesto anteriormente. Cabe destacar que la presencia de oxhidrilos es fundamental para la apertura del anillo de glucosa (principal agente reductor en la presente síntesis) a su forma lineal con el grupo aldehído disponible para reducir el catión  $\text{Ag}^+$ .

Cuando las reacciones se realizan a pH 5,00, las curvas obtenidas son del tipo sigmoideas (ver Figura 2.1) como las descritas al principio de este Capítulo.

Se procedió a analizar la influencia de la concentración de miel, agente reductor y estabilizante, en la cinética de la reacción. Para ello se siguió el aumento del LPRS a una longitud de onda de 411 nm en función del tiempo.



**Figura 2.10.** Cinética de la reacción de síntesis con distintas concentraciones de miel.

Como puede observarse en la Figura 2.10, con una concentración de miel de 0,050 g% (menor concentración) es mayor el tiempo de la etapa de nucleación. A medida que aumenta la concentración de miel, disminuye el tiempo de la etapa de nucleación. Esto puede observarse en las curvas de 0,075 y 0,100 g% miel. Estos resultados indican que, a mayor concentración del agente reductor, mayor es la velocidad de la reacción. Sin embargo, al aumentar las concentraciones de miel por encima de 0,100g%, comienza a aumentar nuevamente el tiempo de la etapa de nucleación. Esto podría deberse a la capacidad amortiguadora de la miel<sup>20</sup>. Al haber mayor cantidad de estos sistemas amortiguadores, los oxhidrilos podrían tender a consumirse antes de actuar sobre el anillo de glucosa, impidiendo la apertura del mismo y por ende retrasando la reacción.

## 2.5. Conclusiones parciales

La síntesis de AgNPs utilizando miel en medio acuoso se estudió en medio ácido y alcalino a temperatura ambiente. Los estudios realizados indican que la glucosa presente en la miel actúa como reductor. Además, los análisis térmicos sugieren que este azúcar también puede comportarse como agente estabilizante. Por su parte, la fructosa no mostró tener un efecto significativo sobre la formación de AgNPs. Las partículas de plata sintetizadas con glucosa son de mayor tamaño que las obtenidas con miel y presentan una mayor diversidad de formas, mostrando que los componentes minoritarios presentes en el producto apícola tienen un efecto significativo sobre la formación de nanopartículas. La microscopía electrónica de transmisión mostró que las AgNPs preparadas con miel tenían tamaños promedio de  $18,4 \pm 0,9$  nm y  $12,3 \pm 0,6$  nm para pH 5,00 y 10,00, respectivamente. Las imágenes también mostraron que las nanopartículas eran principalmente esféricas. El estudio de la cinética de formación se realizó mediante el seguimiento de los plasmones de resonancia superficiales localizados. La velocidad de reacción mostró depender tanto del pH como de la concentración de miel.

La síntesis propuesta es simple, rápida, de bajo costo y evita el uso de sustancias peligrosas y tóxicas, contribuyendo a los objetivos de la Química Verde.

## 2.6. Referencias

---

<sup>1</sup> L. Kvi, R. Vec, Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 16248–16253.

<sup>2</sup>D. Feldheim, C. Foss, Jr. Metal Nanoparticles. Synthesis, Characterization, and Applications, (2002), Marcel Dekker, Inc. ISBN: 0-8247-0604-8

- 
- <sup>3</sup> V. Tatarchuk, A. Sergievskaya, T. Korda, I. Druzhinina, V. Zaikovsky, Kinetic factors in the synthesis of silver nanoparticles by reduction of Ag<sup>+</sup> with hydrazine in reverse micelles of Triton N-42, *Chem. Mater.* 25 (2013) 3570–3579.
- <sup>4</sup> D.T. Thuc, T.Q. Huy, L.H. Hoang, B.C. Tien, P. Van Chung, N.T. Thuy, A.T. Le, Green synthesis of colloidal silver nanoparticles through electrochemical method and their antibacterial activity, *Mater. Lett.* 181 (2016) 173–177.
- <sup>5</sup> R. Janardhanan, M. Karuppaiah, N. Hebalkar, T.N. Rao, Synthesis and surface chemistry of nano silver particles, *Polyhedron.* 28 (2009) 2522–2530.
- <sup>6</sup> S. Wojtysiak, A. Kudelski, Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 410 (2012) 45–51.
- <sup>7</sup> [toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~npTD3E:1](http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~npTD3E:1)
- <sup>8</sup> P. Raveendran, J. Fu, S.L. Wallen, C. Hill, N. Carolina, Completely “ Green ” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13940–13941.
- <sup>9</sup> H. Peng, A. Yang, J. Xiong, Green, microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using bamboo hemicelluloses and glucose in an aqueous medium, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 348–355.
- <sup>10</sup> V. Dhand, L. Soumya, S. Bharadwaj, S. Chakra, D. Bhatt, B. Sreedhar, Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity, *Mater. Sci. Eng. C.* 58 (2016) 36–43.
- <sup>11</sup> N.A. Begum, S. Mondal, S. Basu, R.A. Laskar, D. Mandal, Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts, *Colloids Surf. Bs.* 71 (2009) 113–118.

---

<sup>12</sup> A. Baghizadeh, S. Ranjbar, V.K. Gupta, M. Asif, S. Pourseyedi, M.J. Karimi, R. Mohammadinejad, Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase, *J. Mol. Liq.* (2015).

<sup>13</sup> D. Philip, Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 75 (2010) 1078–1081.

<sup>14</sup> C. Sreelakshmi, K.K.R. Datta, J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, Honey Derivatized Au and Ag Nanoparticles and Evaluation of Its Antimicrobial Activity, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11 (2011) 6995–7000.

<sup>15</sup> P. Trinder, *Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry in Medicine*, *Ann. Clin. Biochem.* 6 (1969) 22-27.

<sup>16</sup> K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 668–677.

<sup>17</sup> A.E. Pavlath, K.S. Gregorski, *Thermoanalytical Studies of Carbohydrate Pyrolysis, Fundamentals of Thermochemical Biomass Conversion*, (1985), ISBN 978-94-009-4932-4.

<sup>18</sup> F. Orsi, Kinetic Studies on the Thermal Decomposition of Glucose and Fructose, *J. Therm. Anal.* 5 (1973) 329–335.

<sup>19</sup> S. Nishimura, D. Mott, A. Takagaki, S. Maenosono, K. Ebitani, Role of base in the formation of silver nanoparticles synthesized using sodium acrylate as a dual reducing and encapsulating agent, *Phys. Chem. Phys.* 13 (2011) 9335–9343.

<sup>20</sup> A. Shugaba, Analysis of Biochemical Composition of Honey Samples from North-East Nigeria, *Biochem. Anal. Biochem.* 2 (2012) 1000139–1000146.

# **CAPITULO 3**

## **Nuevos métodos de caracterización de AgNPs Utilizando Electroforesis Capilar y Espectroscopía Raman**

### **3.1. Objetivo general**

En el presente capítulo se plantea como objetivo desarrollar nuevos métodos de caracterización de AgNPs sintetizadas a través de productos naturales. Para ello, se ha hecho uso de las siguientes técnicas:

-Electroforesis capilar (EC), para la determinación de tamaño y distribución, medidas de potencial z, movilidad electroforética y estabilidad de las partículas obtenidas.

-Espectroscopía Raman, con el fin de identificar las moléculas que actúan como agente bloqueante en la superficie de las AgNPs, así como buscar las configuraciones más probables de dichas moléculas y sus sitios de unión preferenciales sobre la superficie de plata.



## 3.2. Electroforesis capilar

### 3.2.1. Introducción

En la actualidad la implementación de nuevas herramientas para caracterizar las nanopartículas obtenidas por medio de nuevos métodos de síntesis, resulta de sumo interés. Entre las técnicas tradicionales utilizadas para dicha caracterización se pueden nombrar la microscopía de transmisión electrónica (TEM) y la dispersión dinámica de la luz (DLS). Sin embargo, algunos inconvenientes pueden presentarse en ambas situaciones. En el caso de la microscopía TEM<sup>1,2</sup>, si bien es útil para la determinación de tamaño y morfología de las partículas estudiadas, se observa poca exactitud en la distribución de los tamaños. Esto se debe principalmente al pequeño volumen de muestra tomada para su análisis, el cual puede no ser representativo de la misma, debido a la presencia de artefactos generados durante la preparación de la muestra como, por ejemplo, en el proceso de secado<sup>3</sup>. Por otra parte, DLS es comúnmente empleada en la determinación del tamaño hidrodinámico de partículas en suspensión. Aunque simple y rápida, esta técnica tiende a sobreestimar los resultados obtenidos debido al uso de un software específico de tratamientos de datos (como, por ejemplo, el algoritmo CONTIN), de esta forma no es posible describir de manera correcta los resultados para suspensiones bi o trimodales<sup>2</sup>. Por otra parte, ninguna de las técnicas previamente mencionadas involucra una separación de las partículas por tamaños, lo cual es una desventaja, ya que varias propiedades físicas o químicas dependen de esta distribución.

En la actualidad, existen investigaciones en la literatura donde se propone la Electroforesis Capilar (EC) para caracterizar nanopartículas en diferentes medios. En 2005, Liu y col. estudiaron la separación de AgNPs recubiertas con citrato, obtenidas por irradiación con microondas, empleando una combinación de EC y un detector con arreglo de diodos (DAD)<sup>4</sup>. Los mismos autores combinaron la detección de espectrometría de masa por plasma inducido (ICP-MS) con un método electrocinético capilar para evaluar la distribución de tamaño y la caracterización de AgNPs<sup>5</sup>. Esta técnica también fue empleada para la

especiación y cuantificación de AgNPs e iones  $\text{Ag}^+$  presentes en suplementos dietéticos comerciales<sup>6</sup>. Recientemente, una mezcla de nanopartículas de látex se caracterizó por medio de una separación en línea empleando EC combinada con un Análisis de Dispersión Taylor (TDA), basado en los coeficientes de difusión de cada zona de muestra<sup>7</sup>. Otros autores propusieron el acoplamiento de un DLS con evaporación (ELSD) a un equipo de EC para separar nanopartículas de oro recubiertas con citrato. Las mediciones fueron realizadas mediante un proceso de formación de pequeñas gotas, las cuales se obtuvieron por medio de un nebulizador. Posteriormente, se procedió a evaporar dichas gotas para que luego lleguen a un tubo de transferencia, el cual contiene un gas transportador, en donde se realizan las mediciones por DLS<sup>8</sup>. De la misma manera, se empleó un acoplamiento EC-ELSD para identificar y separar nanopartículas de sílice de diámetros de 20, 50 y 100 nm en solución acuosa<sup>9</sup>. Por otro lado, las nanopartículas de plata y oro se caracterizaron y cuantificaron mediante el uso de cromatografía electrocinética micelar (MEKC) combinado a un ICP-MS<sup>10</sup>. Aunque se ha demostrado que estos métodos son útiles para la separación y caracterización de diferentes nanopartículas, su principal limitación es la disponibilidad comercial de equipos y/o la fabricación y manejo de interfaces personalizadas.

### 3.2.2. Objetivos

Se propone el empleo de la técnica de EC como herramienta en la caracterización de AgNPs obtenidas por síntesis verde, con el propósito de determinar con una **única corrida electroforética**, tamaño y distribución, potencial zeta, movilidad electroforética y estabilidad de las AgNPs obtenidas.

### 3.2.3. Experimental

#### 3.2.3.1. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Se utilizó agua miliQ (18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>) para la preparación de las soluciones.

-Solución de separación (BGE): Se preparó empleando soluciones de tetraborato de sodio 20 mM (Baker) y de dodecilsulfato sódico (SDS) 20 mM (Cicarelli). Para ello se toman 1,0 mL de una solución de tetraborato de sodio 0,1M y 2,0 mL de una solución de SDS 0,1M y se lleva a un volumen final de 10,0 mL con agua. Se ajustó el pH a 8,50 con ácido clorhídrico (Cicarelli) 0,1M.

-Solución de Nitrato de Plata  $5,88 \times 10^{-3}$  M: Se preparó disolviendo 0,0998 g de la sal (Merck 99.9%) en 100,0 mL de agua.

- Solución de hidróxido de sodio 0,1 M: Se preparó disolviendo 0,40 g de NaOH (Anedra) en 100,0 mL de agua.

-Solución de miel: A partir de una miel obtenida de la región de Bahía Blanca se preparó una solución acuosa al 25% (m/v).

-Solución de Glucosa 7,82% (m/v): Se preparó disolviendo 0,7825 g de dicho hidrato de carbono (Sigma-Aldrich) en 10,0 mL de agua.

#### 3.2.3.2. Preparación de suspensiones coloidales (SC) de AgNPs

Se prepararon cinco suspensiones coloidales (SC) de AgNPs: SC1, SC2, SC3, SC4 y SC5. En todos los casos el volumen final fue de 10,0 mL. SC1 y SC2 fueron preparadas empleando una solución 0,10 g% (m/v) de miel y una solución  $1,56 \times 10^{-4}$  M de nitrato de plata llevándose finalmente a pH 5,00 y 10,00, respectivamente. Las suspensiones SC3 y SC4, se prepararon con nitrato de plata  $4,75 \times 10^{-3}$  M y dos soluciones de miel (0,038 g% m/v (SC3) y 0,46 g% m/v (SC4)), ambas a pH 10,00. Finalmente, SC5 se sintetizó con una solución de glucosa 0,069 g% (m/v) y una solución  $1,56 \times 10^{-4}$  M de nitrato de plata a pH 10,0. En todos los

casos se agitó vigorosamente mediante un vórtex durante un minuto hasta obtener el color amarillo-marrón característico de las AgNPs. Todas las suspensiones coloidales fueron centrifugadas hasta reducir su volumen a la mitad (35° C, 0,56 atm y 3000 rpm) utilizando una centrífuga- evaporadora Thermo Scientific, Speed Vac SPD11V.

### **3.2.3.3. Caracterización de las SC de AgNPs**

#### *Espectroscopía UV-Visible*

Los plasmones de resonancia superficial localizado (LSPR) se obtuvieron con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Cary 60.

#### *Microscopía de transmisión electrónica*

Las fotografías de las SC sintetizadas se obtuvieron empleando un microscopio de transmisión electrónica JEOL 100 CX II. Para su medición, dos gotas de cada dispersión se colocaron en una malla de cobre y se dejó secar a temperatura ambiente.

#### *Dispersión dinámica de la luz*

Para el análisis por dispersión dinámica de la luz, se realizó una dilución 1:6 de las SC en el BGE, para evitar posibles interferencias en las señales por la alta concentración de NPs o fenómenos de turbidez. Dicho estudio se realizó en un equipo Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments Ltd.) utilizando un láser de 663 nm de longitud de onda a un ángulo de 90 ° y una temperatura de 25 °C. Previo al análisis, las SC fueron sonicadas durante 10 min y filtradas empleando un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro.

### **3.2.3.4. Electroforesis Capilar**

La separación electroforética se llevó a cabo empleando un instrumento de electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE™ MDQ equipado con un detector con arreglo de diodos (Sciex, Redwood, CA, USA). El capilar de sílice presenta una longitud total de 62

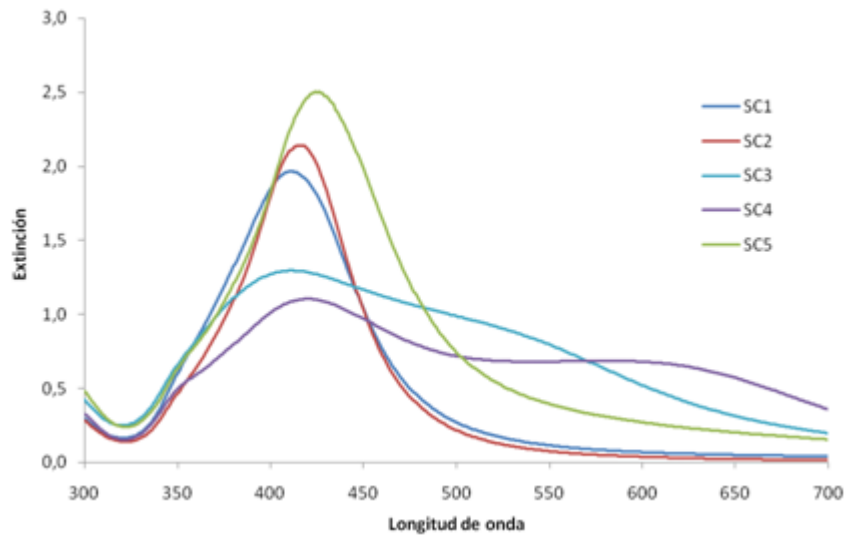
cm y una longitud efectiva de 51 cm, con diámetros interno y externo de 50  $\mu\text{m}$  y 375  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Se empleó como BGE una solución de tetraborato de sodio 20 mM y dodecilsulfato sódico 20 mM de pH 8,50. El voltaje de separación aplicado fue de 20 kV. La inyección de la muestra se realizó hidrodinámicamente aplicando 0,8 psi durante 10 s. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

### **3.2.4. Resultados**

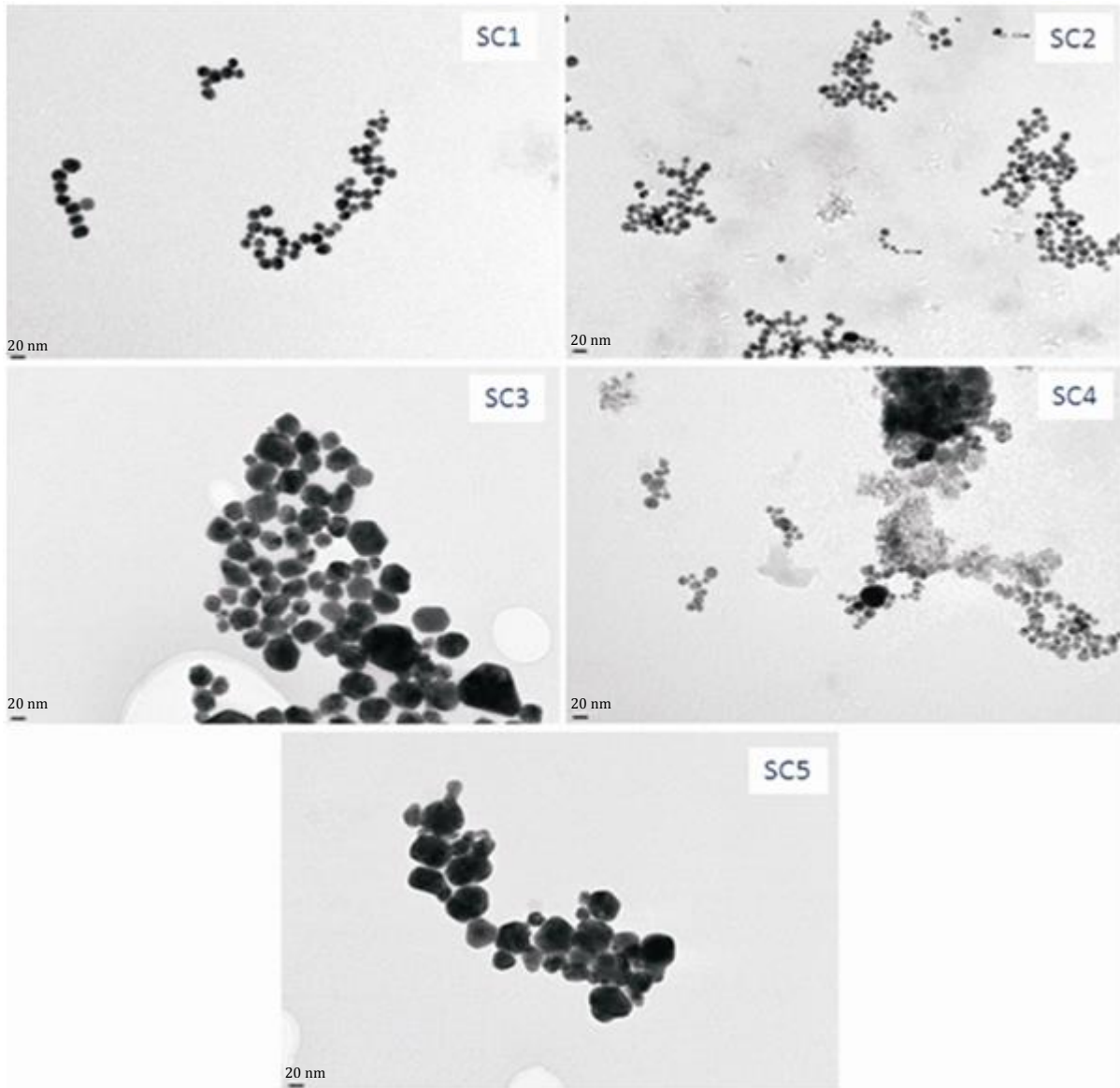
#### **3.2.4.1. Caracterización AgNPs por espectroscopía UV-Visible y Microscopía de Transmisión Electrónica**

En la Figura 3.1 se observan los plasmones de resonancia superficial localizado (LSPR) característicos de AgNPs, alrededor de los 411 nm, sintetizadas con miel a ambos valores de pH. Las bandas estrechas y simétricas de las suspensiones SC1 y SC2, indican una distribución monodispersa de partículas, de forma principalmente esférica que se correlaciona con las imágenes obtenidas por TEM<sup>11,12</sup>. En particular, para SC1, se observaron nanopartículas con un tamaño medio de 18 nm. Para la dispersión SC2, se obtuvo una banda de LSPR ligeramente más estrecha, que indica un tamaño de partícula menor que para SC1. Esto se confirma mediante análisis TEM mostrando AgNPs con un tamaño medio de 12 nm. En el caso de SC3 y SC4, las bandas de LSPR sugieren una distribución polidispersa de AgNPs con dos máximos y un ancho de banda considerablemente mayor que en los casos anteriores. La Figura 3.1 también muestra el LSPR de AgNPs obtenidas con glucosa a pH 10,0 (SC5). Se puede ver un corrimiento de 411 a 426 nm en la banda de plasmón con un aumento en el ancho de banda, con respecto a SC1 y SC2, lo cual es acorde con un aumento en el tamaño y polidispersión de las nanopartículas<sup>13</sup>. Además, en las suspensiones SC3, SC4 y SC5 se puede observar un pequeño “hombro” alrededor de 350 nm probablemente debido a la presencia de formas nanoprismáticas<sup>12,14</sup>. Las formas características y el tamaño de las nanopartículas se observaron en las imágenes TEM, en donde se confirmó la presencia

de nanoprismas y polidispersión para SC3, SC4 y SC5. El tamaño de las AgNPs varía entre 15 y 25 nm para SC1, 10 y 25 nm para SC2, 20 y 50 nm para SC3 y SC4 muestra nanopartículas de tamaño entre 10 nm y 20 nm. Con respecto al SC5, el tamaño medio fue de 30 nm de diámetro (Figura 3.2).



**Figura 3.1.** Plasmones de resonancia superficial localizada de las diferentes suspensiones coloidales.



**Figura 3.2.** Fotografías TEM de las diferentes Suspensiones Coloidales obtenidas.

#### **3.2.4.2. Caracterización de AgNPs por Dispersión Dinámica de la Luz**

La técnica DLS fue utilizada en la determinación de movilidad electroforética, potencial Z y tamaño. Para los dos primeros parámetros mencionados se evaluaron las SC1, SC2 y SC5, ya que poseen relación de concentraciones y tamaño de partículas muy similar entre sí, lo cual resulta adecuado para el análisis. Los valores de movilidad electroforética variaron entre -4,24 y -3,82 mV y los de potencial Z entre -3,80 y -3,85 mV. Para la determinación de tamaño se analizaron las cinco soluciones coloidales. Los valores obtenidos fueron 9,1; 10,5;

82; 89,5 nm; para SC1, SC2, SC3 y SC4, respectivamente; habiendo una distribución binomial para SC5 de 11,2 y 58,2 nm.

### **3.2.4.3. Desarrollo de un método de Electroforesis Capilar para la caracterización de AgNPs**

El método desarrollado permite determinar mediante una *única corrida electroforética*, la movilidad electroforética, potencial zeta y tamaño de nanopartículas de plata (AgNPs).

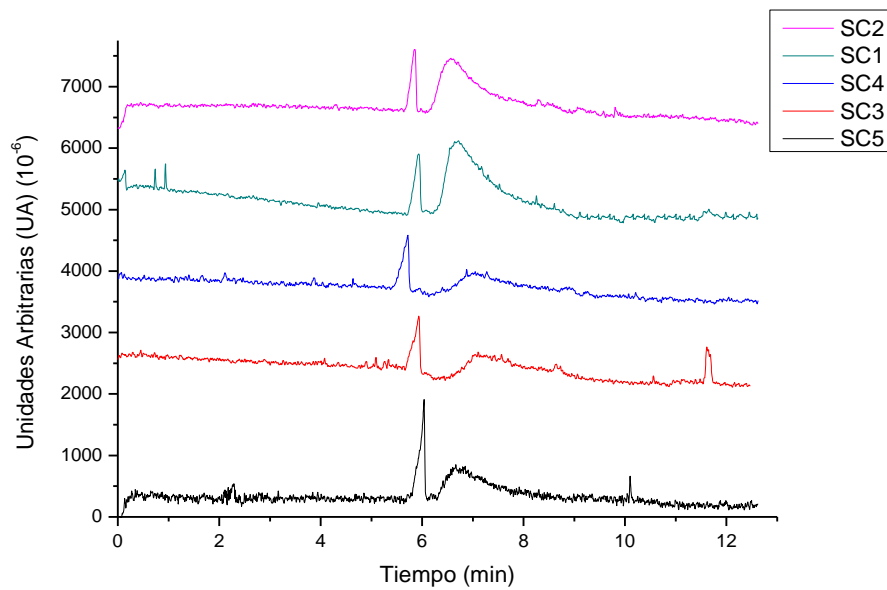
#### **3.2.4.3.1. Optimización de las variables de electroforesis capilar**

Se requiere el uso de un BGE que pueda asegurar la conductividad eléctrica y la fuerza iónica apropiadas con el fin de minimizar el ancho de los picos, la distorsión debido a la dispersión y calentamiento por efecto Joule durante la separación electroforética. Además, es necesario evitar la adsorción de las AgNPs a la pared del capilar durante la separación. Por lo tanto, se seleccionó una solución de BGE compuesta por borato de sodio 20 mM y SDS. Para obtener las variables químicas y operacionales óptimas, se estudió la concentración de borato de sodio, SDS, pH<sup>4</sup>, voltaje de separación, tiempo de inyección y presión aplicada). En todos los casos el valor óptimo se estableció en función del análisis de la forma, intensidad y resolución de los picos, en el menor tiempo de análisis posible. La Tabla 3.1 muestra las variables e intervalos estudiados y los valores óptimos seleccionados mediante el método univariante. En la Figura 3.3 pueden observarse los electroferogramas correspondientes a las suspensiones estudiadas, en los cuales el pico 1 corresponde al flujo electroosmótico (EOF), con un tiempo de migración de 6 minutos, mientras que los picos 2 y 3 corresponden a AgNPs que eluyen alrededor de los 7 minutos y entre 10 - 12 minutos, respectivamente.

**Tabla 3.1.** Parámetros de optimizados en la Electroforesis Capilar.



Parámetro evaluado	Intervalo estudiado	Valor óptimo obtenido
<b>Variables químicas</b>		
Concentración de Borato de sodio	20 - 40 mM	20 mM
Concentración de SDS	0 - 20 mM	20 mM
pH	7,50 - 10,00	8,50
<b>Variables electroforéticas</b>		
Voltaje de separación	15 - 25 kV	20 kV
Presión aplicada de Inyección	0,5 - 1,0 psi	0,8 psi
Tiempo de Inyección	5,0 - 10,0 s	10,0 s



**Figura 3.3.** Electroferogramas de las suspensiones coloidales sintetizadas con miel (1-4) y con glucosa (SC 5). Se indican 1. Flujo electrosmótico (EOF) y las señales 2 y 3 corresponden a la distribución principal de AgNPs y posible agregación de nanopartículas, respectivamente.

### 3.2.4.3.2. Determinación de movilidad electroforética y potencial zeta

En el análisis por EC, las AgNPs se consideran partículas esféricas (con radio  $r$ ) rodeadas por una doble capa eléctrica de espesor  $1/k$ , donde el parámetro de Debye-Hückel,  $k$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la fuerza iónica de separación del medio. Teniendo en cuenta que  $r$  es el radio de las NPs, cuando  $kr \gg 1$ , la fórmula de Smoluchowski<sup>15</sup> se puede utilizar para estimar la movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) como:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 z}{\eta} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde  $\varepsilon_r$  y  $\varepsilon_0$  son la permitividad relativa y del vacío respectivamente,  $z$  es la potencial zeta y  $\eta$  la viscosidad de la solución de separación (a 25 °C). Sin embargo, varios autores han demostrado que si  $z > 25$  mV, las movilidades electroforéticas de las nanopartículas pueden verse afectadas por los efectos de relajación, debidos a la distorsión del entorno iónico bajo un campo externo aplicado, lo que la convierte en una función de  $kr$ <sup>16,17,18</sup>. Por otro lado, Kimura y colaboradores<sup>19</sup> derivaron una expresión analítica de la función de Henry para estimar la movilidad electroforética sin restricciones con respecto al rango  $kr$ .

$$\mu = \frac{2 \varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{3 \eta} \left[ f_1(kr) - \left( \frac{ze\zeta}{kT} \right)^2 \left\{ f_3(kr) + \frac{(m_+ + m_-)}{2} f_4(kr) \right\} \right] \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta,  $z$  es el número de carga de los iones electrolitos,  $m$  son los coeficientes de resistencia iónica y  $f_i(kr)$  son las funciones desarrolladas de la ecuación 3.2<sup>19</sup>:

$$f_1(kr) = 1 + \frac{1}{2[1+2.5/\{kr(1+2e^{-kr})\}]^3} \quad \text{Ec. 3.3}$$

$$f_3(kr) = \frac{kr(kr + 1.3e^{-0.18kr} + 2.5)}{2(kr + 1.2e^{-7.4kr} + 4.8)^3} \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$f_4(kr) = \frac{9\kappa r(\kappa r + 5.2e^{-3.9\kappa r} + 5.6)}{8(\kappa r + 1.55e^{-0.32\kappa r} + 6.02)^3} \quad \text{Ec. 3.5}$$

Así, la ecuación 3. 2 es útil para estimar los valores de potencial zeta a partir de la movilidad electroforética de las AgNPs sintetizadas.

La Tabla 3.2 muestra la movilidad electroforética ( $\mu$ ) y el potencial zeta ( $\zeta$ ) para las suspensiones coloidales de AgNPs, SC1, SC2 y SC5, analizadas por el método electroforético propuesto y comparadas con los resultados obtenidos a partir del análisis por DLS. Como puede observarse, los valores de movilidad electroforética obtenidos por EC poseen una excelente correlación con los estudiados por DLS para las tres muestras analizadas ( $t_{cal}=1,60 < t_{tab}=4,30$ , nivel de confianza del 95%)<sup>20</sup>. Como se puede observar, la ecuación de Ohshima también permite obtener una buena correlación entre valores de  $z$  obtenidos para SC2 y SC5, si se los compara con el análisis por DLS.

**Tabla 3.2.** Comparación de potencial zeta y movilidad eletroforética utilizando EC y DLS. Utilizando (1) Ecuación de Smoluchowski y (2) Ecuación de Ohshima.

Suspensión de AgNPs	EC		DLS		
	Potencial Zeta (mV)		Movilidad Electroforética ( $\times 10^{-4}$ cm <sup>2</sup> /V.s)	Potencial Zeta (mV)	Movilidad Electroforética ( $\times 10^{-4}$ cm <sup>2</sup> /V.s)
	(1)	(2)			
SC1	-48,47 ± 0,21	60,56 ± 0,20	-3,85 ± 0,02	-48,80 ± 1,31	-3,82 ± 0,10
SC2	-47,93 ± 0,20	59,91 ± 0,26	-3,81 ± 0,02	-54,03 ± 0,45	-4,24 ± 0,04
SC5	-47,90 ± 0,25	59,91 ± 0,32	-3,80 ± 0,03	-51,87 ± 1,80	-4,04 ± 0,13

### 3.2.4.4.3. Determinación de tamaño de AgNPs

La movilidad aparente ( $\mu_{app}$ ) puede definirse por la expresión general:

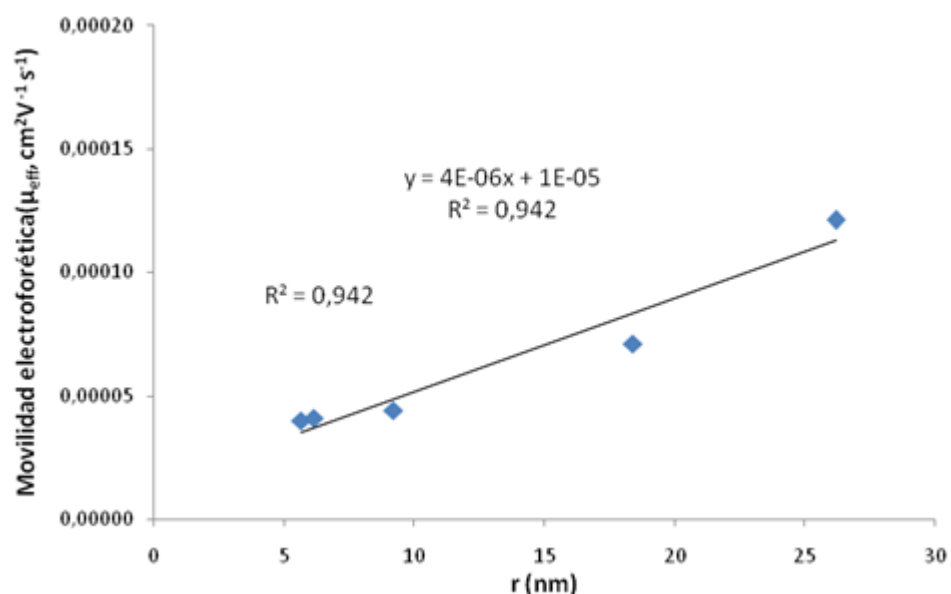
$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_e \quad \text{Ec. 3.6}$$

Donde  $\mu_{eo}$  es la movilidad electroosmótica y  $\mu_e$  es la movilidad electroforética de las AgNPs <sup>4</sup>. La distribución de tamaños de una suspensión coloidal de AgNPs desconocida podría analizarse relacionando la movilidad electroforética y el tamaño de partícula. Con este propósito, las dispersiones sintetizadas a pH 5,00 y 10,00, y caracterizadas previamente por TEM se analizaron mediante el método electroforético propuesto. Experimentalmente, se obtuvo una buena correlación entre la  $\mu_{app}$  (o movilidad observada) y el tamaño de partícula en el rango de tamaño estudiado (de 10 nm a 55 nm de diámetro). Debido a que existe una correlación lineal ( $R^2 > 0,90$ ), la movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) de las AgNPs puede considerarse proporcional al tamaño de las nanopartículas como se representa en la Ecuación 3.7:

$$\mu_{ep} = Kr + C \quad \text{Ec. 3.7}$$

Donde K es la pendiente y C la ordenada al origen de la regresión lineal (y =  $4,00 \times 10^{-6} + 1,00 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0,942$ ) como muestra la Figura 3.4. La relación satisfactoria entre la movilidad electroforética y el tamaño de estas nanopartículas cargadas negativamente está de acuerdo con la literatura<sup>4</sup>. Dado que este tipo de AgNPs no están disponibles

comercialmente, los tamaños obtenidos para todas las muestras analizadas sólo se compararon con los datos recogidos mediante análisis TEM y DLS. Como puede observarse en la Tabla 3.3, se obtiene una buena correlación entre los valores obtenidos por EC y los de TEM y DLS para SC1, SC2 y SC5. En el caso de SC3 y SC4, se obtiene una aproximación más exacta de la distribución de tamaños de AgNPs obtenidos por medio de EC y TEM con respecto a los alcanzados por DLS. Los diámetros hidrodinámicos obtenidos a través de DLS están sesgados de los otros valores, los cuales pueden estar asociados con la posible agregación de nanopartículas en la solución y conducir a una sobrestimación de los valores medios, en especial en las suspensiones SC3 y SC4. Por lo mencionado anteriormente, se aplicó una prueba estadística para datos emparejados (test “t”) para comparar los resultados obtenidos mediante EC y TEM para las muestras SC1 a SC5. El valor  $t_{cal}$  (2,24) resultó menor que el valor  $t_{tab}$  (2,57) al 95% de nivel de confianza, no mostrando así diferencias estadísticamente significativas entre EC y TEM para el análisis de estas AgNPs. Además, se observa claramente que la EC permite identificar la posible agregación de AgNPs y, de esta forma, estimar la distribución de tamaño de cada subpoblación.



**Figura 3.4.** Relación lineal entre el radio de las NPs y su movilidad aparente, (Ec.3.7).

**Tabla 3.3.** Comparación en la determinación de tamaños de AgNPs obtenidas por EC, TEM y DLS

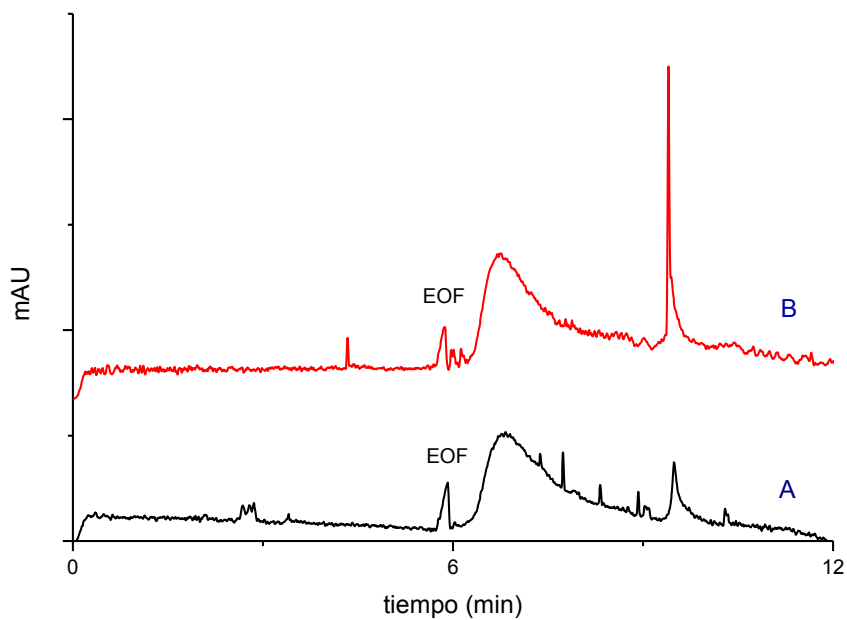
AgNPs	Diámetro de partícula (nm)		
	EC*	TEM**	DLS*
SC1	13,8 ± 0,6	18,4	9,1 ± 2,2
SC2	8,8 ± 0,4	12,3	10,5 ± 4,2
SC3	27,9 ± 3,3	36,8	82 ± 0,7
	47,2 ± 2,5		
SC4	15,4 ± 1,5	11,3	98,5 ± 2,9
SC5	15,4 ± 0,5	23,2	11,2 ± 1,2
	42,9 ± 0,6	52,6	58,2 ± 6,2

\*Valor promedio de 3 réplicas.

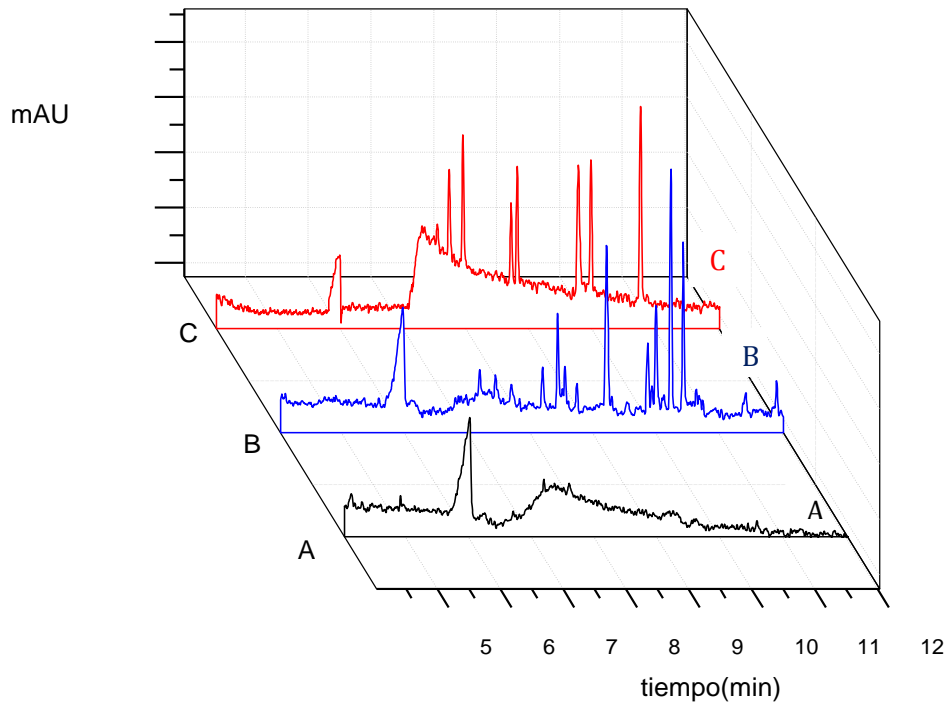
#### 3.2.4.4.4. Evaluación de estabilidad de las AgNPs por EC

Para evaluar la capacidad del método electroforético propuesto para controlar la estabilidad de las suspensiones coloidales de AgNPs y monitorear la posible agregación de estas partículas, se seleccionaron las SC2 y SC4. Fueron analizadas luego de almacenarlas por un período de tiempo de 20 días a 4 °C. Las suspensiones coloidales se sonicaron previa aplicación del método propuesto. Estas muestras fueron seleccionadas considerando las condiciones experimentales para su síntesis y las diferencias observadas inicialmente en las bandas de LSPR. Como se puede ver en la Figura 3.5, se observa una amplificación en la intensidad del pico electroforético (t = 9,5 min) después de la sonicación, mientras que no se encuentran picos adicionales entre los 7 y 9 minutos si se compara con la misma muestra antes de ser sonicada, lo cual puede asociarse con la agregación de AgNPs durante el proceso. Por otra parte, la SC4, se sometió al mismo tratamiento, con el objetivo de seguir los cambios en las áreas de los picos y la distribución del tamaño por EC. Como se puede observar en la Figura 3.6, SC4 tiende a agregarse después del almacenamiento durante 20 días (comparar trazo A, cuando están sintetizadas en el momento con los demás trazos) evidenciado por los picos electroforéticos entre 7,5 y 11 min (B), que pueden atribuirse a la relación miel / Ag<sup>+</sup> en esta muestra si se compara con la muestra de SC2. La distribución del tamaño se ve afectada levemente durante el proceso de sonicación debido a la desagregación aparente (Figura 3.6, C). Estos resultados demuestran un rendimiento satisfactorio del método

EC propuesto para evaluar la estabilidad de los coloides y la distribución de tamaños de las AgNPs, incluso cuando éstas se encuentran agregadas.



**Figura 3.5.** Electroferograma de SC2 luego de 20 días de almacenamiento. Sin sonicación (A). Con sonicación (B). EOF: Frente electrosmótico.



**Figura 3.6.** Electroferogramas de SC4 sintetizada en el momento (A, en negro), SC4 20 días después sin sonicar (B, en azul) y SC4 20 días después luego de la sonicación (C, en rojo).

### 3.2.5. Conclusiones parciales

El método electroforético propuesto mostró ser efectivo en la separación de AgNPs, con un tiempo de análisis menor a 12 min. Adicionalmente, se utilizaron pequeños volúmenes de AgNPs y reactivos, lo cual implica una reducción en costos económicos y en las cantidades de residuos generados. Mediante la aplicación del método propuesto, se obtuvo información valiosa sobre la distribución de tamaños, potencial zeta y estabilidad en el tiempo, de las nanopartículas de plata a partir de una **única corrida electroforética**. Los datos generados se compararon con éxito con las técnicas de caracterización tradicionales, tales como TEM y DLS. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el método EC propuesto representa una herramienta útil para la caracterización de dispersiones de nanopartículas de plata.



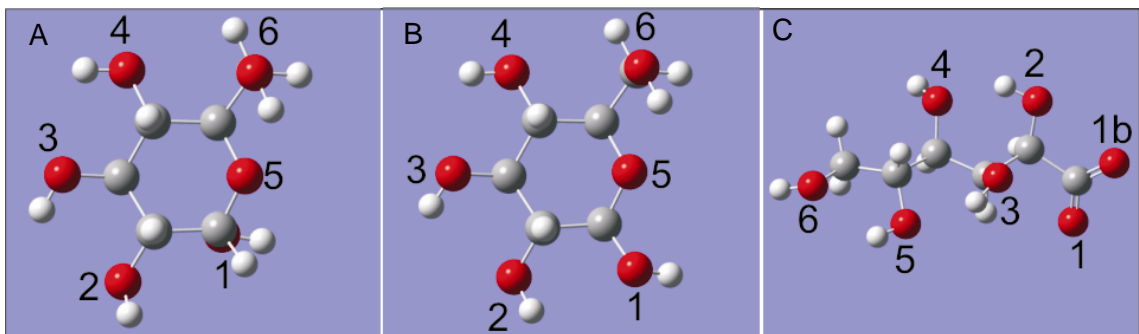
### 3.3. Identificación de agentes bloqueantes en Nanopartículas de plata (AgNPs) empleando Espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS)

#### 3.3.1. Introducción

En la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), luego de los pasos de reducción del metal y la nucleación de los átomos, los agentes bloqueantes son de gran importancia en la determinación de su tamaño y estabilidad, además de ser tenidos en cuenta al momento de elegir la aplicación que se les dará a dichos nanomateriales<sup>21</sup>. Algunos de estos agentes estabilizantes (bloqueantes o “*capping*”) pueden llegar a cumplir, incluso, el rol de reductores en las primeras etapas de la reacción como lo hacen, por ejemplo, el citrato o la glucosa<sup>22,23</sup>. En soluciones acuosas, sin recubrimiento, las AgNPs no son estables y se oxidan liberando cationes Ag<sup>+</sup>. Los coloides de AgNPs pueden estabilizarse según los siguientes mecanismos: 1) Electroestático, es decir repulsión entre cargas, 2) estérico, por impedimento en base al volumen que ocupan las moléculas adsorbidas, 3) fuerzas de hidratación, es decir aquellas que actúan entre las superficies polares separadas por una capa delgada de agua (<3 nm), 4) fuerzas de depleción, cuando las NPs se colocan en solución, de tal forma que excluyen moléculas más pequeñas y 5) fuerzas de van der Waals<sup>24</sup>.

Las propiedades que posean las AgNPs y, por lo tanto, su eficiencia, están fuertemente relacionadas con las moléculas adsorbidas sobre su superficie, ya que estas pueden formar parte importante en el desarrollo de su aplicación. Por ejemplo, en el caso de AgNPs utilizadas como agente bactericida, el rol de los mono y di sacáridos juega un papel crucial en la actividad anti-bacteriana. Por ejemplo, cuando estas partículas son sintetizadas con maltosa y lactosa se obtienen mejores resultados en la acción bactericida de las mismas si se las compara a las obtenidas utilizando glucosa o galactosa<sup>25</sup>. Por otra parte, Ajitha y col. sintetizaron AgNPs con diferentes agentes bloqueantes o “*capping*”, estudiando su influencia en el tamaño, forma y potencial zeta de dichos nanomateriales. Los mejores resultados se observaron con polivinilpirrolidona (PVP)<sup>26</sup>.

En la síntesis verde de AgNPs empleando miel como agente reductor y estabilizante, la glucosa al ser un azúcar reductor, puede formar parte de la primera etapa, reduciendo los cationes  $\text{Ag}^+$  para dar átomos  $\text{Ag}^0$  y el anión gluconato, en medio alcalino. Este último, puede actuar como agente estabilizante junto con los sacáridos  $\alpha$  y  $\beta$  D-Glucosa presentes, debido a la mutarrotación, e inicialmente en exceso en el medio de síntesis<sup>27</sup>. La Figura 3.7 muestra la estructura de  $\alpha$ -D-Glucosa,  $\beta$ -D-Glucosa y del anión Gluconato, posibles agentes estabilizantes de estas AgNPs.



**Figura 3.7:** Estructura de la  $\alpha$ -D-Glucosa (A),  $\beta$ -D-Glucosa (B) y del anión Gluconato (C)

respectivamente con la numeración de sus correspondientes átomos de oxígeno, (rojo) y los átomos de carbono (gris) e hidrógeno (blanco).

### 3.3.2. Objetivos

Con la finalidad de evaluar la función de la D-glucosa y del anión gluconato como agentes estabilizantes en la síntesis de AgNPs a partir de miel y, si existe alguna preferencia entre estas moléculas para este rol, se realizan los siguientes estudios:

- Síntesis de AgNPs empleando glucosa, uno de los hidratos de carbono predominantes en la miel.
- Determinación de la configuración de  $\alpha$ -D-Glucosa,  $\beta$ -D-Glucosa y del anión Gluconato, simulada por la teoría del funcional de densidad (DFT)<sup>28</sup>, que ajuste mejor con los datos experimentales obtenidos por Espectroscopía Raman Amplificada en Superficie (SERS).

### **3.3.3. Experimental**

#### **3.3.3.1. Instrumentación**

Microscopio Raman Confocal, modelo WITec Alpha 300RA.

#### **3.3.3.2. Reactivos y soluciones**

Los reactivos empleados poseen pureza de grado analítico. Se utilizó agua de calidad miliQ (18 MΩ).

-Solución de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$  Merck 99.9%)  $5,88 \times 10^{-3}$  M: Se preparó disolviendo 0,0998g de la sal en 100,0 mL de agua.

- Solución de hidróxido de sodio 0,1 M (NaOH): Se preparó disolviendo 0,40 g en 100,0 mL de agua.

- Solución de Glucosa (Sigma-Aldrich) al 7,82% (m/v): Se preparó disolviendo 0,78g de reactivo en 10,0 mL de agua.

#### **3.3.3.3. Síntesis de AgNPs**

Las AgNPs se obtuvieron empleando D-glucosa, de manera similar a la detallada en el Capítulo 2, ítem 2.3.2.

#### **- Obtención de espectros a través de Raman convencional y SERS**

Para las mediciones en Raman convencional y observación del fenómeno SERS, las AgNPs fueron depositadas sobre una placa con fondo de papel aluminio e irradiadas con láser verde a 532 nm, de una potencia de 10 mW durante 2 minutos.

### 3.3.3.4. Método computacional

Tanto para la  $\alpha$  y  $\beta$  D-glucosa, como para el ión gluconato se realizó una optimización geométrica de las moléculas aisladas con el fin de hallar sus configuraciones más estables. Para el modelado de la AgNPs se utilizó un cluster de 3 átomos de plata ( $Ag_3$ ), el cual también fue optimizado. Este cluster  $Ag_3$  ha demostrado ser una buena aproximación en la adsorción de moléculas sobre AgNPs<sup>29</sup>, además de ser utilizado para la comparación de espectros SERS<sup>30</sup>. Se modelaron 15 configuraciones iniciales en total; 6 para la  $\alpha$ -D-glucosa, de las cuales 5 interaccionan con un cluster  $Ag_3$  de forma triangular y otra que interacciona un con uno de forma lineal. Para la  $\beta$ -D-glucosa se evaluaron 7 geometrías, en 5 de ellas se utilizó el cluster  $Ag_3$  de forma triangular y en 2 de ellas el cluster de forma lineal. El anión gluconato fue modelado en 2 configuraciones, todas ellas con el cluster  $Ag_3$  de forma triangular. El código utilizado fue el Gaussian 9.0, utilizando el funcional DFT-B3LYP con la base 6-311g y la base LANL2TZ para los átomos de plata, debido a la presencia de electrones en el subnivel 4d. Para modelar el efecto del solvente, se introdujo la instrucción de hidratación implícita CPCM<sup>31,32</sup>. Para el cálculo de energías se utilizó la ecuación 3.8:

$$E_{ads} = E(\text{molécula}/Ag_3) - E(Ag_3) - E(\text{Molécula}) \quad \text{Ec. 3.8}$$

Posteriormente se realizó una corrección por Error por Superposición de Base (BSSE por sus siglas en inglés)<sup>33,34</sup>.

### 3.3.4. Resultados y discusión

#### 3.3.4.1. Síntesis de AgNPs

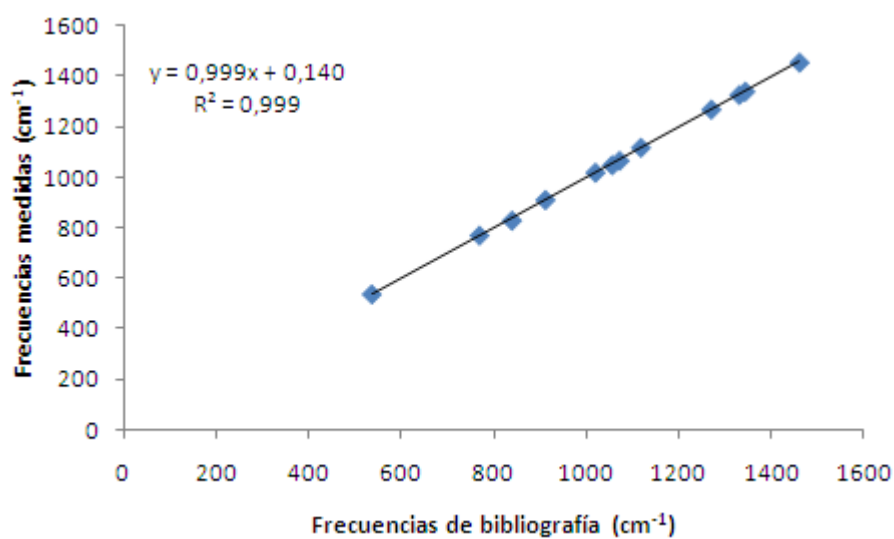
La AgNPs obtenidas son monodispersas y esféricas, el tamaño promedio de 10 nm. Estas características son similares a las obtenidas en capítulo 2, sección 4.2.1.

#### 3.3.4.2. Espectroscopía Raman de la $\alpha$ -D-Glucosa sólida

Con el fin de comprobar la posibilidad de comparar las frecuencias obtenidas en las mediciones experimentales con las reportadas en bibliografía, se obtuvo un espectro Raman convencional de la  $\alpha$ -D-Glucosa en polvo y se contrastaron sus frecuencias con las extraídas de la búsqueda bibliográfica (Tabla 3.4), obteniéndose una excelente correlación entre ambas ( $R^2$  0,999), como puede observarse en la Figura 3.8. Debe tenerse en cuenta que el error experimental de las mediciones luego de la calibración del instrumento es de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 3.4.** Comparación entre las frecuencias reportadas en bibliografía y las obtenidas experimentalmente para la  $\alpha$ -D-Glucosa en estado cristalino<sup>35</sup>

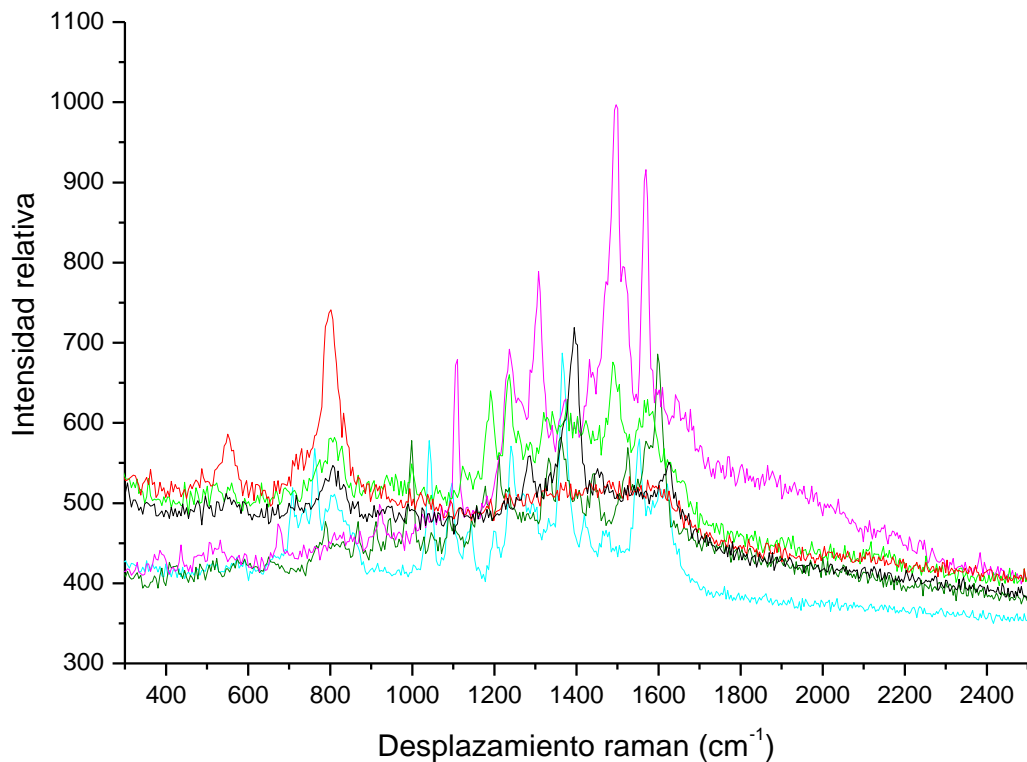
$\alpha$ -D-Glucosa cristal <sup>35</sup> /cm <sup>-1</sup>	$\alpha$ -D-Glucosa cristal medida/cm <sup>-1</sup>
403	401
538	539
770	772
840	831
912	913
1020	1021
1056	1051
1072	1068
1100	—
1118	1120
1270	1271
1330	1329
1343	1342
1460	1457



**Figura 3.8.** Correlación entre las frecuencias medidas experimentalmente y las obtenidas en la literatura.

### 3.3.4.3. Espectroscopía SERS

El fenómeno SERS mostró no ser un efecto estático para el presente estudio, sino que a lo largo de los 2 minutos de análisis, diferentes señales en distintas frecuencias e intensidades se fueron presentando esporádicamente a lo largo del tiempo de análisis<sup>36</sup>. La Figura 3.9 muestra la superposición de 7 espectros que, juntos, representan todas las señales observadas para la muestra analizada.



**Figura 3.9.** Espectros Raman, tomados a distintos tiempos, que muestran los fenómenos SERS para las AgNPs sintetizadas con glucosa.

Los picos obtenidos en la medición se deben a moléculas adsorbidas en la superficie de plata, ya que las moléculas libres no se encuentran lo suficientemente cerca para dar el fenómeno SERS. Estas frecuencias fueron comparadas con las mismas reportadas en bibliografía para mediciones de glucosa e ión gluconato, con el fin de hacer las asignaciones correspondientes de los modos normales de vibración (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Asignación de modos normales de D-glucosa e ión gluconato obtenidos experimentalmente y por bibliografía. Las referencias se encuentran en la columna de asignaciones, para cada una de ellas.

Frecuencias obtenidas experimentalmente/cm <sup>-1</sup>	Frecuencias obtenidas de bibliografía/cm <sup>-1</sup>	Asignación más probable obtenida por bibliografía
531	515 + 540	$\delta$ COO glu <sup>37</sup> + $\delta$ C2-C1-O1 $\alpha$ <sup>38</sup>
603	594	$\delta$ CO + $\delta$ COO glu <sup>37</sup>
662	651	$\delta$ COO + $\delta$ COO glu <sup>37</sup>
760	770	$\delta$ O5-C1-O1 $\beta$ <sup>38</sup>
806	808	$\delta$ CH glu <sup>37</sup>
996	974	uCO + $\delta$ OCH glu <sup>37</sup>
1039	1041 + 1039	$\delta$ C1-H $\alpha$ <sup>39</sup> + uCO $\alpha$ + $\delta$ OCH glu <sup>37</sup>
1095	1100 + 1095	u CO, u CC, $\delta$ COH $\alpha$ <sup>40</sup> +u CO + $\delta$ COO glu <sup>37</sup>
1108	1112	CC stretch, CCO bend $\alpha$ <sup>40</sup>
1133	1133 + 1125	u OC y u CO glu <sup>37</sup> + u C-O <sup>41</sup>
1176	1150	uC-O endocíclico gsa <sup>42</sup>
1268	1278 + 1267 +1262	C6-O-H/C1-O-H/C1-H $\alpha$ <sup>39</sup> + C-O-C gsa <sup>43</sup> + $\delta$ C(6)-OH, $\delta$ COH, $\delta$ CCH $\beta$ <sup>40</sup>
1305	1310	$\delta$ COH + $\delta$ OCH glu <sup>37</sup>
1339	1349 + 1330 + 1349 + 1336 + 1349	$\delta$ C-O-H $\alpha$ <sup>39</sup> + $\omega$ CH2 <sup>40</sup> + $\delta$ COH + $\delta$ COH $\alpha$ <sup>41</sup> + $\tau$ (CH2) gsa <sup>42</sup> + $\delta$ COH + $\delta$ COH glu <sup>37</sup>
1363	1360 + 1368 + 1368 + 1349	$\omega$ CH2 $\beta$ <sup>38</sup> + $\delta$ CH + $\delta$ OH gsa <sup>43</sup> + $\omega$ CH2, $\delta$ OCH, COH gsa <sup>42</sup> + $\delta$ COH+ $\delta$ COH glu <sup>37</sup>
1392	1401	uCOO- antisimétrico glu <sup>37</sup>
1433	1448	$\delta$ CH2, OCH $\beta$ <sup>40</sup>
1450	1455 + 1454 + 1445	$\delta$ CH2 gsa <sup>38</sup> + CH2, $\delta$ OCH $\alpha$ <sup>40</sup> + $\delta$ CH2 y OCH glu <sup>37</sup>

glu: Anión gluconato, gsa: D-Glucosa,  $\alpha$ : Alfa-D-Glucosa,  $\beta$ : Beta-D-Glucosa,  $\delta$ : Balanceo o tijeras (*bending*),  $\omega$ : Aleteo (*wagging*),  $\tau$ : Torsión (*twisting*), u: Tensión (*stretching*).

Como puede observarse, tanto la glucosa (en sus dos isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ ) como el anión gluconato se encuentran adsorbidos en la superficie de plata de las AgNPs, ya que las frecuencias presentes en la medición experimental se corresponden a las halladas en bibliografía para estas moléculas. Las pequeñas discrepancias que pueden observarse, entre ambas frecuencias, pueden ser atribuidas a la diferencia que existe en la concentración del hidrato de carbono presente en la muestra con respecto a la utilizada en los diferentes datos de literatura. En el caso del experimento realizado en este trabajo, la concentración inicial de  $\alpha$ -D-Glucosa en la síntesis fue de 0,034% (m/v), mientras que en la literatura la concentración



de los monosacáridos era superior al 20% (m/v). Esta elevada concentración de D-Glucosa puede dar lugar a interacciones por parte de las moléculas de soluto por medio de fuerzas de van der Waals o a través de puentes hidrógeno, produciendo, alteraciones en el corrimiento Raman<sup>44</sup>. Por otra parte, el pH, juega también un rol preponderante en la localización de los picos correspondientes a modos vibracionales <sup>45,46,47</sup>. Las frecuencias obtenidas experimentalmente fueron realizadas en un medio alcalino (pH 10,00), mientras que la medición de modos normales obtenidos de bibliografía se realizó en agua destilada, teniéndose de esta manera un pH entre levemente ácido a neutro. Por otra parte existen evidencias reportadas sobre un leve corrimiento de frecuencias entre mediciones Raman convencionales y SERS<sup>48,49</sup>. Cabe destacar que las frecuencias encontradas en literatura para el anión gluconato se encuentran en estado sólido, dando lugar a posibles diferencias. Sin embargo, se han obtenido buenas correlaciones entre los modos vibracionales obtenidos experimentalmente y los reportados en literatura.

#### **3.3.4.4. Cálculo de frecuencias**

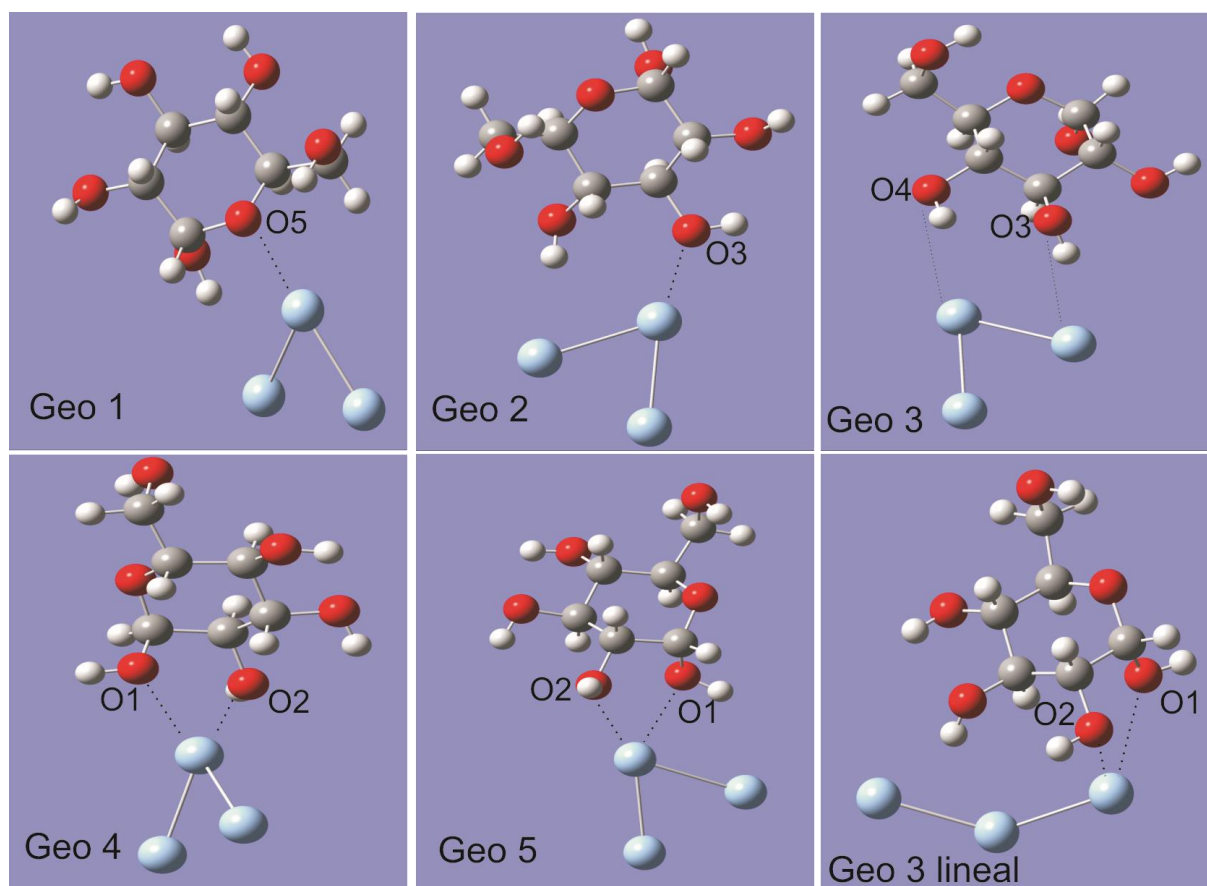
En la Tabla 3.6, se presentan las diferentes interacciones entre el cluster  $Ag_3$  evaluadas para ambos isómeros de la D-Glucosa y el anión Gluconato. Como puede apreciarse en dicha tabla, en un principio se muestran las interacciones propuestas para estas moléculas, para luego observar su evolución hacia su geometría más estable, dando lugar a las interacciones finales las cuales arrojarán las frecuencias Raman teóricas obtenidas por los modelos. Estas geometrías pueden observarse en las Figuras 3.10, 3.11 y 3.12. Por otra parte, la Tabla 3.6 también presenta información acerca de las energías para cada configuración final, aportando así herramientas para la posterior evaluación de las geometrías preferenciales en la adsorción de los hidratos de carbono propuestos sobre las AgNPs.

**Tabla 3.6.** Interacciones propuestas y obtenidas entre el cluster Ag<sub>3</sub> y las distintas moléculas evaluadas, junto con la distancia final entre ambos y sus respectivas energías.

Molécula	Interaccion inicial	Interaccion final	(Å) de intera	Energia (eV)
α-D-Glucosa 1	O5(eter)	O5 (eter)	2,52	-0,35
α-D-Glucosa 2	O3; O4 (OH)	O3(OH)	2,38	-0,49
α-D-Glucosa 3	O2; O3; O4 (OH)	O3; O4(OH)	3,51; 3,71	-0,08
α-D-Glucosa 3 lineal	O2; O3; O4 (OH)	O1; O2 (OH)	2,85; 2,67	-0,30
α-D-Glucosa 4	O1; O2 (OH)	O1; O2 (OH)	2,57; 2,53	-0,66
α-D-Glucosa 5	O2; O3 (OH)	O1; O2 (OH)	2,78; 2,46	-0,48
β-D-Glucosa 1	O5(eter)	O1(OH), O5 (eter)	2,56; 2,72	-0,62
β-D-Glucosa 2	O3; O4 (OH)	O4 (OH)	3,57	-0,05
β-D-Glucosa 2 lineal	O3; O4 (OH)	O6 (hidroximetil)	2,50	-0,24
β-D-Glucosa 3	O2; O3; O4 (OH)	O4 (OH)	2,42	-0,40
β-D-Glucosa 4	O1; O2 (OH)	O1 (OH)	2,44	-0,43
β-D-Glucosa 5	O2; O3 (OH)	O2; O3 (OH)	3,69; 3,66	-0,07
β-D-Glucosa 5 lineal	O2; O3 (OH)	O3 (OH)	3,66	-0,04
Anión Gluconato 1	O1, O1b (carbonilo)	O1 (grupo carbonilo)	2,25	-1,93
Anión Gluconato 2	O2; O3; O4 (OH)	O2; O3 (OH)	2,68; 2,43	-1,32

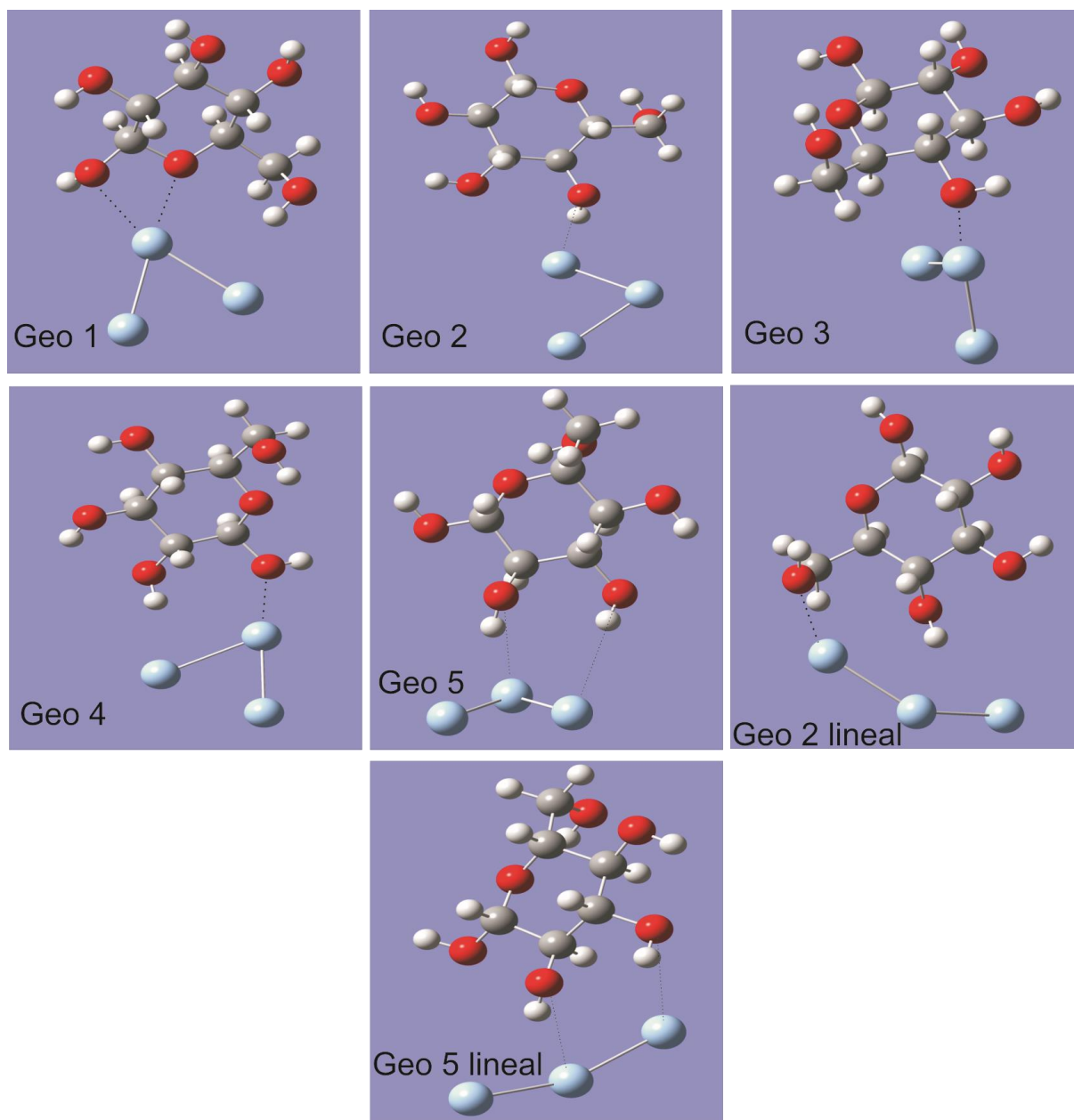
Las configuraciones evaluadas, en su forma más estable luego de la optimización geométrica, fueron las siguientes:

**Ag<sub>3</sub>/α-D-glucosa:**



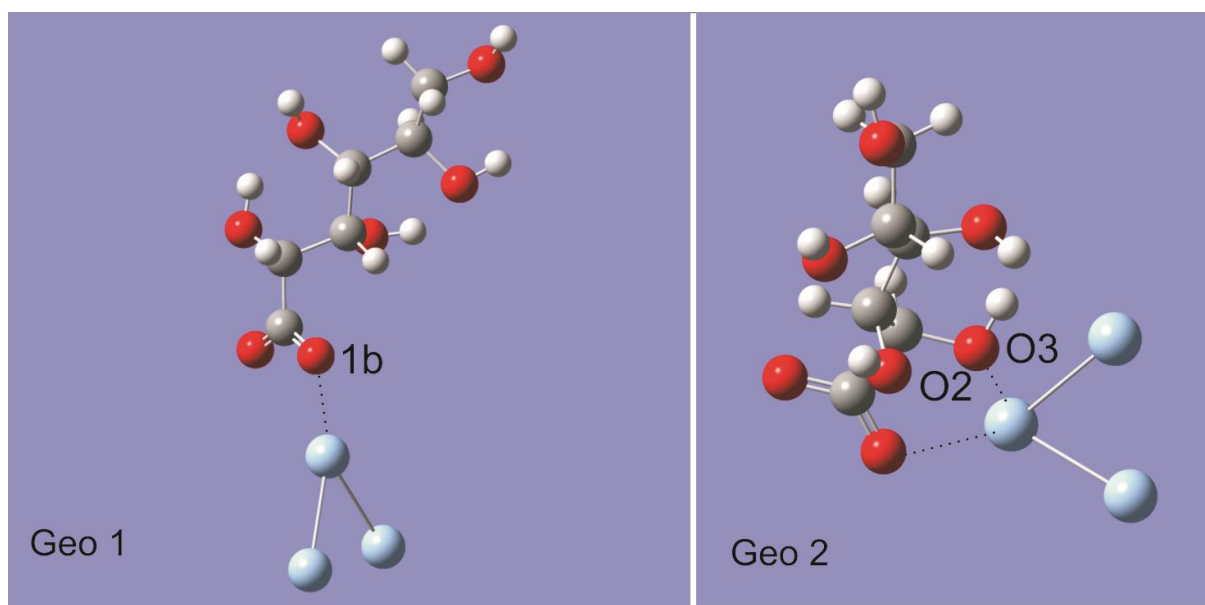
**Figura 3.10.** Diferentes geometrías evaluadas para la α-D-glucosa. Los átomos de oxígeno se presentan en color rojo, los átomos de carbono e hidrógeno se indican en color gris y blanco respectivamente y los celestes corresponden al cluster de plata. Geo: Geometría: diferentes formas de interacción de la α-D-glucosa con el cluster.

**Ag<sub>3</sub>/β-D-glucosa:**



**Figura 3.11.** Distintas geometrías evaluadas para la interacción Ag<sub>3</sub>/β-D-Glucosa. Los átomos de oxígeno se presentan en color rojo, los átomos de carbono e hidrógeno se indican en color gris y blanco respectivamente y los celestes corresponden al cluster de plata. Geo: Geometría: diferentes formas de interacción de la β-D-glucosa con el cluster.

### Ag<sub>3</sub>/Ión Gluconato:



**Figura 3.12.** Geometrías evaluadas para la adsorción del ión Gluconato sobre el cluster Ag<sub>3</sub>. Los átomos de oxígeno se presentan en color rojo, los átomos de carbono e hidrógeno se indican en color gris y blanco respectivamente y los celestes corresponden al cluster de plata. Geo: Geometría: diferentes formas de interacción del ión Gluconato con el cluster.

Cabe destacar que el motivo por el cual algunas geometrías se repiten con un cluster Ag<sub>3</sub> en forma lineal, es debido a que, en su forma triangular, las interacciones entre los átomos de oxígeno de las moléculas y los átomos de plata de dicho cluster están a una distancia mayor a los 3 Å, y presentan valores de energía débiles. Por otra parte, las energías de interacción resultaron más favorables para la forma lineal de esta estructura de plata, excepto para la geometría 5 de la β-D-glucosa, la cual no mostró cambios significativos. Si se observa detalladamente la Tabla 3.6, puede apreciarse que la mayoría de las interacciones de la α-D-glucosa con el cluster Ag<sub>3</sub>, evolucionan hacia los átomos de oxígeno O1 y O2 como puede apreciarse en la Tabla 3.6, situación que no se repite con el isómero β, posiblemente por la diferente posición que ocupa el átomo de oxígeno O1 en dicha molécula.

### 3.3.4.5. Análisis de frecuencias teórico-experimentales

A continuación se procederá a analizar la Tabla 3.7, la cual lista tanto frecuencias teóricas como experimentales, con el fin de encontrar aquellas geometrías que presenten mayor probabilidad de encontrarse presentes sobre la superficie de la AgNPs.

**Tabla 3.7.** Coincidencias de frecuencias experimentales y teóricas, el error del instrumento es de  $\pm 10$   $\text{cm}^{-1}$ . Las frecuencias marcadas en rojo superan la diferencia de  $\pm 10$   $\text{cm}^{-1}$  entre experimento y cálculo.

Experimental	$\alpha$ geo 1	$\alpha$ geo 2	$\alpha$ geo 3	$\alpha$ geo 3 L	$\alpha$ geo 4	$\alpha$ geo 5	$\beta$ geo 1	$\beta$ geo 2	$\beta$ geo 2 L	$\beta$ geo 3	$\beta$ geo 4	$\beta$ geo 5	$\beta$ geo 5 L	Glu 1	Glu 2
531		536	539	537	537										539
603							606	605	605	605	608	607	605		
662		672													
760														757	766
806															823
996					993	990	998	1001	999	999	997	990	996		
1039	1039	1042	1033	1040	1044	1044	1033	1045	1048		1033	1032	1032	1038	1045
1095					1091	1097	1097	1106						1090	1094
1108	1110	1104	1098						1108	1109			1110		
1176	1170	1171	1181	1182	1181	1184				1172				1175	1186
1268							1276							1273	
1305	1305	1304	1308	1304	1305	1303	1306	1310	1309	1311	1303	1312	1304	1305	1314
1339	1336	1346	1339	1339	1337	1338	1343	1345	1344	1348	1342	1337	1341	1338	1343
1363		1367						1371	1371	1356				1370	1365
1392	1394	1383	1392	1396	1391	1391	1395	1388	1386	1397	1394	1389	1396	1390	1391
1433							1436					1429			
1450	1449	1445	1445	1443	1443	1445		1444	1445	1445	1444	1445	1446	1460	
1548															1552
1567														1563	
Coincidencias	7	9	8	10	10	9	9	9	9	9	7	9	8	14	15

$\alpha$ : alfa-D-glucosa;  $\beta$ : beta-D-glucosa; Glu: Gluconato; Geo: Geometría; L: Interacción con cluster Ag<sub>3</sub> lineal.

Como se puede observar, las frecuencias experimentales 760 y 1567  $\text{cm}^{-1}$  sólo se presenta en la geometría 1 del anión Gluconato, mientras que las vibraciones en 806, 1133, 1548  $\text{cm}^{-1}$  sólo se encuentran en la geometría 1 de este mismo anión. Estas dos configuraciones abarcan casi todas las frecuencias experimentales observadas, con excepción de 603, 662, 996, 1108 y 1433  $\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, la vibración ubicada en 662  $\text{cm}^{-1}$  sólo se encuentra presente en la geometría 2 de la  $\alpha$ -D-glucosa haciendo que dicha configuración sea altamente probable; por otra parte, también aporta la vibración 1108  $\text{cm}^{-1}$ . Los restantes modos normales pueden encontrarse tanto en las geometrías 1 como 5 de la  $\beta$ -D-glucosa haciendo de estas configuraciones preferibles, por sobre los otros sistemas  $\text{Ag}_3/\beta$ -D-glucosa evaluados.

En cuanto a las energías, podrían agruparse en tres conjuntos conforme a su estabilidad. La molécula más estable resultó ser el anión gluconato, principalmente, su geometría 1 con una energía de -1,93 eV seguido de su geometría 2 con -1,32 eV. En un segundo grupo, entre los isómeros de D-glucosa, no se encontraron diferencias significativas de energía, siendo las más estables, para la  $\alpha$ -D-glucosa, las configuraciones 4; 2 y 5 con energías de -0,66; -0,49 y -0,48 eV, respectivamente, y para la  $\beta$ -D-glucosa, las geometrías 1; 4 y 3, con energías de -0,62; -0,43 y -0,40 eV, respectivamente. Por último, en un tercer conjunto, las geometrías 1 y 3 lineal de la  $\alpha$ -D-glucosa y la configuración 2 lineal de la  $\beta$ -D-glucosa mostraron menor estabilidad, siendo prácticamente no interactuantes la geometría 3 del isómero  $\alpha$  y las configuraciones 2; 5 y 5 lineal del isómero  $\beta$  (ver Tabla 3.7).

### 3.3.6. Conclusiones parciales

Todas las geometrías de las moléculas analizadas pueden encontrarse adsorbidas sobre las AgNPs. Sin embargo, los cálculos muestran que el anión gluconato se hace imprescindible para asignar muchas frecuencias halladas experimentalmente. Lo anteriormente dicho también aplica a la geometría 2 de la  $\alpha$ -D-glucosa y las geometrías 1 ó 5 de la  $\beta$ -D-glucosa, aunque esta última mostró ser muy poco estable en cuanto a energía;

siendo por ende más probable hallar la geometría 1 de dicho isómero. Por lo tanto, los estudios indicarían que el anión gluconato se encuentra como agente bloqueante en su geometría 1, seguido por la geometría 2 y, luego, las moléculas de glucosa en sus configuraciones previamente indicadas. También se ha encontrado que, el sitio de interacción entre la plata y la  $\alpha$ -D-glucosa tiende a darse, preferentemente, a través de los átomos de oxígeno O1 y O2.

### 3.4. Referencias

---

<sup>1</sup> L. Xu, J. Peng, M. Yan, D. Zhang, A.Q. Shen, Droplet synthesis of silver nanoparticles by a microfluidic device, *Chem. Eng. Process. Process. Intensif.* 102 (2016) 186–193.

<sup>2</sup> Y. Li, V. Lubchenko, P.G. Vekilov, The use of dynamic light scattering and Brownian microscopy to characterize protein aggregation, *Rev. Sci. Instrum.* 82 (2011), 186-193

<sup>3</sup> B. Michen, C. Geers, D. Vanhecke, C. Endes, B. Rothen-Rutishauser, S. Balog, A. Petri-Fink, Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9793-9800.

<sup>4</sup> F.K. Liu, F.H. Ko, P.W. Huang, C.H. Wu, T.C. Chu, Studying the size/shape separation and optical properties of silver nanoparticles by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1062 (2005) 139–145.

<sup>5</sup> L. Liu, B. He, Q. Liu, Z. Yun, X. Yan, Y. Long, G. Jiang, Identification and accurate size characterization of nanoparticles in complex media, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 14476–14479.

<sup>6</sup> H. Qu, T.K. Mudalige, S.W. Linder, Capillary electrophoresis coupled with inductively coupled mass spectrometry as an alternative to cloud point extraction based methods for rapid quantification of silver ions and surface coated silver nanoparticles, *J. Chromatogr. A.* 1429 (2016) 348–353.



---

<sup>7</sup> F. Oukacine, A. Morel, I. Desvignes, H. Cottet, Size-based characterization of nanoparticle mixtures by the inline coupling of capillary electrophoresis to Taylor dispersion analysis, *J. Chromatogr. A.* 1426 (2015) 220–225.

<sup>8</sup> M. Bouri, R. Salghi, M. Algarra, M. Zougagh, A. Ríos, A novel approach to size separation of gold nanoparticles by capillary electrophoresis–evaporative light scattering detection, *RSC Adv.* 5 (2015) 16672–16677.

<sup>9</sup> C. Adelantado, N. Rodríguez-Farias, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, M. Zougagh, Ángel Ríos, Analysis of silica nanoparticles by capillary electrophoresis coupled to an evaporative light scattering detector, *Anal. Chim. Acta.* 923 (2016) 82–88.

<sup>10</sup> B. Franze, C. Engelhard, Fast Separation, Characterization, and Speciation of Gold and Silver Nanoparticles and Their Ionic Counterparts with Micellar Electrokinetic Chromatography Coupled to ICP-MS. *Anal. Chem.* 86 (2014) 5713–5720.

<sup>11</sup> D. Philip, Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 75 (2010) 1078–1081.

<sup>12</sup> K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 668–677.

<sup>13</sup> K. Kluczyk, W.A. Jacak, Size effect in plasmon resonance of metallic nanoparticles: RPA versus COMSOL, *Acta Phys. Pol. A.* 129 (2016) A83–A86.

<sup>14</sup> J.E. Millstone, S.J. Hurst, G.S. Métraux, J.I. Cutler, C.A. Mirkin, Colloidal gold and silver triangular nanoprisms, *Small.* 5 (2009) 646–664.

<sup>15</sup> I.S. Bouhaik, P. Leroy, P. Ollivier, M. Azaroual, L. Mercury, Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Application to the modeling of their aggregation kinetics, *J. Colloid Interface Sci.* 406 (2013) 75–85.

---

<sup>16</sup>A. Ibrahim, S.A. Allison, H. Cottet, Extracting information from the ionic strength dependence of electrophoretic mobility by use of the slope plot, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9422–9430.

<sup>17</sup>S.A. Allison, J.D. Carbeck, C. Chen, F. Burkes, Electrophoresis of Protein Charge Ladders: A Comparison of Experiment with Various Continuum Primitive Models, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 4516–4524.

<sup>18</sup> U. Pyell, A.H. Jalil, C. Pfeiffer, B. Pelaz, W.J. Parak, Characterization of gold nanoparticles with different hydrophilic coatings via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part I: Determination of the zeta potential employing a modified analytic approximation, *J. Colloid Interface Sci.* 450 (2015) 288–300.

<sup>19</sup> K. Kimura, S. Takashima, H. Ohshima, Molecular Approach to the Surface Potential Estimate of Thiolate-Modified Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. B.* 106 (2002) 7260–7266.

<sup>20</sup> J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, (2010) 6th edn. Pearson Education Limited, UK, ISBN: 84-205-3517-1

<sup>21</sup> P. Raveendran, J. Fu, S.L. Wallen, C. Hill, N. Carolina, Completely “ Green ” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13940–13941.

<sup>22</sup> V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Adv. Colloid Interface Sci.* 145 (2009) 83–96.

<sup>23</sup> Z.S. Pillai, P. V Kamat, What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 945–951.

- 
- <sup>24</sup> K. Do Kim, D.N. Han, H.T. Kim, Optimization of experimental conditions based on the Taguchi robust design for the formation of nano-sized silver particles by chemical reduction method, *Chem. Eng. J.* 104 (2004) 55–61.
- <sup>25</sup> L. Kvi, R. Vec, Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis , Characterization , and Their Antibacterial Activity, *J Phys. Chem. B.* 110 (2006) 16248–16253.
- <sup>26</sup> B. Ajitha, Y.A. Kumar Reddy, P.S. Reddy, H.-J. Jeon, C.W. Ahn, Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor, *RSC Adv.* 6 (2016) 36171–36179.
- <sup>27</sup> X. Sun, C. Zheng, F. Zhang, Y. Yang, G. Wu, A. Yu, N. Guan, Size-Controlled Synthesis of Magnetite (  $Fe_3O_4$  ) Nanoparticles Coated with Glucose and Gluconic Acid from a Single Fe ( III ) Precursor by a Sucrose Bifunctional Hydrothermal Method, *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* (2009) 16002–16008.
- <sup>28</sup> I.O. Osorio-Román, V. Ortega-Vá Squez, C. Victor Vargas, R.F. Aroca, Surface-enhanced spectra on D-gluconic acid coated silver nanoparticles, *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 838–843.
- <sup>29</sup> T.N. Rekha, B.J.M. Rajkumar, Density functional theory study on silver clusters using dimers , trimers , and tetramers as building units, *Can. J. Phys.* 8 (2015) 1–8.
- <sup>30</sup> A. Parameswari, R. Mohamed Asath, R. Premkumar, A. Milton Franklin Benial, SERS and quantum chemical studies on N-methylglycine molecule on silver nanoparticles, *J. Mol. Struct.* 1138 (2017) 102–109.
- <sup>31</sup> V. Barone, M. Cossi, Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model, *J. Phys. Chem. A.* 102 (2001) 1995–2001.

- 
- <sup>32</sup> M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, Structures, and Electronic Properties of Molecules in Solution with the C-PCM Solvation Model., *J. Comp. Chem.* 24 (2003) 669–681.
- <sup>33</sup> S. Simon, M. Duran, J.J. Dannenberg, How does basis set superposition error change the potential surfaces for hydrogen-bonded dimers?, *J. Chem. Phys.* 105 (1996) 11024–11031.
- <sup>34</sup> S.F. Boys, F. Bernardi, The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors, *Mol. Physic.* 19 (1970) 553–566.
- <sup>35</sup> E.C. Corbett, V. Zichy, J. Goral, C. Passingham, Fourier transform Raman studies of materials and compounds of biological importance-II. The effect of moisture on the molecular structure of the alpha and beta anomers of d-glucose, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 47 (1991) 1399–1411.
- <sup>36</sup> J. Krug, G. Wang, S. Emory, S. Nie, Efficient Raman Enhancement and Intermittent Light Emission Observed in Single Gold Nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1998) 9208-9214.
- <sup>37</sup> H.A. Tajmir-Riahi, J.T. Agbebavi, Carbohydrate interaction with monovalent ions. The effects of Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sup>4+</sup>, Rb<sup>+</sup>, and Cs<sup>+</sup> on the solid state and solution structures of d-glucono-1,5-lactone and d-gluconic acid, *Carbohydr. Res.* 241 (1993) 25–35.
- <sup>38</sup> M. Mathlouthi, D. Vinh Luu, Laser-Raman spectra of D-glucose and sucrose in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 81 (1980) 203–212.
- <sup>39</sup> P.D. Vasko, J. Blackwell, J.L. Koenig, Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates., *Carbohydr. Res.* 23 (1972) 407–416.

---

<sup>40</sup> E.C. Corbett, V. Zichy, J. Goral, C. Passingham, Fourier transform Raman studies of materials and compounds of biological importance-II. The effect of moisture on the molecular structure of the alpha and beta anomers of d-glucose, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 47 (1991) 1399–1411.

<sup>41</sup> A.N. Batsoulis, N.G. Siatis, A.C. Kimbaris, E.K. Alissandrakis, C.S. Pappas, P.A. Tarantilis, P.C. Harizanis, M.G. Polissiou, FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 207–210.

<sup>42</sup> M. Kačuráková, M. Mathlouthi, FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: Characterization of the glycosidic bond, *Carbohydr. Res.* 284 (1996) 145–157.

<sup>43</sup> R. Goodacre, B.S. Radovic, E. Anklam, Progress toward the rapid nondestructive assessment of the floral origin of European honey using dispersive Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 56 (2002) 521–527.

<sup>44</sup> S. Datta, K. Kumar, Vibrational relaxation studies in methyl acetate: Role of microenvironment and hydrodynamic forces, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 64 (2006) 665–669.

<sup>45</sup> G. Pezzotti, L. Puppulin, A. La Rosa, M. Boffelli, W. Zhu, B.J. McEntire, S. Hosogi, T. Nakahari, Y. Marunaka, Effect of pH and monovalent cations on the Raman spectrum of water: Basics revisited and application to measure concentration gradients at water/solid interface in Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> biomaterial, *Chem. Phys.* 463 (2015) 120–136.

<sup>46</sup> K.V. Kong, U.S. Dinish, W.K.O. Lau, M. Olivo, Sensitive SERS-pH sensing in biological media using metal carbonyl functionalized planar substrates, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 135–140.

<sup>47</sup> C.H. Ho, S. Lee, SERS and DFT investigation of the adsorption behavior of 4-mercaptobenzoic acid on silver colloids, *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.* 474 (2015) 29–35.

<sup>48</sup> A.E. Aliaga, C. Garrido, P. Leyton, G. Diaz F., J.S. Gomez-Jeria, T. Aguayo, E. Clavijo, M.M. Campos-Vallette, S. Sanchez-Cortes, SERS and theoretical studies of arginine, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 76 (2010) 458–463.

<sup>49</sup> C. Garrido, T. Aguayo, E. Clavijo, J.S. Gómez-Jeria, M.M. Campos-Vallette, The effect of the pH on the interaction of L-arginine with colloidal silver nanoparticles. A Raman and SERS study, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1105–1110.

# CAPÍTULO 4

## **Estudios de potenciales aplicaciones de las AgNPs**

### **Objetivos generales**

Se pretende hacer uso de las AgNPs sintetizadas en esta Tesis para:

-Producir el fenómeno SERS en espectroscopía Raman haciendo uso del láser verde de 532 nm para la detección de oxitetraciclina en muestras de miel.

-Analizar la posibilidad de desarrollar sensores de glucosa basados en nanotubos de carbono (CNT) decorados con un metal de transición o nanoclusters de plata cuya reactividad debe ser moderada, mediante un estudio teórico utilizando la Teoría del funcional de la Densidad (DFT).



## **4.1. Identificación de Oxitetraciclina en miel por medio de Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie (SERS)**

### **4.1.1. Introducción**

La oxitetraciclina (OTC), es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las tetraciclinas<sup>1</sup>, el cuál es habitualmente utilizado por los productores apícolas en el tratamiento y prevención de las enfermedades, Loque Americana y Loque Europea, que afectan gravemente a las abejas productoras de miel (*Apis mellífera*)<sup>2</sup>. Países como Estados Unidos, Canadá, Australia, India e inclusive Argentina recurren frecuentemente a la aplicación de este antibiótico en sus colmenas. Sin embargo, la Unión Europea, prohíbe estrictamente su uso<sup>3</sup>. La presencia de OTC puede persistir de manera residual en productos apícolas como la jalea real, propóleos e inclusive la miel, cuando las colmenas son tratadas con dicha droga. Este hecho es de preocupación, ya que puede afectar la salud de los consumidores, principalmente en la generación de resistencia bacteriana a estos antibióticos<sup>4,5</sup>. Lo anteriormente expuesto representa por lo tanto un impedimento en la exportación de miel a países pertenecientes a la Unión Europea, la cual representó un 36,4% de la exportación total de este producto apícola por parte de Argentina en el año 2017<sup>6</sup>.

En la actualidad, para la determinación de OTC en miel, existen diversos métodos, entre los cuales se pueden mencionar: cromatografía líquida de alta performance (HPLC)<sup>7,8</sup>, sensores fluorescentes utilizando nanoclusters metálicos o nanopartículas funcionalizadas con ADN<sup>9,10</sup>, inmunoensayos tipo ELISA<sup>11</sup>, métodos electroforéticos<sup>12</sup>, voltamperometría de onda cuadrada con redisolución catódica, empleando electrodos de antimonio generados "in-situ"<sup>13</sup>.

La utilización de la espectroscopía Raman convencional y espectroscopía Raman amplificada por superficie (SERS) son técnicas de gran utilidad en la detección de diferentes moléculas de antibióticos, entre las que se encuentra la oxitetraciclina. Chen y

col.<sup>14</sup>, utilizaron espectroscopía Raman convencional para la determinación simultánea de tetraciclina, doxiciclina y OTC sin evaluar el método en ninguna matriz. Por otro lado, se utilizó espectroscopía SERS con la finalidad de detectar tetraciclina, levofloxacina y benzilpenicilina adsorbidas sobre AgNPs<sup>15</sup>. Estas partículas fueron obtenidas mediante borohidruro y citrato de sodio; evaluándose el antibiótico en suspensiones acuosas sin realizar estudios en muestras complejas. El empleo de nanopartículas de oro (AuNPs) comerciales se utilizó para la cuantificación de residuos de tetraciclina en carne de pato, por medio del fenómeno SERS<sup>16</sup>, Meng y col. emplearon AuNPs funcionalizadas con hebras de ADN (oligonucleótidos) con el propósito de alcanzar mayor especificidad en la detección de OTC utilizando SERS<sup>17</sup>. Asimismo, se empleó esta misma técnica para detectar residuos de Penicilina G en muestras de leche, utilizando una metodología costosa y tediosa que incluye varias etapas de lavados y deposición de las nanoestructuras de plata obtenidas en placas, para su posterior análisis<sup>18</sup>.

#### **4.1.2. Objetivos**

- Estudiar el empleo de AgNPs obtenidas por síntesis verde para la identificación de oxitetraciclina en muestras de miel mediante Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie (SERS).

#### **4.1.3. Experimental**

##### **4.1.3.1. Instrumentación**

- Microscopio Raman Confocal modelo WITec Alpha 300RA. Se emplea un láser verde (532 nm) con una potencia de 10 mW del microscopio Raman confocal durante 2 minutos. Resolución espectral  $4 \text{ cm}^{-1}$  y error instrumental de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ .

- Microscopio de transmisión electrónica JEOL 100 CX II.

- Centrifuga Servall con un rotor SM 400.

#### 4.1.3.2. Reactivos y soluciones

Los reactivos empleados poseen pureza de grado analítico. Se utilizó agua de calidad miliQ (18 MΩ).

- Solución de Nitrato de plata 0,059 M: Se preparó disolviendo 0,500 g de la sal (Merck 99,9%) en 50,0 mL de agua.

- Solución de hidróxido de sodio 0,5 M: Se preparó disolviendo 2,00 g de NaOH (Anedra) en 100,0 mL de agua.

- Solución de glucosa 7,82% (m/v): Se preparó disolviendo 0,7825 g de dicho hidrato de carbono (Sigma-Aldrich) en 10,0 mL de agua.

- Solución de oxitetraciclina 100 ppm: Se disolvieron 0,027 g de clorhidrato de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich) en 250,0 mL de agua. Posteriormente de esta solución se tomó una alícuota de 1,00 mL y se llevó a 100,0 mL con agua.

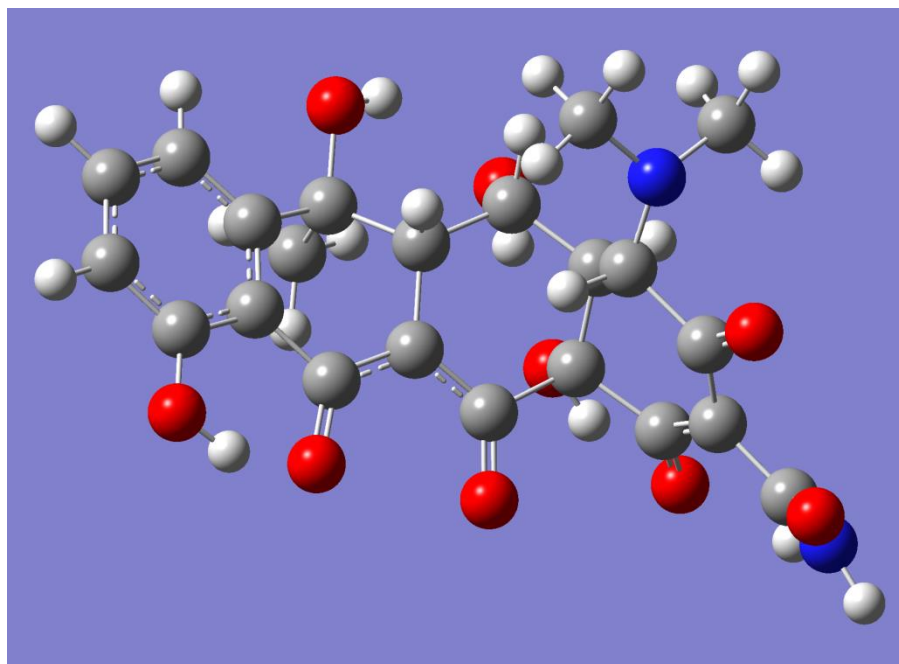
- Solución de oxitetraciclina 1 ppm: Se tomó una alícuota de 1,00 mL de la solución de oxitetraciclina de 100 ppm y se llevaron a 100,0 mL con agua.

- Carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) Timper.

#### 4.1.3.3. Método computacional

Con el fin de visualizar las vibraciones de los enlaces pertenecientes a diferentes grupos funcionales de oxitetraciclina a pH 10,00 y obtener las frecuencias teóricas de dicho antibiótico, se llevó a cabo un cálculo DFT. Esta molécula, se encuentra desprotonada a pH alcalino ( $OTC^{2-}$ ) (Figura 4.1). Se realizó una optimización geométrica de la molécula aislada, obteniéndose de esta manera los modos normales oscilantes. El código utilizado fue el Gaussian 9.0, utilizando el funcional DFT-B3LYP con la base 6-311g y la base 6-

311+G\*. Para modelar el efecto del solvente, se introdujo la instrucción de hidratación implícita CPCM<sup>19,20</sup>.



**Figura 4.1.** Molécula de oxitetraciclina a pH 10,00 (OTC<sup>2-</sup>). Las esferas grises, blancas, rojas y azules corresponden a los átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, respectivamente.

#### 4.1.3.4. Síntesis de Nanopartículas de Plata

Se sintetizaron AgNPs empleando D-glucosa como agente reductor y estabilizante, ya que las moléculas adsorbidas sobre la superficie de las AgNPs con este reactivo fueron caracterizadas en el Capítulo 3, Sección 3.2. Para ello, se tomaron 7,50 mL de AgNO<sub>3</sub> 0,059M, se agregaron 1,00 mL de glucosa 7,82% (m/v) y se llevó a pH 10,00 con NaOH 0,5M. El volumen final fue de 250,0 mL con agua miliQ. La mezcla se agitó vigorosamente utilizando un vórtex, durante 1 minuto hasta alcanzar una suspensión turbia de color gris verdoso, correspondiente a una SC de AgNPs muy concentradas (SC AgNPs).

Para la obtención de una señal SERS adecuada, se trabajó con AgNPs de concentración similar a la utilizada en otros trabajos que hacen uso de esta

técnica<sup>14,17,21</sup>. Por otra parte, se aumentó la relación  $\text{Ag}^+$ /agente bloqueante, agregando una mayor concentración de nitrato de plata, para generar mayor superficie de plata expuesta para la unión de la OTC, sin interferencias del agente “*capping*”.

#### 4.1.3.5. Procedimiento

Con la finalidad de identificar los picos SERS correspondientes a la oxitetraciclina y miel, se prepararon una serie de suspensiones coloidales que contenían en todos los casos 25,00 mL de SC AgNPs y 0,5 g de carbonato de potasio. Las SC preparadas se detallan a continuación:

SCa) SC AgNPs +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

SCb) SC AgNPs + 5 g miel +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

SCc) SC AgNPs + OTC + 0,5 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Concentración final OTC: 0,8 ppm (m/v)

SCd) SC AgNPs + 5 g miel + OTC +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Concentración final OTC: 5 ppb (m/m)

SCe) SC AgNPs + 5 g miel + OTC +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Concentración final OTC: 10 ppb (m/m)

SCf) SC AgNPs + 5 g miel + OTC +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Concentración final OTC: 15 ppb (m/m)

SCg) SC AgNPs + 5 g miel + OTC +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Concentración final OTC: 20 ppb (m/m)

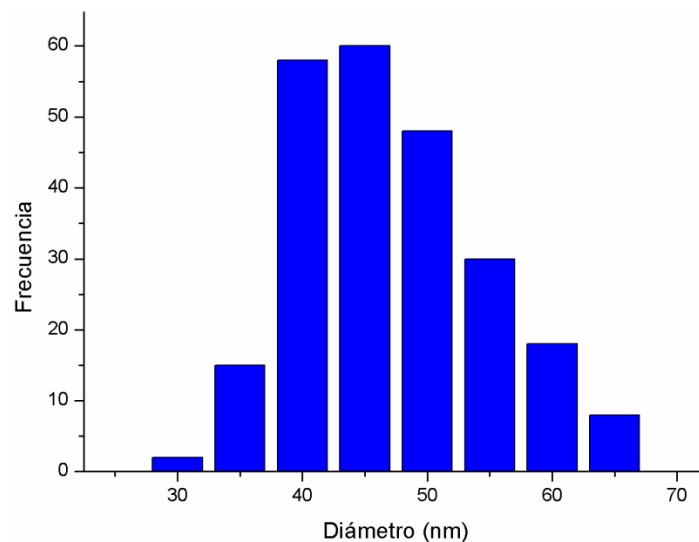
La función del  $\text{K}_2\text{CO}_3$  es facilitar la agregación de las AgNPs, generando así una superficie irregular propicia para SERS. Las SC fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 45 minutos. Los tubos de centrifuga contenían papel aluminio en el fondo del mismo con la finalidad de que se deposite el agregado para su posterior análisis por SERS. En el caso de las SC que contenían miel, luego del tratamiento descrito, se le agregó al sobrenadante 3,00 mL de  $\text{AgNO}_3$  y 5,0 mL de NaOH con el fin de realizar una síntesis de AgNPs “*in situ*” con los azúcares reductores propios de la miel que se encuentran en el sobrenadante. De esta manera, la oxitetraciclina remanente en solución puede adsorberse sobre la superficie de estas nuevas AgNPs y agregarse en una segunda etapa de centrifugación. Para ello,

se agregó 1,0 g de  $K_2CO_3$  y se centrifugó nuevamente en el mismo tubo a 7000 rpm por 45 minutos. El papel aluminio fue extraído para el posterior análisis del nuevo agregado. En todos los casos se colectaron los espectros con 0,1s de tiempo de acumulación cada uno y se analizaron aquellos que presentan el fenómeno SERS.

#### 4.1.4. Resultados

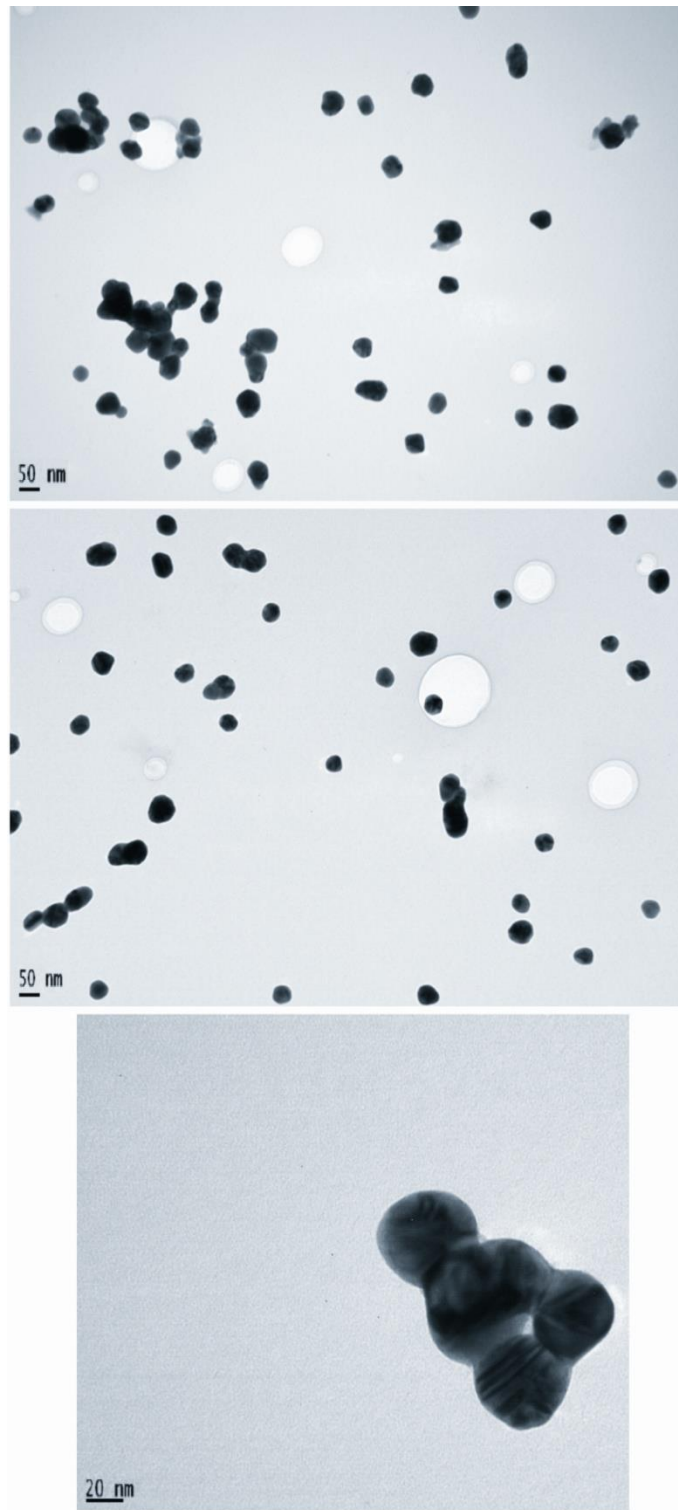
##### 4.1.4.1. Caracterización de AgNPs

Las AgNPs analizadas por microscopía TEM mostraron tener un diámetro promedio de 49,5 nm con la siguiente distribución (Figura 4.2):



**Figura 4.2.** Distribución del tamaño de las AgNPs obtenidas.

Por otra parte, la Figura 4.3 presenta algunas de las imágenes tomadas por el microscopio TEM.



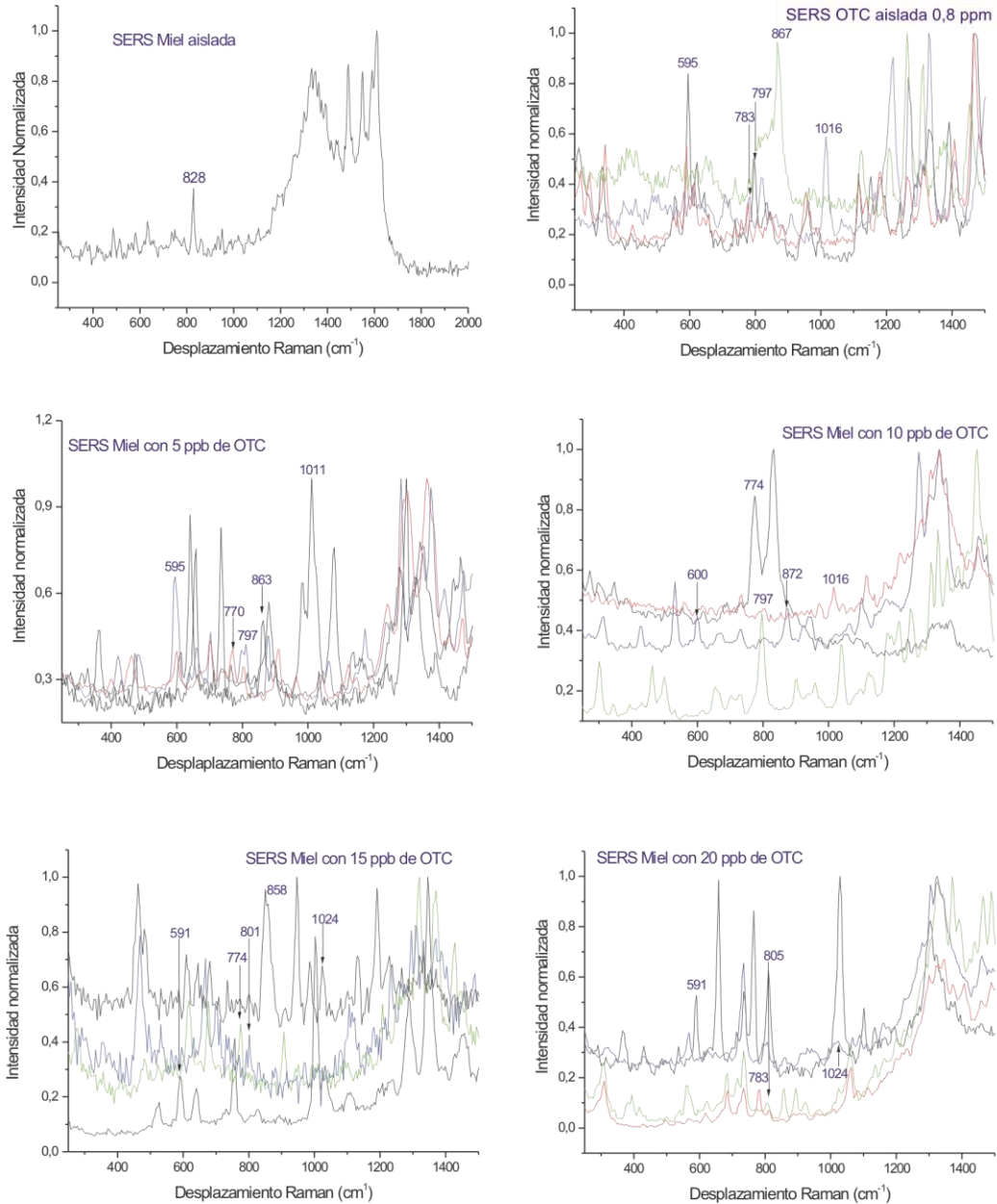
**Figura 4.3.** Fotografías TEM de las AgNPs sintetizadas como se detalla en la sección 3.4.

#### 4.1.4.2. Espectroscopía SERS

Las SC fueron analizadas a partir de los espectros Raman que presentan el fenómeno SERS, a lo largo de los 2 minutos de irradiación trabajando con el láser de 532 nm. La SCa) correspondiente a las AgNPs, sólo muestra picos alrededor de los 200  $\text{cm}^{-1}$ , atribuible al enlace Ag–O. En el caso de la SCb) se observan picos intensos a frecuencias mayores a 1100  $\text{cm}^{-1}$ , pertenecientes a los compuestos presentes en la miel, tal como se observa en la Figura 4.4. El estudio de las frecuencias en los espectros de la SCc) se realizó a valores menores a 1100  $\text{cm}^{-1}$ , para evitar solapamientos con los modos vibracionales pertenecientes al producto apícola. En esta SC se observan corrimientos Raman en 596, 780, 797, 865 y 1015  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la OTC, que se encuentran ausentes en la miel (SCb). La frecuencia 596  $\text{cm}^{-1}$  podría asignarse a una vibración de tipo “*bending*” del grupo amida. Por otro lado, las frecuencias 780, 797 y 1015  $\text{cm}^{-1}$  podrían deberse a deformaciones del esqueleto aromático de los enlaces C–C, y C–H; mientras que la vibración 865  $\text{cm}^{-1}$  puede ser asignada a estiramientos (*stretching*) del enlace C–N<sup>22,23,24</sup>. Estas vibraciones también fueron verificadas visualmente en la simulación realizada por DFT mediante la animación de los movimientos moleculares de la OTC, corroborando lo anteriormente citado por bibliografía. En la Tabla 4.1, se muestran los corrimientos Raman de la OTC con sus respectivas asignaciones, las cuales pueden observarse en la figura 4.4, solo en las SC que contienen OTC, si se tiene en cuenta el error instrumental de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ . Las SCd) a SCg) corresponden a muestras de miel con el agregado de diferentes concentraciones de OTC de 5, 10, 15 y 20 ppb, respectivamente. En la Figura previamente mencionada, puede también apreciarse que las intensidades de los picos para una misma frecuencia son muy variables y carentes de reproducibilidad, no siguiendo relación de ningún tipo con la concentración del analito. Esto puede deberse aparentemente a que, durante la centrifugación en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , el tamaño y forma de las AgNPs es extremadamente variable al igual que su interacción con el antibiótico. El tamaño, la forma



e interacción de las nanopartículas con el mismo, son variables que afectan en gran medida la intensidad relativa de los picos<sup>25,26,27,28</sup>.



**Figura 4.4.** Espectros SERS de la miel aislada, OTC aislada y miel con diferentes concentraciones de OTC. Las intensidades de los espectros se encuentran normalizadas.

**Tabla 4.1.** Frecuencias de la miel y la OTC (en  $\text{cm}^{-1}$ ) con sus respectivas asignaciones. En la columna "miel" se presentan las frecuencias de la misma que más se aproximan a las de OTC.

Miel	OTC medida	OTC calculada	OTC literatura	Asignaciones
573	596	599	594	$\delta(\text{amida-ONH})$
824	780	778	771	$\nu(\text{C-C}); \delta(\text{C-H})$ aromático
824	797	805	792	$\nu(\text{C-C}); \delta(\text{C-H})$ aromático
828	865	865	—	$\nu(\text{C-N})$
986	1015	1018	1002	$\nu(\text{C-C}); \delta(\text{C-H})$ aromático

$\delta$ : "Bending";  $\nu$ : "Stretching"

La Tabla 4.2 muestra, entre paréntesis, el número de veces que se presentaron las frecuencias 596, 780, 797, 865 y 1015  $\text{cm}^{-1}$  de OTC para cada SC durante los análisis.

**Tabla 4.2.** Modos normales de vibración en espectros SERS correspondientes a OTC tomados para las distintas SC. Los números entre paréntesis indican la cantidad de veces que dicha vibración aparece en el espectro a lo largo del tiempo. Las filas en un mismo color representan el mismo modo normal. El error del instrumento es de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$

OTC ( $\text{cm}^{-1}$ )	Miel con 5ppb de OTC ( $\text{cm}^{-1}$ )	Miel con 10ppb de OTC ( $\text{cm}^{-1}$ )	Miel con 15ppb de OTC ( $\text{cm}^{-1}$ )	Miel con 20ppb de OTC ( $\text{cm}^{-1}$ )
591 (1)	587 (1)	596 (1)	586 (3)	591 (2)
596 (5)	591 (3)	600 (2)	591 (5)	
605 (1)	596 (2)	605 (1)	595 (2)	
	600 (10)			
	605 (3)			
780 (2)	771 (1)	775 (1)	770 (1)	784 (1)
784 (3)	775 (3)	784 (1)	775 (1)	793 (2)
	780 (3)		779 (2)	
			784 (2)	
797 (3)	793 (4)	797 (6)	793 (2)	793 (2)
802 (3)	797 (2)	802 (3)	797 (2)	797 (2)
806 (2)	802 (5)	806 (5)	802 (4)	802 (3)
	806 (2)		806 (1)	806 (4)
868 (2)	855 (1)	855 (1)	863 (1)	859 (1)
	864 (1)	864 (1)		872 (2)
	868 (4)	868 (1)		
		872 (1)		
		877 (3)		
1016 (2)	1007 (2)	1007 (2)	1007 (1)	1012 (2)
	1012 (1)	1016 (2)	1011 (1)	
	1016 (1)	1020 (1)	1024 (2)	
	1025 (2)	1025 (1)		

Como puede observarse, se toma un rango de  $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$  para un mismo modo normal de vibración, ya que, como se comenta en la descripción de la tabla, es el error de medición instrumental.

#### **4.1.5. Conclusiones parciales**

Estas AgNPs demostraron ser adecuadas para el desarrollo del fenómeno SERS en la detección de OTC a nivel de trazas en muestras de miel, sin necesidad de realizar procesos de extracción o separación. Los modos vibracionales presentes en el producto apícola no se solapan con las correspondientes al antibiótico en 596, 780, 797, 865 y 1015  $\text{cm}^{-1}$ , pudiéndose de esta forma diferenciar dichas vibraciones, y detectar OTC presente a escasos ppb. Debido a las diferentes formas, tamaños e interacción de las AgNPs con el analito correspondiente al proceso de centrifugación y agregación, las intensidades relativas en los distintos espectros son variables y, por ende, no son reproducibles, siendo sí reproducibles los corrimientos Raman.

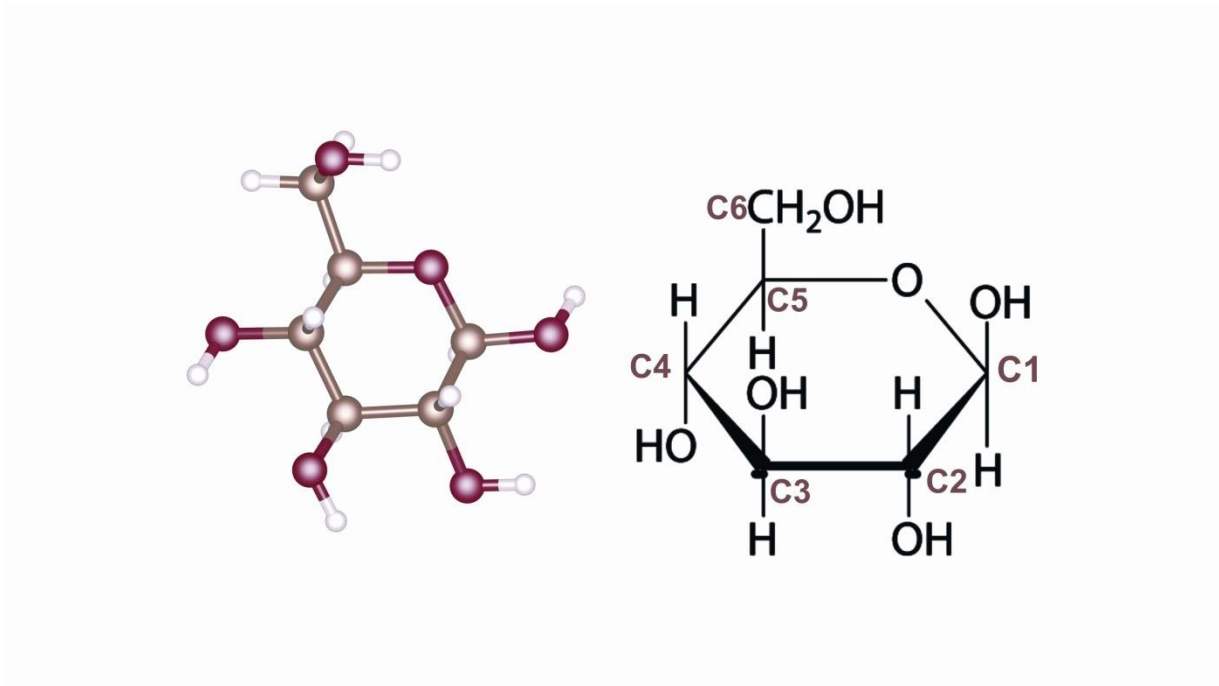
## **4.2. Estudio DFT de sensores de $\beta$ -D-Glucosa basados en nanotubos de carbono decorados con Pt**

Se optó iniciar por comenzar la investigación en el uso de nanotubos de carbono (CNT) decorados con metales de transición y su interacción con D-glucosa, uno de los principales componentes de la miel, mediante un estudio del sistema CNT/Pt. Dada la reactividad de la plata y la inexistente información de su acción como sensor en CNTs para este azúcar, decidimos emplear un sistema con amplio conocimiento en su comportamiento basado en CNT/Pt o CNT/Pd<sup>29,30,31,32</sup>, que nos permiten desarrollar el estudio de la interacción de la D-glucosa. Una intensa búsqueda de modelados Metal de transición/D-glucosa/CNT o grafeno arrojó muy escasos antecedentes en el tema, por lo que consideramos importante el aporte utilizando Pt para, en etapas posteriores, probar combinaciones con Ag y nanoclusters de Ag soportados sobre CNT o grafeno para su interacción con glucosa, con el fin de desarrollar sensores basados en estos nanomateriales.

### **4.2.1. Introducción**

La miel es un alimento dulce con un alto contenido de carbohidratos producido por las abejas obreras, a partir del néctar y otras sustancias presentes en las flores. En todos los casos su composición varía dependiendo de las especies de plantas pecoreadas por las abejas. Sin embargo, sus componentes principales son la glucosa (Figura 4.5) y fructosa<sup>33,34</sup>. Su alto valor nutricional, sabor único y una amplia gama de usos hacen de la miel un alimento deseable para los consumidores y, a su vez, un producto sujeto a diversas adulteraciones para reducir su costo, en detrimento de la calidad. Uno de los principales métodos para el propósito mencionado anteriormente es añadir jarabe de glucosa. Esto se

ha convertido en un tema de preocupación y objeto de estudio en las últimas décadas<sup>35,36</sup>



**Figura 4.5.** Molécula de  $\beta$ -D-Glucosa. Las esferas rojas, blancas y marrones corresponden a átomos de oxígeno, hidrógeno y carbono, respectivamente.

Con el fin de resolver estos problemas, la monitorización de la glucosa ha evolucionado en el último siglo con el desarrollo de sensores más sensibles y sofisticados. Éstos se pueden clasificar en ópticos o electroquímicos<sup>37</sup>. En el primer grupo, destacan los dispositivos basados en la transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET, por sus siglas en inglés)<sup>38,39</sup>, o los derivados del fenómeno de resonancia de plasmón superficial (LSPR)<sup>40,41</sup>. Por otro lado, los sensores electroquímicos pueden clasificarse en tres generaciones. La primera generación se basó en la captura de la enzima glucosa oxidasa (GO) en polímeros o membranas unidas a un mediador de electrones, que registra las señales producidas por las reacciones químicas del oxígeno en la superficie. La segunda generación incluye nuevos mediadores redox que sustituyen al oxígeno, como ferroceno, ferricianuro, quinonas y tioninas, entre otros. La tercera generación elimina

estos mediadores para lograr una mayor sensibilidad y selectividad sin necesidad de reactivos. Por último, la última generación también utiliza nanomateriales (nanobiosensores), que aumentan drásticamente la reproducibilidad, especificidad y estabilidad de estos dispositivos<sup>35</sup>. Un ejemplo de biosensores es la interacción de una lámina de grafeno con quitosano, para la detección de glucosa y colesterol<sup>42</sup>. Otros materiales interesantes son los nanotubos de carbono (CNTs), que presentan excelentes propiedades en la catálisis heterogénea debido a su tamaño a nanoescala, alta relación superficie-volumen y estabilidad química, permitiendo una excelente comunicación eléctrica entre la superficie y los biocomponentes inmovilizados lo cual los hace ideales para biosensores analíticos de alta calidad<sup>43,44</sup>. La eficacia de estos dispositivos depende altamente del número de sitios activos capaces de unirse al analito con alta sensibilidad y reactividad<sup>45</sup>. La adición de átomos de metales de transición a CNTs (CNT decorado) es una estrategia bien conocida en la detección de glucosa<sup>46,47</sup>. Otra estrategia que puede mencionarse es la funcionalización de nanotubos de nitruro de boro (5,5), con grupos hidroxilo y grupos tiol<sup>48</sup>. A pesar de los numerosos estudios experimentales sobre este tipo de dispositivos, existe una investigación teórica limitada sobre la eficiencia de estos metales como sitios activos de unión para la adsorción de glucosa en CNT decorados. Ganji y col.<sup>49</sup> estudiaron la adsorción de glucosa sobre nanotubos de carbono pared simple (SWCNT) funcionalizados con Pt, encontrando una interacción mucho mayor entre el carbohidrato y el adsorbente que la del nanotubo intrínseco sin decoración.

#### 4.2.2. Objetivos

En este capítulo, se estudiaron las propiedades de los SWCNT decorados con Pt como potenciales sensores de  $\beta$ -D-glucosa por medio de la teoría del funcional de la densidad, incluyendo las interacciones de van der Waals (vdW). Se analizó la influencia de estas fuerzas en diferentes geometrías de adsorción y su papel en el mecanismo de unión, junto con los cambios en la estructura electrónica, con el fin de aportar más información para la comprensión y desarrollo de este tipo de sensores.

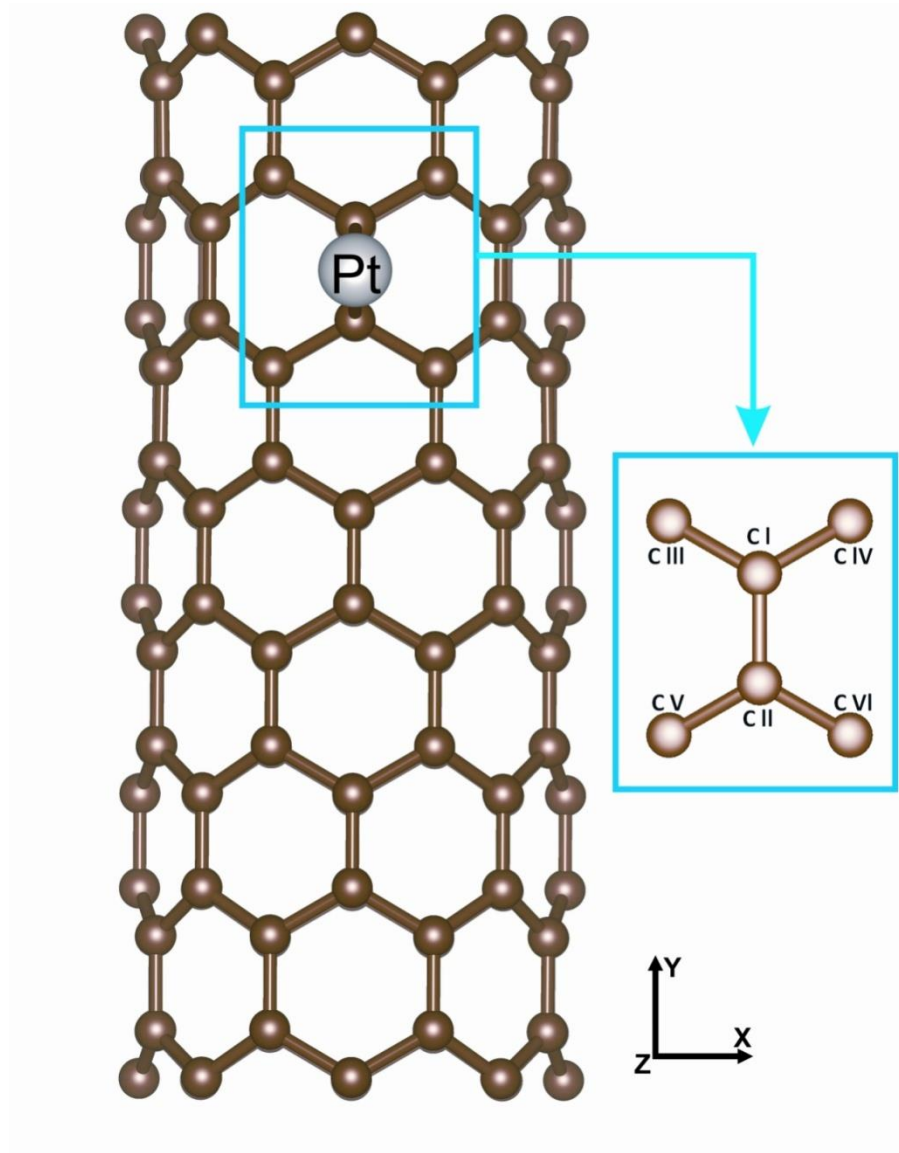
#### 4.2.3. Métodos computacionales

Los cálculos DFT de spin-polarizado se realizaron utilizando el método *projector augmented wave* (PAW)<sup>50</sup> como se implementa en el código *Vienna Ab initio Simulation Package* (VASP)<sup>51,52,53,54</sup>. Se seleccionó la aproximación de gradiente generalizado (GGA) y el funcional de intercambio-correlación de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE)<sup>55,56</sup>, con una energía de corte de 520 eV para el set de bases de expansión de ondas planas. Se empleó el algoritmo de gradiente conjugado para relajar las posiciones iónicas, con un criterio de convergencia fijado en  $10^{-3}$  eV/Å para cada átomo y  $10^{-4}$  eV para la energía total. Se dejaron relajar todas las coordenadas atómicas durante la optimización geométrica. Los efectos de las fuerzas de vdW sobre las propiedades electrónicas y estructurales del sistema Glucosa/Pt/SWCNT fueron evaluados mediante el funcional vdW-DF<sup>57,58,59</sup>. Estos métodos se utilizaron en varias oportunidades con éxito en la simulación de diferentes estructuras de carbono y nanoestructuras<sup>60,61,62,63</sup>.

Se eligió el típico SWCNT (8,0). Se aplicó una condición de frontera periódica unidimensional a lo largo del eje del tubo, con una constante de red supercelular de 8,53 Å (Figura 4.6). La distancia desde el eje del nanotubo y su imagen respectiva era de 20 Å con el fin de evitar cualquier interacción entre las imágenes periódicas. La decoración del SWCNT (8,0) fue modelada adsorbiendo un átomo de Pt en un sitio de puente regular (por



encima de un enlace axial C–C), que es la ubicación preferencial de un único átomo de Pt sobre la superficie del nanotubo de carbono<sup>64,65</sup>. En todos los cálculos, se tomó *un Monkhorst-Pack*  $1 \times 7 \times 1$  puntos k de malla<sup>66</sup> para la integración en la zona de Brillouin (Figura 4.6).



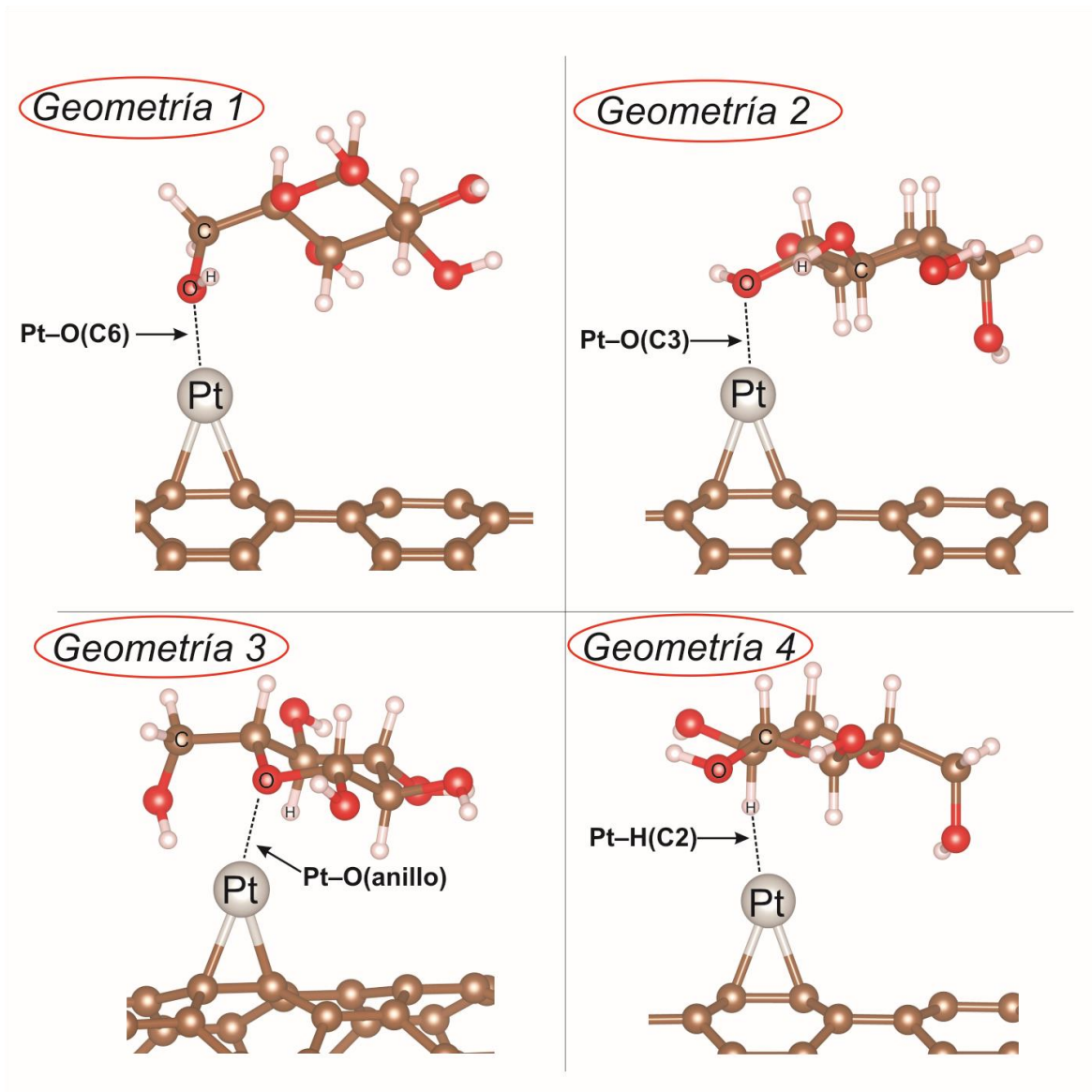
**Figura 4.6.** Nanotubo de carbono decorado con Pt (visto desde arriba).

Siguiendo un estudio DFT anterior<sup>49</sup>, se consideraron cuatro geometrías para la adsorción de  $\beta$ -D-glucosa sobre el SWCNT (8,0) decorado con Pt. En esas geometrías la molécula de  $\beta$ -D-glucosa (Figura 4.5) interactúa con el átomo de Pt a través de diferentes átomos: El átomo de oxígeno perteneciente al grupo –COH ubicado por fuera del anillo

(geometría 1), un átomo de oxígeno del grupo –OH perteneciente al anillo (geometría 2), El átomo de O perteneciente al anillo (geometría 3); o un átomo de H del anillo (geometría 4). En la Figura 4.7 se muestran las diferentes configuraciones de adsorción. Otras geometrías presentan menos posibilidades de desarrollar interacciones de largo alcance. La energía de adsorción ( $E_{ads}$ ) de  $\beta$ -D-glucosa en SWCNT decorado con Pt se definió como la diferencia entre la energía total del sistema glucosa / Pt / SWCNT y la suma de las energías del huésped aislado (SWCNT decorado con Pt) y la molécula  $\beta$ -D-glucosa aislada:

$$E_{ads} = E(\beta\text{-D-glucosa/Pt/SWCNT}) - E(\text{Pt/SWCNT}) - E(\beta\text{-D-glucosa}) \quad \text{Ec. 4.1}$$

De acuerdo con esta definición, un valor de energía de adsorción negativo corresponde a una interacción estable entre la molécula de glucosa y el nanotubo decorado.



**Figura 4.7.** Geometrías estudiadas para la adsorción de  $\beta$ -D-glucosa en Pt/SWCNT y sus principales interacciones (líneas punteadas). Los átomos de glucosa se definieron en la Figura 4.5.

También se realizó un estudio cualitativo de las interacciones de unión desarrollado durante la adsorción molecular de  $\beta$ -D-glucosa. Para este propósito, se calculó el orden de enlace (BO) por átomo y la población de solapamiento (OP) entre átomos en estructuras extendidas<sup>67,68</sup> para las geometrías previamente optimizadas de  $\beta$ -D-glucosa / Pt / SWCNT utilizando el método DDEC6<sup>69,70,71</sup>. También evaluamos la densidad de estados proyectada por átomos (PDOS) para analizar la evolución de la estructura electrónica de glucosa, Pt y SWCNT durante el proceso de adsorción.

#### 4.2.4. Resultados y discusión

##### 4.2.4.1. Optimización geométrica

Se realizó una optimización completa de las geometrías con el fin de obtener las configuraciones de adsorción más estables. La Tabla 4.3 muestra los valores de energía de adsorción correspondientes a las diferentes configuraciones  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT. Allí se incluyen tanto los resultados de los cálculos de PBE como los de vdW-DF. Se puede observar que en todos los casos se obtuvieron valores negativos, lo que significa que la adsorción es un proceso energéticamente favorable. La Tabla 4.3 también muestra que no hay diferencias significativas entre las energías de adsorción de PBE para las geometrías 1, 2 y 3 (Figura 4.7), siendo la configuración 1 ligeramente favorecida. La geometría 4, en la cual el decorado de Pt interactúa con un átomo de H del anillo de glucosa, resulta inestable sin fuerzas de dispersión.

**Tabla 4.3.** Energías de adsorción para el sistema  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT

Sistema $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT	$E_{ads}$ (eV)	
	Método PBE <sup>55</sup>	Método vdW-DF <sup>57,58,59</sup>
Geometría 1	-1,07	-1,08
Geometría 2	-1,04	-1,15
Geometría 3	-1,03	-1,13
Geometría 4	—	-0,53

La Tabla 4.3 también muestra que la energía de adsorción total de la geometría 1 no cambia significativamente al incorporar interacciones vdW. Sin embargo, valores ligeramente más negativos se obtienen en el caso de las geometrías 2 y 3, modificando así la tendencia obtenida con el funcional PBE. La geometría 4 resulta estable cuando se incluyen las interacciones de vdW, pero presenta la energía de adsorción menos negativa. Por lo tanto, se puede suponer que se desarrollan interacciones de largo alcance significativas entre la glucosa y el nanotubo decorado, proporcionando así estabilidad a tales sistemas. De manera similar Ganji y col.<sup>49</sup> realizaron cálculos de vdW-DF con el código SIESTA y encontraron que las geometrías más estables se producían cuando la  $\alpha$ -glucosa se adsorbía en un SWCNT decorado con Pt a través de sus oxígenos, en particular a través de los grupos  $-\text{COH}$  y  $-\text{OH}$ .

#### **4.2.4.2. Análisis de los cambios en enlace químico**

Se realizó un detallado análisis de OP y BO sobre todas las geometrías de adsorción optimizadas, con el fin de describir la naturaleza y la evolución de las uniones químicas. La Tabla 4.4 muestra las longitudes de enlace y los valores de OP correspondientes a las interacciones de corto alcance en sistemas aislados de  $\beta$ -D-glucosa, Pt/SWCNT y  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT. La comparación entre los resultados de PBE y vdW-DF reveló sólo cambios menores (de hasta 0,02 Å) en las longitudes de enlace cuando se consideran las fuerzas de dispersión, excepto para las interacciones C-Pt y Pt-O, en las que los incrementos fueron de hasta 0,03 Å y 0,06 Å, respectivamente.

**Tabla 4.4** Distancias ( $d$ ) y sus valores de OP, entre paréntesis, para los enlaces seleccionados en la  $\beta$ -D-glucosa libre, los sistemas Pt/SWCNT aislados y  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT.

Enlace	$\beta$ -D-glucosa libre		Pt/SWCNT		$\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT							
			aislado		Geometría 1		Geometría 2		Geometría 3		Geometría 4	
	$d$ (Å)	OP	$d$ (Å)	OP	$d$ (Å)	OP	$d$ (Å)	OP	$d$ (Å)	OP	$d$ (Å)	OP
Pt-O(C6)	—	—	—	—	2,18	0,44	—	—	—	—	—	—
Pt-O(C3)	—	—	—	—	—	—	2,22	0,39	—	—	—	—
Pt-O(anillo)	—	—	—	—	—	—	—	—	2,23	0,36	—	—
Pt-H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,98	0,22
C(I)-Pt	—	—	2,09	0,48	2,11	0,46	2,11	0,45	2,10	0,46	2,10	0,46
C(II)-Pt	—	—	2,09	0,48	2,09	0,48	2,1	0,47	2,11	0,46	2,11	0,45
C(I)-C(II)	—	—	1,47	0,65	1,45	0,68	1,45	0,68	1,45	0,68	1,46	0,67
O(C6)-H	0,97	0,54	—	—	0,98	0,5	0,98	0,54	0,99	0,55	0,98	0,54
O(C6)-C6	1,44	0,72	—	—	1,47	0,64	1,44	0,72	1,43	0,73	1,44	0,72
C5-O(anillo)	1,46	0,64	—	—	1,46	0,64	1,46	0,64	1,5	0,58	1,46	0,63
C3-O(C3)	1,45	0,69	—	—	1,44	0,69	1,49	0,6	1,45	0,69	1,44	0,7
O(C3)-H	0,97	0,54	—	—	0,97	0,53	0,98	0,49	0,98	0,53	0,98	0,53
C1-O(C1)	1,42	0,72	—	—	1,41	0,72	1,41	0,72	1,40	0,74	1,41	0,72
O(C1)-H	0,97	0,54	—	—	0,97	0,53	0,97	0,53	0,98	0,52	0,97	0,53
C1-O(anillo)	1,44	0,65	—	—	1,45	0,64	1,44	0,65	1,49	0,56	1,44	0,65

Se puede observar en la Tabla 4.4 que, cuando la  $\beta$ -D-glucosa es adsorbida en la geometría 1, se desarrolla una fuerte interacción Pt–O entre el O del grupo –COH de la glucosa y el Pt de la decoración, con un valor de OP de 0,44 y una longitud de enlace de 2,18 Å. Como consecuencia, los enlaces C–Pt entre el nanotubo y el metal de transición se alargan hasta el 1,0%, con una disminución del 2,6% en el valor OP. Al mismo tiempo, el enlace C–C perteneciente al puente de la decoración en el SWCNT se contrae y se refuerza un 1,1% y un 3,6%, respectivamente. Por el contrario, otros enlaces C–C del SWCNT decorado casi no se ven afectados. El proceso de adsorción también provoca cambios en los solapamientos poblaciones de la molécula de  $\beta$ -D-glucosa, particularmente en los enlaces C6–O(Pt) y O(C6)–H, los cuales experimentan un significativo debilitamiento (10,7 and 8,6%, respectivamente). En el caso de la geometría 2, la Tabla 4.4 muestra el desarrollo de un importante enlace Pt–O a través del grupo –OH del anillo con una longitud

de 2,22 Å y un valor de OP de 0,39. Como resultado de esta interacción adsorbato–sustrato, los enlaces Pt–C(I) y Pt–C(II) del SWCNT decorado se estiran 1,3 % and 0,4 %, respectivamente, junto con un marcado debilitamiento de sus valores de OP. Simultáneamente, el enlace C(I)–C(II) se fortalece un 4,0% mientras que su distancia disminuye un 1,2%. Por otra parte, los enlaces C3–O(Pt) y O(C3)–H de la  $\beta$ -D-glucosa sufren un debilitamiento considerable luego de la adsorción, disminuyendo sus valores de OP en un 12,9% y 7,9%, respectivamente.

Para la geometría 3, la interacción tiene lugar principalmente a través del átomo O del anillo de glucosa, alcanzando un valor de OP para el enlace Pt–O de 0,36 y una distancia de enlace de 2,23 Å. En este proceso, los enlaces entre los átomos de Pt y C del nanotubo se alargan en aproximadamente un 1,0%, con una disminución de OP hasta 4,4%. El enlace C–C que soporta la decoración de Pt se contrae un 1,0% y se fortalece un 3,4%. Al mismo tiempo, los enlaces C–O5 y C–O1 en la  $\beta$ -D-glucosa se debilitan notablemente después de la adsorción. De hecho, los valores OP de dichos enlaces disminuyen un 9.7 % (O–C5) y un 13.2 % (O–C1) mientras que sus enlaces se estiran un 2.5 % and 3.6 %, respectivamente. Por último, en la geometría 4, la interacción ocurre principalmente a través del H(C2), originando una interacción H–Pt con un valor de OP de 0,22 y una distancia de enlace de 1,98 Å. En consecuencia, los enlaces Pt–C (I) y Pt–C (II) se alargan un 0,8% y 1,1%, respectivamente, mientras que los correspondientes valores de OP disminuyen hasta 4,8%. Así mismo el enlace C (I)–C (II) también se ve afectado después de la adsorción: su valor OP aumenta 0,6% y su longitud disminuye 2,1%. Los resultados de la Tabla 4.4 muestran que el valor OP de Pt–O es más importante en la geometría 1 que en las otras configuraciones. Sin embargo, los valores de energía de adsorción más estables que se muestran en la Tabla 4.3 corresponden a las geometrías 2 y 3, cuando se incluye el método vdW-DF, por lo que también deberemos tener en cuenta las interacciones de largo alcance. De este modo, con el objetivo de estudiar las contribuciones de enlace a corto y largo alcance se analizaron los valores de OP totales

pertenecientes a la suma de interacciones Pt–O, Pt–C(glucosa), Pt–H, C(SWCNT)–O ó C(SWCNT)–H. La Tabla 4.5 enumera las sumas de valores OP obtenidas para las interacciones átomo- átomo previamente seleccionado. Se observa que para las geometrías 1 y 2 los solapamientos Pt–O de corto alcance (enlaces químicos) contribuyen en 98,4 y 97,4%, respectivamente, al OP total de las interacciones Pt–O, mientras que en geometría 3 esta contribución disminuye al 79,3%. Este comportamiento sugiere que en la geometría 3 se presentan más interacciones Pt–O de largo alcance, lo que confiere una alta estabilidad a la glucosa adsorbida. Puede observarse también en la Tabla 4.5, que los solapamientos de Pt–C (glucosa), Pt–H, C(SWCNT)–O y C(SWCNT)–H de largo alcance son mayores en la geometría 2 y 3 que los que pertenecen a la geometría 1. En otras palabras, podría decirse que las interacciones de corto alcance entre  $\beta$ -D-glucosa y Pt/nanotubo son las predominantes en la geometría 1, mientras que las interacciones de largo alcance son más importantes en las geometrías 2 y 3. Aunque estos solapamientos de largo alcance están menos desarrollados, proporcionan una clara estabilidad al adsorbato, cambiando el orden de estabilidad. Finalmente, las interacciones seleccionadas mostradas en la Tabla 4.5 para la geometría 4 son, en todos los casos, similares o más pequeñas que las pertenecientes a las otras configuraciones, con excepción del solapamiento Pt–H. Por lo tanto, el valor de energía de adsorción menos negativo se obtuvo para dicha geometría, como puede observarse en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.5.** Suma de los valores de OP pertenecientes a interacciones de corto y largo alcance para los sistemas  $\beta$ -glucosa/Pt/SWCNT



Interacción	$\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT			
	Geometría 1	Geometría 2	Geometría 3	Geometría 4
Pt-O	0,446	0,397	0,449	0,048
Pt-C (glucosa)	0,042	0,081	0,124	0,047
Pt-H	0,081	0,125	0,19	0,281
C(SWCNT)-O	0,001	0,031	0,011	0,032
C(SWCNT)-H	—	0,021	0,041	0,011

El análisis de BO, para los átomos que juegan un papel importante en el proceso de adsorción, permite arrojar más luz sobre el mecanismo de unión. La Tabla 4.6 enumera las sumas de los valores BO (SBO) para los átomos O, H y C relevantes, antes y después de la adsorción. El valor SBO para el Pt correspondiente al sistema Pt/SWCNT sin glucosa es menor que el observado después de la adsorción, aumentando para todas las geometrías  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT estudiadas como resultado de las nuevas interacciones adsorbato-soporte. La Tabla 4.6 también muestra que los valores de SBO pertenecientes a los C(I) y C(II), que participan en la decoración del nanotubo, sufren pequeños cambios después de la interacción de la glucosa, para todas las configuraciones de adsorción, mientras que los átomos de C alejados del punto de decoración ( $C_{\text{alejado}}$ ) casi no muestran diferencias en sus valores SBO cuando la glucosa se adsorbe. Con respecto a los átomos de O, se observa una evolución BO diferente de acuerdo con la configuración de adsorción. En efecto, la Tabla 4.6 muestra que el átomo O(C6) aumenta su valor SBO cuando el sistema adopta la geometría 1. El mayor incremento de SBO para el O(C3) corresponde a la geometría 2, y para el átomo de O perteneciente al anillo de glucosa se observa para la geometría 3. En el caso del H(C2), el cambio en el valor de SBO más importante tiene lugar en la geometría 4, en donde se desarrolla una interacción Pt-H(C2) muy importante.

**Tabla 4.6.** SBO para los principales átomos involucrados, antes y después de la adsorción.

SBO	$\beta$ -D-glucosa libre	Pt/SWCNT aislado	$\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT			
			Geometría 1	Geometría 2	Geometría 3	Geometría 4
Pt	—	1,727	2,463	2,416	2,496	2,135
C(I)	—	4,082	4,100	4,101	4,104	4,087
C(II)	—	4,085	4,118	4,120	4,115	4,080
O(C6)	2,237	—	2,571	2,274	2,314	2,277
O(C3)	2,208	—	2,211	2,409	2,210	2,217
O(ring)	2,582	—	2,573	2,570	2,605	2,585
H(C2)	0,901	—	0,899	0,938	0,958	1,015
C <sub>alejado</sub>	—	3,912	3,911	3,917	3,911	3,916

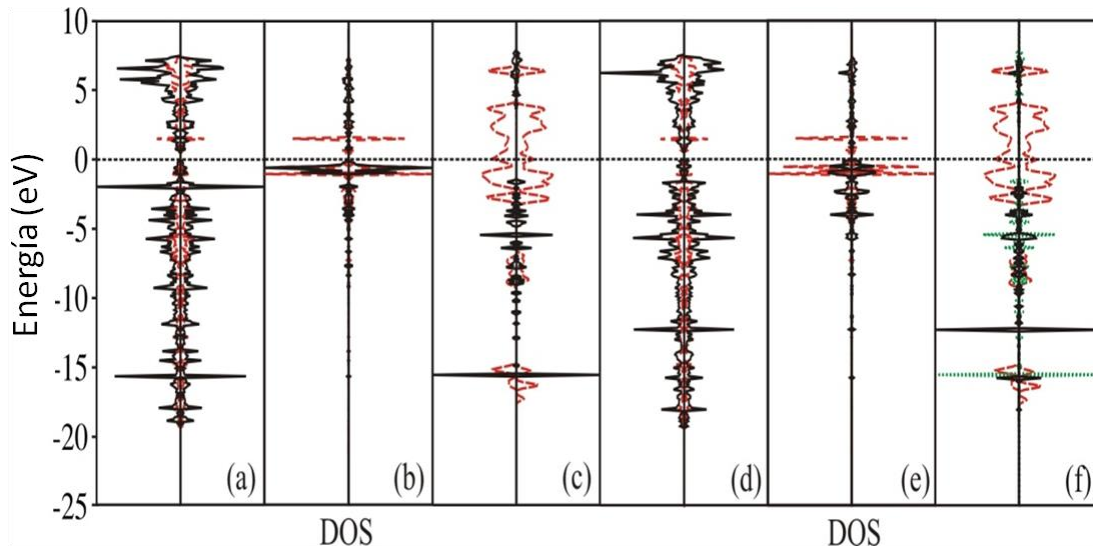
Finalmente, la Tabla 4.7 detalla las contribuciones de diferentes átomos de glucosa a los valores totales de Pt BO después de la adsorción. En las geometrías 1, 2 y 3 puede observarse que los átomos de O representan la contribución más importante a la unión con el Pt. La geometría 3 muestra la mayor contribución total de los átomos de glucosa a la unión total con el átomo de Pt: 0.895, lo cual representa el 35,8% del BO para esta geometría. En el caso de las geometrías 2 y 1, las contribuciones de la molécula de glucosa al BO total del Pt son menores (31,0 y 30,5%, respectivamente), lo cual está en concordancia con los menores valores de energía de adsorción calculados para esta geometría (Tabla 4.1). La geometría 4 presenta la contribución total más baja de los átomos de glucosa al BO total del Pt, siendo sólo el 23,6% de este valor de BO total. Los resultados de la Tabla 4.7 sugieren que en las geometrías 1, 2 y 3 las interacciones Pt–H, Pt–C y Pt–H de corto y largo alcance son menos fuertes que las superposiciones Pt–O. Sin embargo, sus contribuciones, juegan un papel relevante en el mecanismo de enlace. Para la geometría 4, la contribución más importante en el proceso de adsorción corresponde a la interacción Pt–H.

**Tabla 4.7.** Contribución de los átomos de glucosa al BO total del Pt

Átomos de $\beta$ -D-glucosa	BO Pt			
	Geometría 1	Geometría 2	Geometría 3	Geometría 4
O(C6)	0,617		0,043	0,009
O(C3)		0,523		0,028
O(anillo)	0,002		0,465	0,021
Otros átomos de O (suma)	0,005	0,011	0,055	0,019
H(C2)		0,041	0,040	0,256
Otros átomos de H (suma)	0,084	0,089	0,164	0,064
Átomos de C (suma)	0,044	0,085	0,128	0,106
Átomos de glucosa (suma)	0,752	0,749	0,895	0,503
Total	2,463	2,416	2,496	2,135
% BO Pt-glucosa	30,5	31,0	35,8	23,6

#### 4.2.4.3. Estructura electrónica

La estructura electrónica del Pt/SWCNT y de la molécula de glucosa se muestran en la Figura 4.8. El DOS total muestra una estabilización después de la adsorción para las geometrías evaluadas más estables (ver Figuras 4.8a y 4.8d). El DOS total del sistema  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT revela un pequeño desplazamiento hacia energías menores luego de la adsorción. Para la geometría 3, la curva de DOS es más amplia en su rango de energía en comparación con la geometría 2, estando los últimos picos situados en -19,1 eV y -19,6 eV, respectivamente. Por otra parte, el DOS total en la geometría 2 presenta fuertes picos en la región energética comprendida entre -1,5 y -19,0 eV. El PDOS tanto del átomo de Pt como de la glucosa después de la adsorción, muestran también un cambio a energías más bajas (ver Figuras 4.8b a 4.8f). El PDOS de la molécula adsorbida de glucosa en la geometría 2 muestra un pico agudo a -15,3 eV y un pico muy pequeño a -19,1 eV. En el caso de la geometría 3, el PDOS para la glucosa presenta un pico agudo a -12,0 eV y luego picos menores a -15,4 eV y -19,6 eV. El diferente valor en energías de los picos agudos en las curvas PDOS de la glucosa indica que la geometría 2 es ligeramente más estable que la geometría 3.



**Figura 4.8.** curvas DOS para el sistema  $\beta$ -D-glucosa/Pt/SWCNT: a) Total, b) proyectado sobre el átomo de Pt y c) sobre la molécula de glucosa para la geometría 2, d) Total, e) proyectado sobre el átomo de Pt y f) sobre la molécula de glucosa para la geometría 3. La línea de relleno negro indica el sistema después de la adsorción de la glucosa y la línea roja discontinua corresponde al Pt/SWCNT y a la molécula de glucosa en el vacío (antes de la adsorción). La línea punteada verde en (f) es el PDOS de la molécula de glucosa para la geometría 2.

La interacción entre el átomo de Pt y el nanotubo se ve afectada por la adsorción, como lo revelan los picos con su intensidad incrementada y los cambios en su energía. Los agudos picos en -5,5 y -15,3 eV para la geometría 2 (a -5.6, -12.0 y -15.4 eV para la geometría 3) procedentes de los orbitales de glucosa estabilizados luego de la adsorción (comparar Figura 4.8a con 4.8c, y 4.8d con 4.8f). Los picos en -2,1 y -15,4 eV en la Figura 4.8b y a -2,2 y -15,5 eV en la Figura 4.8f corresponden a la interacción de la glucosa con el Pt. La mayor hibridación en las regiones mencionadas muestra la interacción de los orbitales de la molécula de glucosa con el fondo de la banda d del metal y el SWCNT (comparar Figura 4.8a con 4.8c y 4.8d con 4.8f).

#### 4.2.5. Conclusiones parciales

Se analizaron la adsorción y estabilidad de la  $\beta$ -D-glucosa sobre SWCNT decorado con Pt, con el fin de comprender las principales interacciones adsorbato-soporte. Se hizo especial énfasis en el estudio de las propiedades de enlace a través de análisis OP y BO.

Los cálculos sin fuerzas de vdW muestran una ligera preferencia por la geometría 1, con una energía de -1,07 eV, mientras que las geometrías 2 y 3 fueron favorecidas cuando se tuvieron en cuenta estas interacciones mostrando una energía de adsorción de -1,15 y -1,13 eV, respectivamente. La geometría 4 solo se encontró estable con fuerzas vdW. Pt–O fue el principal enlace de corto alcance encontrado, particularmente para las estructuras 1, 2 y 3. Sin embargo, los valores OP muestran una importante contribución de las interacciones de largo alcance para las geometrías 2 y 3 a través de los átomos  $\beta$ -D-glucosa fuera del sitio principal de unión, contribuyendo así, a la estabilidad de estas estructuras. De esta manera, los átomos de O y H situados lejos del átomo de Pt interactúan principalmente con este, pero también pueden hacerlo con átomos de C pertenecientes al SWCNT. El análisis de BO confirma nuestro estudio de OP y la influencia de vdW en la estabilización de las geometrías antes citadas. Los resultados coinciden con trabajos anteriores y proporcionan un interesante análisis de OP, BO y DOS que revelan la contribución de las interacciones de largo alcance.

#### 4.6. Referencias

---

<sup>1</sup> I. Chopra, M. Roberts, Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) 232–260.

<sup>2</sup> A. Gajda, A. Posyniak, A. Bober, T. Błądek, J. Żmudzki, Oxytetracycline Residues in Honey Analyzed by Liquid Chromatography with UV Detection, *J. Apic. Sci.* 57 (2013) 25–32.

- 
- <sup>3</sup> V. Prakash, O. Martin-Belloso, L. Keener, S. Astley, S. Braun, H. McMahon, H. Lelieveld, *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*, Academic Press (2015) ISBN: 9780128006054.
- <sup>4</sup> W. Witte, Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture, *Science*, 80, 279 (2016) 996–997.
- <sup>5</sup> I. Phillips, M. Casewell, T. Cox, B. De Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, J. Waddell, Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2004) 28–52.
- <sup>6</sup> <http://www.senasa.gob.ar>
- <sup>7</sup> A. Gajda, A. Posyniak, A. Bober, T. Błądek, J. Żmudzki, Oxytetracycline Residues in Honey Analyzed by Liquid Chromatography with UV Detection, *J. Apic. Sci.* 57 (2013) 25–32.
- <sup>8</sup> Z. Barganska, J. Namiesnik, M. Slebioda, Determination of antibiotic residues in honey, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1035–1041.
- <sup>9</sup> M. Hosseini, F. Mehrabi, M.R. Ganjali, P. Norouzi, A fluorescent aptasensor for sensitive analysis oxytetracycline based on silver nanoclusters, *Luminescence.* (2016) 1339–1343.
- <sup>10</sup> S. Xu, X. Li, Y. Mao, T. Gao, X. Feng, X. Luo, Novel dual ligand co-functionalized fluorescent gold nanoclusters as a versatile probe for sensitive analysis of Hg<sup>2+</sup> and oxytetracycline *Young Investigators in Analytical and Bioanalytical Science*, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2955–2962.
- <sup>11</sup> S.A. Shah, H. Ishinaga, K. Takeuchi, Oxytetracycline Inhibits Mucus Secretion and Inflammation in Human Airway Epithelial Cells, *Chemotherapy*, 62 (2017) 301-306.

- <sup>12</sup> S. Casado-Terrones, A. Segura-Carretero, S. Busi, G. Dinelli, A. Fernández-Gutiérrez, Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection, *Electrophoresis*. 28 (2007) 2882–2887.
- <sup>13</sup> G. Krepper, G. Pierini, M. Pistonesi, M. S. Di Nezio, “In-situ” antimony film electrode for the determination of tetracyclines in Argentinean honey samples, *Sens. Actuator B*. 241 (2017) 560–566.
- <sup>14</sup> X. Chen, W. Liang, C. Yang, W. Lin, M. Bi, Simultaneous quantitative detection of tetracyclines derivatives by raman spectroscopy, *Proc. IEEE Int. Conf. Virtual Environ. Human-Computer Interfaces, Meas. Syst.* (2012) 111–114.
- <sup>15</sup> A.L. Filgueiras, D. Paschoal, H.F. Dos Santos, A.C. Sant’Ana, Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 136 (2015) 979–985.
- <sup>16</sup> J. Zhao, P. Liu, H. Yuan, Y. Peng, Q. Hong, M. Liu, Rapid Detection of Tetracycline Residues in Duck Meat Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Spectrosc.* (2016) 6. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2016/1845237> Research.
- <sup>17</sup> F. Meng, X. Ma, N. Duan, S. Wu, Y. Xia, Z. Wang, B. Xu, Ultrasensitive SERS aptasensor for the detection of oxytetracycline based on a gold-enhanced nano-assembly, *Talanta*. 165 (2017) 412–418.
- <sup>18</sup> Y. Chen, X. Li, M., Libin Yang, X. Han, X. Jiang, B. Zhao, High sensitive detection of penicillin G residues in milk by surface enhanced Raman scattering, *Talanta* 167 (2017) 236–241.

- 
- <sup>19</sup> V. Barone, M. Cossi, Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model, *J. Phys. Chem. A.* 102 (2001) 1995–2001.
- <sup>20</sup> M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, Structures, and Electronic Properties of Molecules in Solution with the C-PCM Solvation Model., *J. Comp. Chem.* 24 (2003) 669–681.
- <sup>21</sup> Development of novel anionic Gemini surfactants and application in fabricating hierarchical silver microparticles for surface-enhanced Raman spectroscopy.
- <sup>22</sup> N. Gunasekaran, S. Varadhan, S. R. Karunanidhi, Qualitative analysis on the infrared bands of tetracycline and ampicillin, *Proceedings- Indian Natl. Sci. Acad. Part A.* 62 (1996) 309–316.
- <sup>23</sup> H. Deng, D. McShan, Y. Zhang, S.S. Sinha, Z. Arslan, P.C. Ray, H. Yu, Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 8840–8848.
- <sup>24</sup> M. Kumar Trivedi, S. Patil, H. Shettigar, R. Singh, S. Jana, Spectroscopic Characterization of Chloramphenicol and Tetracycline: An Impact of Biofield Treatment, *Ind. Eng. Manag.* 6 (2015) 395–400.
- <sup>25</sup> K.G. Stamplecoskie, J.C. Scaiano, V.S. Tiwari, H. Anis, Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Growth Lett.* 115 (2011) 1403–1409.
- <sup>26</sup> M.H. and Y.G. Alia Sabur, SERS intensity optimization by controlling the size and shape of faceted gold nanoparticles, *J. Raman Spectrosc.* 39 (2008) 61–67.
- <sup>27</sup> C.P. Shaw, M. Fan, C. Lane, G. Barry, A.I. Jirasek, A.G. Brolo, Statistical correlation between SERS intensity and nanoparticle cluster size, *J. Phys. Chem. C.* 117 (2013) 16596–16605.



---

<sup>28</sup> F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A.E. Shanahan, H.J. Byrne, Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape, *Anal. Methods*. 6 (2014) 9116–9123.

<sup>29</sup> E. Germán, I. López-Corral, S. Pirillo, A. Juan, G. Brizuela, A DFT study of cyclopropane adsorption on Pt(1 1 1). Electronic structure and bonding, *App. Surf. Sci.* 303 (2014) 324–330.

<sup>30</sup> I. López-Corral, B. Irigoyen, Alfredo Juan, Bonding in PdH<sub>2</sub> and Pd<sub>2</sub>H<sub>2</sub> systems adsorbed on carbon nanotubes: Implications for hydrogen storage, *Int. J. Hydrogen. Energ.* 39 (2014) 8780-8790.

<sup>31</sup> I. López-Corral, E. Germán, A. Juan, M.A. Volpe, G.P. Brizuela, Hydrogen adsorption on palladium dimer decorated graphene: A bonding study. *Int. J. Hydrogen. Energ.* 37 (2012) 6653-6665.

<sup>32</sup> V. Verdinelli, E. German, C. Luna, J. Marchetti, M. Volpe, A. Alfredo Juan, Theoretical Study of Hydrogen Adsorption on Ru-Decorated (8,0) Single-Walled Carbon Nanotube, *J. Phys. Chem.* 118 (2014), 27672–27680

<sup>33</sup> L. Wu, B. Du, Y. Vander Heyden, L. Chen, L. Zhao, M. Wang, X. Xue, Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge, *Trends Anal. Chem.* 86 (2017) 25-38.

<sup>34</sup> S. Bogdanov, *The honey book*. Ed. Bee Product Science. 2014. Available in: <http://www.bee-hexagon.net/> Accessed. 23.11.12.

<sup>35</sup> P. Y. Qiu, H. B. Ding, Y. K. Tang, R. J. Xu, Determination of Chemical Composition of Commercial Honey by Near-Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 47 (7) (1999) 2760–2765.

- 
- <sup>36</sup> J. Wang, X. Xue, X. Du, N. Cheng, L. Chen, J. Zhao, J. Zheng, W. Cao, Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography–Electrochemical Detection and Chemometrics, *Food Anal. Method.* 7(10) (2014) 2003–2012.
- <sup>37</sup> V. Scognamiglio, Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 12–25.
- <sup>38</sup> V. Scognamiglio, V. Aurilia, N. Cennamo, P. Ringhieri, L. Iozzino, M. Tartaglia, M. Staiano, G. Ruggiero, P. Orlando, T. Labella, L. Zeni, A. Vitale, S. D'Auria, D-galactose/D-glucose-binding Protein from *Escherichia coli* as Probe for a Non-consuming Glucose Implantable Fluorescence Biosensor, *Sensors.* 7(10) (2007) 2484–2491.
- <sup>39</sup> J.V. Veetil, S. Jin, K. Ye, A Glucose Sensor Protein for Continuous Glucose Monitoring, *Biosens Bioelectron.* 26 (2010) 1650–1655.
- <sup>40</sup> L. Tian, J. Qiu, Y. C. Zhou, S. G. Sun, Application of polypyrrole/GOx film to glucose biosensor based on electrochemical-surface plasmon resonance technique. *Microchim. Acta.* 169 (2010) 269–275.
- <sup>41</sup> A. Baba, P. Taranekar, R. R. Ponnappati, W. Knoll, R. C. Advincula, Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2 (2010) 2347–2354.
- <sup>42</sup> E. Chigo Anota, A. Torres Soto, G. Cocolletzi, Studies of graphene–chitosan interactions and analysis of the bioadsorption of glucose and cholesterol, *Appl Nanosci.* 8 (2014) 911–918.

- 
- <sup>43</sup> M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, Y. Lin, Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochem. Commun.* 4 (10) (2002) 743-746.
- <sup>44</sup> J. Li , H. T. Ng, A. Cassell, W. Fan, H. Chen , Q. Ye, J. Koehne , J. Han, M. Meyyappan, Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection, *Nano Lett.* 3 (2003) 597–602.
- <sup>45</sup> P. Pannopard, P. Khongpracha, M. Probst, J. Limtrakul, Gas sensing properties of platinum derivatives of single-walled carbon nanotubes: A DFT analysis, *J. Mol. Graph. Model.* 28 (2009) 62–69.
- <sup>46</sup> S. H. Lim, J. Wei , J. Lin, Q. Li, J. Kuayou , A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose oxidase onto Nafion-solubilized carbon nanotube electrode, *Biosens Bioelectron.* 20 (11) (2005) 2341-2346.
- <sup>47</sup> Z. Wen, S. Ci, J. Li, Pt Nanoparticles Inserting in Carbon Nanotube Arrays: Nanocomposites for Glucose Biosensors, *J. Phys. Chem. C.* 113 (31) (2009) 13482–13487.
- <sup>48</sup> E. Chigo Anot, G. Coccoletzi, First-principles simulations of the chemical functionalization of (5,5) boron nitride nanotubes, *J. Mol. Model.* 19 (2013) 2335-2341.
- <sup>49</sup> M. D. Ganji, F. S. E. Skardi, Adsorption of Glucose Molecule onto Platinum-Decorated Single-Walled Carbon Nanotubes: A Dispersion-Corrected DFT Simulation, *Fuller. Nanotub. Carb. N.* 23:3 (2015) 273-282.
- <sup>50</sup> P. E. Blochl, Projector Augmented-wave Method, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 50 (1994) 17953–17979.
- <sup>51</sup> W. Kohn, L. J. Sham, Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* 140 (1965) 1133–1138.

- 
- <sup>52</sup> G. Kresse, D. Joubert, From Ultrasoft Pseudopotentials to the Projector Augmented Wave Method, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 59 (1999) 1758–1775.
- <sup>53</sup> G. Kresse, J. Furthmüller, Efficiency of Ab-initio Total Energy Calculations for Metals and Semiconductors Using a Plane-wave Basis Set, *Comput. Mater. Sci.* 6 (1996) 15–50.
- <sup>54</sup> G. Kresse, J. Furthmüller, Efficient Iterative Schemes for Ab Initio Total-energy Calculations Using a Plane-wave Basis Set, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 54 (1996) 11169–11186.
- <sup>55</sup> J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865–3868.
- <sup>56</sup> J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, M. Erratum: Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1396–1396.
- <sup>57</sup> M. Dion, H. Rydberg, E. Schröder, D.C. Langreth, B.I. Lundqvist, Van der Waals density functional for general geometries, *Phys. Rev. Lett.* 92 (2004) 246401–246404.
- <sup>58</sup> G. Román-Pérez, J.M. Soler, Efficient implementation of a van der Waals density functional: application to double-wall carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.* 103 (2009) 096102–096105.
- <sup>59</sup> J. Klimes, D.R. Bowler, A. Michelides, Chemical accuracy for the van der Waals density functional, *J. Phys.: Cond Matt.* 22 (2010) 022201-022205.
- <sup>60</sup> J. Kleis, E. Schröder, P. Hyldgaard, Nature and strength of bonding in a crystal of semiconducting nanotubes: van der Waals density functional calculations and analytical results, *Phys. Rev. B.* 77 (2008) 205422-205431.

- 
- <sup>61</sup> L. Gao, Y. Liu, R. Shi, T. Ma, Y. Hu, J. Luo, Influence of interface interaction on the moiré superstructures of graphene on transition-metal substrates, *RSC Adv.* 7 (2017) 12179–12184.
- <sup>62</sup> I. López-Corral, S. Piriz, R. Faccio, A. Juan, M. Avena, A van der Waals DFT study of PtH<sub>2</sub> systems absorbed on pristine and defective graphene, *Appl. Surf. Sci.* 382 (2016) 80–87.
- <sup>63</sup> P. Lazic, Z. Crijen, Graphyne on metallic surfaces: A density functional theory study, *Phys. Rev. B.* 91 (2015) 125423–125427
- <sup>64</sup> E. Durgun, S. Dag, V. M. K. Bagci, O. Gülseren, T. Yildirim, S. Ciraci, Systematic study of adsorption of single atoms on a carbon nanotube, *Phys. Rev. B.* 67 (2003) 201401–201404.
- <sup>65</sup> E. Durgun, S. Dag, S. Ciraci, O. Gülseren. Energetics and electronic structures of individual atoms adsorbed on carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 575–582.
- <sup>66</sup> H. J. Monkhorst, J. D. Pack, Special Points for Brillouin-zone Integrations, *Phys. Rev. B: Solid State.* 13 (1976) 5188–5192.
- <sup>67</sup> R.J. Hoffmann, *Solids and Surfaces: A Chemist's View of Bonding in Extended Structures*, VCH, New York, 1988.
- <sup>68</sup> R. Dronskowski, *Computational Chemistry of Solid State Materials: A Guide for Materials Scientists, Chemists, Physicists and others*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- <sup>69</sup> T. A. Manz and N. Gabaldon-Limas, Introducing DDEC6 atomic population analysis: part 1. Charge partitioning theory and methodology, *RSC Adv.* 6 (2016) 47771-47801.
- <sup>70</sup> N. Gabaldon-Limas, T. A. Manz, Introducing DDEC6 atomic population analysis: part 2. Computed results for a wide range of periodic and non periodic materials, *RSC Adv.* 6(2016) 45727-45747.

---

<sup>71</sup> T. A. Manz, N. Gabaldon Limas, Chargemol program for performing DDEC analysis,  
Version 3.4.4, 2016, [ddec.sourceforge.net](http://ddec.sourceforge.net).

# **CAPÍTULO 5**

## 5.1. Conclusiones generales

En esta Tesis se desarrollaron nuevos métodos de síntesis verde y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) empleando métodos experimentales y análisis químico computacional. Asimismo, se estudiaron posibles aplicaciones de las nanopartículas sintetizadas en productos apícolas.

En una primera etapa se estudió un método de síntesis de AgNPs amigable con el medio ambiente. Para ello, se utilizó como agente reductor y estabilizante, una solución de miel en medio acuoso, en condiciones ácidas y alcalinas a temperatura ambiente. La velocidad de reacción mostró una dependencia del pH y de la concentración de miel. Las AgNPs obtenidas son esféricas y presentan un tamaño de alrededor de 15 nm. La síntesis propuesta es sencilla, rápida y no emplea reactivos nocivos para la salud o el medio ambiente.

En una segunda etapa, se desarrollaron nuevos métodos de caracterización de las AgNPs obtenidas:

-Se evaluó la técnica de Electroforesis Capilar (EC) con el fin de obtener una rápida caracterización de AgNPs. Esta técnica mostró ser efectiva en la separación de AgNPs, con un tiempo de análisis menor a 12 min. Mediante la aplicación del método propuesto, se obtuvo información valiosa sobre la distribución de tamaños, potencial zeta y estabilidad en el tiempo de las nanopartículas de plata a partir de una única corrida electroforética.

-Se evaluaron las moléculas que actúan como agentes bloqueantes sobre la superficie de las AgNPs empleando Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie (SERS) junto con cálculos teóricos utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Se estudiaron diferentes configuraciones de D-glucosa y anión gluconato sobre dicha superficie. El anión gluconato junto con dos geometrías de la D-glucosa mostraron



tener una presencia mucho más probable que el resto. También se ha encontrado el sitio de interacción preferente entre las AgNPs y la  $\alpha$ -D-glucosa.

Finalmente, las AgNPs obtenidas demostraron ser adecuadas en el desarrollo del fenómeno SERS en la detección de oxitetraciclina a nivel de trazas (escasos ppb) en muestras de miel, sin necesidad de realizar extracciones o separaciones. Se pudieron diferenciar las vibraciones correspondientes a la miel de las correspondientes al antibiótico

Se analizaron la adsorción y estabilidad de la  $\beta$ -D-glucosa sobre nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) decorado con Pt, con el fin de desarrollar sensores para dicho monosacárido. Se hizo especial énfasis en el estudio de las propiedades de enlace a través de análisis de Solapamiento Orbital y Orden de Enlace. Los cálculos sin fuerzas de vdW muestran una ligera preferencia por la geometría 1, correspondiente al enlace Pt–O del carbono del hidroximetil, ubicado por fuera del anillo, mientras que las geometrías 2 (oxidrilo del carbono 3 perteneciente al anillo) y 3 (oxígeno del éter perteneciente al anillo) fueron favorecidas cuando se tuvieron en cuenta estas interacciones. La geometría 4, correspondiente al hidrógeno del carbono 2 del anillo de glucosa, sólo se encontró estable con fuerzas vdW. Pt–O fue el principal enlace de corto alcance encontrado.

## 5.2. Trabajo a futuro

Próximamente se realizará un estudio más exhaustivo del rol de otros hidratos de carbono presentes en la miel, como la fructosa y la maltosa, como agentes bloqueantes en la síntesis de AgNPs; al mismo tiempo que se evaluarán sitios y configuraciones preferenciales de los mismos para una mejor caracterización.

Por otra parte, se continuará trabajando en la detección de oxitetraciclina con la finalidad de implementar un método de “screening” adecuado.

En cuanto al estudio de sensores de glucosa utilizando nanotubos de carbono (CNTs) decorados, por medio de la Teoría del Funcional de la Densidad, se evaluará la posibilidad de utilizar clusters de átomos de plata sobre dicho material, para, más adelante, modelar sistemas de mayor complejidad basados en AgNPs/CNT o AgNPs/grafeno.

# **CAPÍTULO 6**

## **Productividad**

### **6.1. Congresos**

1) Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, 19 al 20 de septiembre de 2013.

“MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS APÍCOLAS.”

González Fá, Alejandro; Juan, Alfredo; Di Nezio, María S.

2) 3er reunión NANOCORDOBA 2014. Ciudad de Córdoba, 22 al 24 de octubre 2014

“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES”

González Fá, Alejandro; Centurión, María E.; Pistonesi, Marcelo; Juan, Alfredo; Di Nezio, María S.

3) 8vo Congreso Argentino de Química Analítica. Ciudad de La Plata, del 3 al 6 de Noviembre de 2015.

“SÍNTESIS VERDE Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EMPLEANDO MIEL “

González Fá, Alejandro; Centurión, M.E.; Juan, A.; Di Nezio M.S.

4) 8vo Congreso Argentino de Química Analítica. Ciudad de La Plata, del 3 al 6 de Noviembre de 2015.

“DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROFORÉTICO PARA LA SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA”

González Fá, Alejandro; Cerutti, Isabella; Springer, Valeria; Girotti Stefano; Centurión, María E.; Di Nezio, María S.; Pistonesi Marcelo.

5) XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados Nano2016, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, del 9 al 13 de Mayo de 2016.

“CARACTERIZACIÓN MEDIANTE DFT Y MICROSCOPIA RAMAN CONFOCAL DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS A PARTIR DE PRODUCTOS NATURALES”

González Fá, Alejandro; López Corral, Ignacio; Faccio, Ricardo; Di Nezio, María S.; Juan, Alfredo.

6) XVII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados Nano2017, San Carlos de Bariloche, del 22 al 24 de Mayo de 2017.

“ESTUDIO DEL ROL DE LA GLUCOSA Y EL ÁCIDO GLUCÓNICO EN LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS CON MIEL POR MEDIO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN”

González Fá, Alejandro; López Corral, Ignacio; Faccio, Ricardo; Di Nezio, María S.; Juan, Alfredo.

7) XIII Reunión de la Asociación Argentina de Cristalografía, Bahía Blanca, del 1 al 3 de Noviembre de 2017.

“CARACTERIZACIÓN DE AgNPs OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE MEDIANTE TEM Y XRD.”

A. González Fa, M.A. Miranda, M. J. Yañez, M. Dailoff, M.S.Di Nezio.

8) 9no. Congreso Argentino de Química Analítica, Rio Cuarto, Córdoba, del 7 al 10 de Noviembre de 2017.

“EMPLEO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE PARA LA DETECCIÓN DE OXITETRACICLINA EN MIEL MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA EN SUPERFICIE”

González Fá, Alejandro; Pignanelli, Fernando; Faccio, Ricardo; Juan, Alfredo; Di Nezio, María Susana.

## **6.2. Publicaciones en revistas indexadas**

1) A. J. González Fá, A. Juan, M. S. Di Nezio. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Prepared with Honey: The Role of Carbohydrates, *Anal Lett.* 50 (2016) 877-888.

2) A. J. González Fá, V. Orazi, E.A. González, A. Juan, I. López-Corral, DFT study of  $\beta$ -D-glucose adsorption on single-walled carbon nanotubes decorated with platinum. A bonding analysis. *Appl. Surf. Sci.* 423 (2017) 542–548.

3) A. J. González Fá, I. Cerutti, V. Springer, S. Girotti, M. E. Centurión, M. S. Di Nezio, M. F. Pistonesi, Simple Characterization of Green-Synthesized Silver Nanoparticles by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia.* 80 (2017) 1459–1466.