

Deamelys Hernández Domínguez

**Detección, caracterización y  
cuantificación de nanomateriales de  
plata en presencia de plata iónica y  
su interacción con antibióticos  
mediante técnicas voltamétricas,  
redisolución de partículas  
inmovilizadas y cronoculombimetría  
de impacto**

Director/es

Castillo Suárez, Juan Ramón  
Vidal Ibáñez, Juan Carlos

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE NANOMATERIALES DE  
PLATA EN PRESENCIA DE PLATA IÓNICA Y SU  
INTERACCIÓN CON ANTIBIÓTICOS MEDIANTE  
TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS, REDISOLUCIÓN DE  
PARTÍCULAS INMOVILIZADAS Y  
CRONOCULOMBIMETRÍA DE IMPACTO**

Autor

Deamelys Hernández Domínguez

Director/es

Castillo Suárez, Juan Ramón  
Vidal Ibáñez, Juan Carlos

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2020



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE NANOMATERIALES  
DE PLATA EN PRESENCIA DE PLATA  
IÓNICA Y SU INTERACCIÓN CON  
ANTI BIÓTICOS MEDIANTE TÉCNICAS  
VOLTAMÉTRICAS, REDISOLUCIÓN DE  
PARTÍCULAS INMOVILIZADAS Y  
CRONOCULOMBIMETRÍA DE IMPACTO**

**DEAMELYS HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ**

**TESIS DOCTORAL 2020**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
NANOMATERIALES DE PLATA EN PRESENCIA DE PLATA IÓNICA Y SU  
INTERACCIÓN CON ANTIBIÓTICOS MEDIANTE TÉCNICAS  
VOLTAMÉTRICAS, REDISOLUCIÓN DE PARTÍCULAS INMOVILIZADAS Y  
CRONOCULOMBIMETRÍA DE IMPACTO**

**DEAMELYS HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ**  
**TESIS DOCTORAL 2020**



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza



Universidad Zaragoza

**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
NANOMATERIALES DE PLATA EN PRESENCIA DE PLATA IÓNICA  
Y SU INTERACCIÓN CON ANTIBIÓTICOS MEDIANTE TÉCNICAS  
VOLTAMÉTRICAS, REDISOLUCIÓN DE PARTÍCULAS  
INMOVILIZADAS Y CRONOCULOMBIMETRÍA DE IMPACTO**

MEMORIA presentada por **Dña. Deamelys Hernández Domínguez** para optar al grado de Doctor en Ciencia Analítica en Química por la Universidad de Zaragoza.



D. Juan Ramón CASTILLO SUÁREZ, Catedrático Emérito de la Universidad de Zaragoza, y D. Juan Carlos VIDAL IBÁÑEZ, Catedrático de la Universidad de Zaragoza,

**CERTIFICAN:**

que la presente Memoria de Tesis Doctoral:

*“Detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales de plata en presencia de plata iónica y su interacción con antibióticos mediante técnicas voltamétricas, redisolución de partículas inmovilizadas y cronoculombimetría de impacto”*

ha sido realizada bajo su dirección por **Dña. Deamelys Hernández Domínguez** en el Instituto de Ciencias Ambientales de Aragón, Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza, para optar al título de Doctora por la Universidad de Zaragoza.

Y asimismo autorizan la presentación de dicha Memoria para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 25 de mayo de 2020

Firmado: Juan R. Castillo

Firmado: Juan C. Vidal



Departamento de  
Química Analítica  
Universidad Zaragoza



Universidad  
Zaragoza



Este trabajo ha sido financiado con las siguientes ayudas y proyectos:

- OUTBIOTICS / Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y extracción de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA (EFA 183/16) (Cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional a través del Programa Interregional V A España / Francia / Andorra - POCTEFA 2014-2020). Años 2018-2021.
- Agencia Estatal de Investigación-Fondos FEDER. Proyecto RTI2018-096111-B-100, Nano/micro-metrología analítica: innovaciones en metodología analítica para sistemas (bio)particulados. Años 2019-2021.
- Gobierno de Aragón. Grupo de referencia “Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores” (E29\_17R). Cofinanciado con FEDER 2014-2020. Años 2017-2020.
- Ministerio de Economía y Competitividad-Fondos FEDER. Proyecto CTQ2015-68094-C2-1-R: Plataformas nanometrológicas analíticas para la detección, caracterización y cuantificación de nanomateriales inorgánicos en muestras complejas. Años 2016-2018.
- Universidad de Zaragoza y Santander Universidades. Beca para iberoamericanos en estudios de doctorado. Los autores quieren agradecer a Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Universidad de Zaragoza.
- Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), a través de la contratación de investigador iniciado (categoría N4) con un contrato de trabajo temporal PUI-2018-229.
- Ayuda de estancia de investigación IBERCAJA-CAI 2019.
- Ayuda a asistencia a congresos Universidad de Zaragoza. Curso 2018-2019.

*Vas de tu país a tu raíz  
Nunca te iras del todo  
Ni a los ruidos con silencios  
Ni a otras tierras con más oro*

## *Agradecimientos*

---

Agradezco a la Universidad de Zaragoza y al Instituto Universitario en Ciencias Ambientales de Aragón su acogimiento y toda la ayuda prestada.

Mi agradecimiento a los directores de esta Tesis.

Al profesor Juan Ramón Castillo, quien ha sido un soporte en los momentos más difíciles de estos años. Con su mirada objetiva y su experiencia científica supo dar soluciones a muchos de los problemas que me surgieron en el camino. Por eso, hoy le dedico estas palabras de agradecimiento y admiración.

Al profesor Juan Carlos Vidal, por su infinita paciencia y por toda la ayuda brindada en el cumplimiento de mis objetivos.

Agradezco también al resto de profesores del grupo GEAS, los cuales han puesto su granito de arena durante todo mi trabajo de investigación (gracias, Francisco Laborda y Eduardo Bolea). En especial a las chicas del grupo, las profesoras María Sierra, Teresa y Josefina, que se convirtieron en mis madrinas, ayudándome tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros de tesis. Cuantos cafés, películas, juegos de *básquet*, en fin ... cuanto tiempo juntos. Les agradezco todo el cariño que me han dado y les deseo la mejor de las suertes en sus vidas.

Agradezco enormemente a mis amigos, que son pocos, pero muy buenos. Hoy están dispersos por el mundo, pero pendientes del desarrollo de esta Tesis. En especial a mi amiga Beatriz Santos Carballal, quien me ha dado la mano para andar este camino conmigo. Nunca se cansa, nunca me deja sola. ¡Te quiero betuca!

Muchas gracias a mi familia, que es el motor que me mueve a superarme cada día para que siempre estén orgullosos de mí. A mis abuelos que siempre confiaron en que podría lograr lo que me propusiera. A mis padres que me han

educado en la perseverancia y a los que debo todo lo que tengo. A mis tíos y primas. A Sergio y a sus padres, que me han acogido en el seno de su familia.

Para terminar, más que agradecer quiero **dedicar esta Tesis** a quién me abrió los brazos y el corazón, quién fue tutora y amiga, y a quien siempre recordaré:  
*Gemma Cepriá Pamplona*

## Índice

### Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>I. NUEVOS PROCEDIMIENTOS ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PLATA IÓNICA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA</b> .....	<b>11</b>
1.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS. ....	11
1.2 INSTRUMENTACIÓN. ....	13
1.3 REACTIVOS Y DISOLUCIONES EMPLEADAS. ....	16
1.3.1 <i>Disoluciones y tampones</i> .....	17
1.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	24
1.4.1 <i>Detección de AgNPs en las muestras High Stability Biovedik<sup>TM</sup> y Wellness Colloidal Silver TM por EAM-UV.</i> .....	24
1.4.2 <i>Digestión de las muestras Biovedik<sup>TM</sup> y Wellness Colloidal Silver<sup>TM</sup></i> .....	25
1.4.3 <i>Ultrafiltración de las muestras Biovedik<sup>TM</sup> y Wellness Colloidal Silver TM.</i> .....	25
1.4.4 <i>Determinación de plata por AAS</i> .....	25
1.4.5 <i>Determinación de Ag(I) en presencia de AgNPs por SWASV</i> .....	25
1.4.6 <i>Determinación de Ag(I) por voltametría (directa) diferencial de pulsos con electrodo de platino.</i> .....	26
1.4.7 <i>Determinación de Ag(I) con método AGNES</i> .....	26
1.4.8 <i>Determinación de Ag(I) con el método “In Situ Prepared Indicator Electrode”.</i> .....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
1.5 DETERMINACIÓN DE PLATA IÓNICA EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EMPLEANDO VOLTAMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA. ....	28
1.5.1 <i>Validación del método SWASV para la determinación de Ag(I) en presencia de AgNPs.</i> .....	29
1.5.2 <i>Aplicación del procedimiento SWASV para la determinación de Ag(I) en presencia de Ag coloidal en muestras reales.</i> .....	34

## Índice

1.6	USO DE ELECTRODOS METÁLICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PLATA IÓNICA POR VOLTAMETRÍA (DIRECTA) DIFERENCIAL DE PULSOS. ....	39
1.6.1	<i>Determinación de Ag(I) por voltametría (directa) diferencial de pulsos sobre electrodo metálicos: comparación de electrodos. ....</i>	40
1.7	DETERMINACIÓN DIRECTA DE Ag(I) EN PRESENCIA DE AgNPs O ESPECIES COMPLEJADAS EMPLEANDO “ABSENCE OF GRADIENT NERNSTIAN EQUILIBRIUM STRIPPING” E “IN SITU PREPARED INDICATOR ELECTRODE”. ....	46
1.7.1	<i>Fundamentos básicos del método “Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping” (AGNES). ....</i>	49
1.7.2	<i>Aplicación del método AGNES para la determinación de Ag(I). Tipos de medida en la segunda etapa. ....</i>	52
1.8	FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCEDIMIENTO “IN SITU PREPARED INDICATOR ELECTRODE” .....	56
1.8.1	<i>Aplicación práctica del método “in situ prepared indicator electrode” (ISPIE) a la determinación de Ag(I). ....</i>	59
	CONCLUSIONES .....	63
<b>II.</b>	<b>NUEVOS PROCEDIMIENTOS VOLTAMÉTRICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PRESENCIA DE PLATA IÓNICA. COMPARACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES. ....</b>	<b>65</b>
2.1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	65
2.2	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....	68
2.2.1	<i>Caracterización y determinación de tamaño de nanopartículas de plata por voltametría de partículas inmovilizadas. ....</i>	68
2.2.2	<i>Determinación y caracterización de tamaño de nanopartículas de plata por cronoculombimetría de colisión de partículas. ....</i>	69
2.2.3	<i>Caracterización del tamaño de nanopartículas de plata con SP-ICP-MS .....</i>	70
2.2.4	<i>Caracterización del tamaño de nanopartículas de plata con microscopía electrónica. ....</i>	71
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	72

## Índice

2.3	VOLTAMETRÍA DE PARTÍCULAS INMOVILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	72
2.3.1	<i>Determinación de tamaño medio de nanopartículas de plata por voltametría de partículas inmovilizadas. Ventajas y limitaciones.</i>	73
2.3.2	<i>Aplicación del método VIP-Nafion<sup>TM</sup> en la determinación del tamaño medio de nanopartículas de plata en muestras reales.</i>	81
2.4	CRONOCULOMBIMETRÍA DE IMPACTO DE PARTÍCULAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	83
2.4.1	<i>Optimización de la cronoculombimetría de impacto de partículas para la caracterización de tamaños y cuantificación de nanopartículas de plata.</i>	84
2.4.2	<i>Cuantificación de AgNPs en productos de consumo. Comparación de métodos...</i>	100
	CONCLUSIONES	105
<b>III. CARACTERIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y PLATA IÓNICA CON LIGANDOS ANTIBIÓTICOS.</b>		<b>109</b>
3.1	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.	109
3.2	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.	112
3.2.1	<i>Medidas de la absorbancia las disoluciones mezclas AMX-Ag(I) por EAM-UV-V...</i>	112
3.2.2	<i>Análisis de disoluciones de reacción por métodos electroquímicos.</i>	112
3.2.3	<i>Medidas de las disoluciones de antibióticos con AgNPs por DLS.</i>	113
3.2.4	<i>Análisis de las disoluciones de antibióticos con AgNPs con HDC.</i>	113
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
	<b>AMOXICILINA</b>	114
3.3	CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE AMOXICILINA CON PLATA IÓNICA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	114
3.3.1	<i>EAM UV-Vis en la caracterización de complejos de amoxicilina con plata iónica y nanopartículas de plata.</i>	115
3.3.2	<i>Estudio del complejo AMX-Ag(I) por EAM UV-Vis.</i>	117
3.3.3	<i>Estudio del complejo AMX-AgNPs por EAM UV-Vis</i>	118
3.4	TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE AMOXICILINA CON PLATA IÓNICA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA.	131

## Índice

3.4.1	<i>Caracterización de complejos de AMX-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos).</i> .....	132
3.4.2	<i>Cálculo de la contante de formación de los complejos Ag(I) [AMX]<sub>n</sub> por el desplazamiento del potencial de pico (ec. Nernst).</i> .....	134
3.4.3	<i>Caracterización de complejos de Ag(I) [AMX]<sub>n</sub> por ASV.</i> .....	136
3.4.4	<i>Cálculo de la contante de formación de los complejos Ag(I) [AMX]<sub>n</sub> por el método Deford-Hume.</i> .....	138
3.4.5	<i>Caracterización de complejos de [AMX]<sub>n</sub>-AgNPs por VIP.</i> .....	142
3.4.6	<i>Cálculo electroquímico de las contantes de formación de los complejos AMX-AgNP y AMX-AgNP por el método Deford-Hume.</i> .....	145
3.5	<b>OTRAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE AMOXICILINA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA.</b> .....	148
3.5.1	<i>Caracterización de complejos de AMX con AgNPs con DLS.</i> .....	150
3.5.2	<i>Caracterización de complejos de AMX con AgNPs con HDC.</i> .....	155
	<b>ENROFLOXACINA</b> .....	158
3.6	<b>CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE ENROFLOXACINA CON PLATA IÓNICA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA.</b>	158
3.6.1	<i>EAM UV-Vis en la caracterización de complejos de enrofloxacin con plata iónica y nanopartículas de plata.</i> .....	159
3.6.2	<i>Estudio del complejo ENRO-Ag(I) por EAM UV-Vis.</i> .....	160
3.6.3	<i>Estudio del complejo ENRO-AgNPs por EAM UV-Vis.</i> .....	161
3.6.4	<i>Técnicas electroquímicas en la caracterización de complejos de enrofloxacin con plata iónica y nanopartículas de plata.</i> .....	169
3.6.5	<i>Caracterización de complejos de ENRO-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos).</i> .....	170
3.6.6	<i>Cálculo de las constantes de formación de los complejos Ag(I) [ENRO]<sub>n</sub> por el desplazamiento de los potenciales de pico (ec. Nernst).</i> .....	173
3.6.7	<i>Caracterización de complejos de Ag(I) [ENRO]<sub>n</sub> por ASV.</i> .....	174
3.6.8	<i>Cálculo de la contante de formación de los complejos Ag(I) [ENRO]<sub>n</sub> por el método Deford-Hume.</i> .....	176
3.6.9	<i>Caracterización de complejos de ENRO-AgNPs por VIP.</i> .....	177

## Índice

3.6.10 Cálculo electroquímico de la contante de formación de los complejos ENRO-AgNP por el método Deford-Hume. ....	180
3.7 OTRAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE ENROFLOXACINA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ....	182
3.7.1 Caracterización de complejos de ENRO con AgNPs con HDC. ....	183
<b>AZITROMICINA</b> .....	<b>185</b>
3.8 CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJAMIENTO DE AZITROMICINA CON PLATA IÓNICA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ....	185
3.8.1 EAM UV-Vis en la caracterización de complejos de azitromicina con plata iónica y nanopartículas de plata. ....	187
3.8.2 Estudio del complejo AZT-Ag(I) por EAM UV-Vis. ....	189
3.8.3 Estudio del complejo AZT-AgNPs por EAM UV-Vis. ....	189
3.9 TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE AZITROMICINA CON PLATA IÓNICA Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ....	196
3.9.1 Caracterización de complejos de AZT-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos). ....	198
3.9.2 Cálculo de la constante de formación de los complejos Ag(I) [AZT] <sub>n</sub> por el desplazamiento de los potenciales de pico (ec.Nernt).....	201
3.9.3 Caracterización de los complejos de Ag(I) [AZT] <sub>n</sub> por ASV. ....	201
3.9.4 Cálculo de las contantes de formación de los complejos Ag(I) [AZT] por el método Deford-Hume. ....	202
3.9.5 Caracterización de complejos de AZT-AgNPs por VIP. ....	203
3.9.6 Cálculo electroquímico de la contante de formación de los complejos AZT-AgNP por el método Deford-Hume. ....	206
3.10 OTRAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE AZITROMICINA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA. ....	208
3.10.1 Caracterización por HDC de complejos de AZT con AgNPs. ....	208
CONCLUSIONES .....	211
<b>IV. CONCLUSIONES FINALES</b> .....	<b>217</b>

## *Índice*

V. BIBLIOGRAFÍA.....	221
VI. LISTADO DE FIGURAS.....	244
VII. LISTADO DE TABLAS.....	253
VIII. ABREVIATURAS EMPLEADAS .....	255

## Resumen

La presente memoria de **Tesis Doctoral** es fruto de 3 años de trabajo experimental de laboratorio. En este trabajo hemos abordado una problemática de gran actualidad. Debido a las propiedades antibacterianas y de otro tipo que tienen los **nanomateriales de base plata**, sus aplicaciones y su uso han crecido enormemente en los últimos años. Lo que ha supuesto un mayor riesgo de contaminación del medio ambiente y potenciales riesgos en cuanto a su toxicidad. Sin embargo, estos riesgos vienen muy influenciados por las propiedades físico-químicas de los nanomateriales de plata, por lo que es necesaria su caracterización, además de su cuantificación.

En general, tanto los nanomateriales como los **antibióticos**, que también se abordan en este trabajo, son considerados desde hace pocos años como contaminantes emergentes. Y cada vez se demanda más metodología analítica para su estudio y control, teniendo en cuenta los riesgos de Salud Pública que comportan.

En este trabajo de Tesis se han abordado nuevos **métodos electroanalíticos** para la detección, caracterización y cuantificación de nanopartículas de plata, especialmente (y por las dificultades que conlleva) en presencia de iones plata  $Ag(I)$  en las mismas disoluciones. En lo posible, sin necesidad de separaciones previas. Situación que es frecuente en muestras reales de plata coloidal, la coexistencia de nanopartículas de plata con iones  $Ag(I)$ . Si bien esto supone un problema importante en algunas técnicas instrumentales, hemos tratado de darle respuesta con una amplia variedad de técnicas de electroanálisis. En procedimientos que posteriormente hemos comparado y validado con **otras técnicas instrumentales** muy dedicadas al estudio de nanomateriales y nanopartículas: espectroscopía de plasma de acoplamiento inductivo de partícula única - espectrometría de masas, microscopía electrónica de barrido y de transmisión, dispersión dinámica de luz, espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible, espectrometría de absorción atómica y cromatografía hidrodinámica.

## Abstract

El trabajo que se presenta en esta memoria se encuentra dividido en **tres partes** diferenciadas.

En la **primera parte**, se describen nuevos métodos electroanalíticos para la detección y especiación de iones Ag(I) que puedan estar coexistiendo en la misma disolución con nanopartículas de plata (AgNPs). Con el objetivo de mejorar la sensibilidad y la selectividad, se han optimizado procedimientos de voltametría de redisolución sobre distintos materiales de electrodos de trabajo, normalmente con barridos de potencial impulsionales para discriminar las corrientes capacitativas y mejorar los límites de detección.

Fruto de una estancia corta de investigación en la **Universidad de Lérida**, y en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Josep Galcerán, pionero y referente mundial en la técnica *AGNES (Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping)*, hemos abordado el reto de utilizar esta novedosa técnica por primera vez para la determinación selectiva de iones Ag(I) empleando electrodos de mercurio. Dificultad importante, dado que los potenciales de oxidación del Hg y de la plata difieren en muy pocos milivoltios. Y para lo que hemos propuesto una nueva variante que hemos llamado AGNES-Diferencial. En ella asumimos que en la determinación de Ag(I) se produce inevitablemente una componente de señal debida al Hg. Y también hemos abordado el mismo problema con una perspectiva distinta, en otra aproximación que hemos denominado método *ISPIE (In Situ Prepared Indicator Electrode)*. Ambas aproximaciones *AGNES-D* e *ISPIE* empleadas para la determinación de Ag(I) libre no complejada en medios con ligandos u otras especies de plata (como AgNPs), tienen su base teórica en un comportamiento nernstiano, que se explica en el capítulo correspondiente a esta parte.

En la **parte segunda** de esta memoria de Tesis Doctoral, se describen nuevos procedimientos voltamétricos cuyo objetivo es la detección, caracterización de tamaño y cuantificación de nanopartículas de plata, cuando en la disolución tenemos también iones Ag(I). Con una finalidad analítica y de aplicación posterior en muestras reales o comerciales de disoluciones de plata coloidal. Los resultados de estos procedimientos, al igual que en la parte anterior, se compararon y validaron con los obtenidos con otras técnicas instrumentales dedicadas que he mencionado antes.

## *Abstract*

Se han empleado dos aproximaciones distintas. En la primera se han optimizado variantes convencionales de la voltametría de (nano)partículas inmovilizadas sobre electrodos de carbón vítreo o metálicos. Una mejora importante se obtuvo empleando películas del polímero Nafion™ para una mejor retención de las nanopartículas de plata sobre el electrodo.

En la segunda, se ha optimizado un procedimiento de cronoculombimetría de colisión de nanopartículas para su aplicación posterior a la detección, caracterización de tamaño y determinación del número de concentración de AgNPs L<sup>-1</sup> en muestras comerciales de plata coloidal (suspensiones de AgNPs y Ag(I)). Si bien las técnicas de impacto electroquímico tienen un soporte teórico enorme, sus aplicaciones analíticas son muy escasas y casi inexistentes. Y nuestro trabajo pretende aportar aplicabilidad analítica. También hemos estudiado aquellos aspectos teóricos y matemáticos que repercuten en sus propiedades analíticas.

La **tercera parte** de esta Tesis Doctoral utiliza las herramientas desarrolladas en las dos partes anteriores para una aplicación concreta, como es el estudio de las interacciones que se producen entre tres antibióticos muy empleados (amoxicilina, enrofloxacina, azitromicina) con nanopartículas de plata y con plata iónica. Es conocida la capacidad complejante que tienen los antibióticos con metales, interacciones que han sido muy estudiadas, particularmente con uniones con Ag(I) que producen un efecto sinérgico en su actividad antibactericida. Sin embargo, las interacciones o complejos de nanomateriales (como las AgNPs) con antibióticos ha sido mucho menos estudiada. Y esta es una de las aportaciones de este apartado, empleando procedimientos electroanalíticos que han sido complementados, comparados y/o validados con otros procedimientos que emplean técnicas instrumentales diversas y que he citado anteriormente.

La elección de los tres antibióticos para este trabajo de Tesis Doctoral, es debida a su presencia generalizada (en algunos casos con relativamente elevadas concentraciones, como la enrofloxacina) en aguas naturales de cuencas fluviales de España (Navarra, Aragón, Cataluña) y Francia (Pirineos Atlánticos y Altos Pirineos). En relación al **Proyecto OUTBIOTICS (EFA-183-16)** del Programa Europeo de cooperación territorial transfronteriza

## *Abstract*

que coordinamos y en el que participamos, y cuya temática es el desarrollo de nuevas tecnologías para el diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA. Nuestro trabajo contribuye a conocer mejor las interacciones de antibióticos con nanomateriales de base plata. Este tipo de nanomateriales produce un efecto sinérgico en el efecto antibactericida de los antibióticos, que ayuda a reducir su consumo en las explotaciones ganaderas del entorno y, por lo tanto, su posterior efecto contaminante en el medio ambiente. En uno de los objetivos principales del proyecto OUTBIOTICS.

Se han empleado procedimientos (como el método *Deford-Hume*) para el cálculo electroquímico de constantes de complejamiento entre estos 3 antibióticos y  $\text{Ag}^+$  ó AgNPs. Y estos mismos complejos se han caracterizado midiendo otras propiedades físico-químicas, para contrastar y complementar información analítica sobre la naturaleza de estas interacciones.

A lo largo de las distintas partes de esta memoria de Tesis Doctoral se describen las **herramientas empleadas** (instrumentación, disoluciones y reactivos, procedimientos experimentales), y se comparan y discuten los resultados obtenidos. Las **conclusiones** particulares de cada una de las tres partes y un listado final resumen las conclusiones más importantes. Los **antecedentes bibliográficos** se han distribuido también, por su distinta temática, en las tres partes en las que he dividido el trabajo experimental que he realizado a lo largo de mis estudios de doctorado.

## Abstract

This **doctoral thesis report** is the result of 3 years of experimental laboratory work. In this work we have addressed a highly topical problem. Due to the antibacterial and other properties of **silver-based nanomaterials**, their applications and use have grown tremendously in recent years. This has led to an increased risk of environmental contamination and potential risks in terms of toxicity. However, these risks are highly influenced by the physico-chemical properties of silver nanomaterials, which is why their characterization is necessary, in addition to their quantification.

In general, both nanomaterials and **antibiotics**, which are also addressed in this work, have been considered for a few years as emerging contaminants. And every time more analytical methodology is demanded for its study and control, taking into account the Public Health risks that they entail.

In this thesis work, new **electroanalytical methods** for the detection, characterization and quantification of silver nanoparticles have been addressed, especially (and due to the complexity that it entails) in the presence of Ag(I) silver ions in the same solutions. As far as possible, without the need for prior separations. A situation that is frequent in real samples of colloidal silver, the coexistence of silver nanoparticles with Ag(I) ions. Although this is a major problem in some instrumental techniques, we have tried to respond to it with a wide variety of electroanalysis techniques. In procedures that we have subsequently compared and validated with **other instrumental techniques** very dedicated to the study of nanomaterials and nanoparticles: inductively coupled single-particle plasma spectroscopy - mass spectrometry, scanning electron microscopy and transmission, dynamic light scattering, spectrophotometry of UV-Visible molecular absorption, atomic absorption spectrometry and hydrodynamic chromatography.

The work presented in this report is divided into **three different parts**.

In the **first part**, new electro-analytical methods are described for the detection and speciation of Ag(I) ions that may be coexisting in the same solution with silver nanoparticles (AgNPs). In order to improve sensitivity and selectivity, redissolution voltammetry

## Abstract

procedures have been optimized on different working electrode materials, usually with impulse potential scans to discriminate capacitive currents and improve detection limits.

As a result of a short research stay at the **University of Lleida**, and in collaboration with the research group of Professor Josep Galcerán, pioneer and world leader in the AGNES technique (*Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping*), we have addressed the challenge of using this First novel technique for the selective determination of Ag(I) ions using mercury electrodes. Significant difficulty, since the oxidation potentials of Hg and silver differ by very few millivolts. And for what we have proposed a new variant that we have called AGNES-Differential. In it we assume that in determining Ag<sup>+</sup> inevitably a signal component due to Hg is measured. And we have also approached the same problem with a different perspective, in another approach that we have called ISPIE (*In Situ Prepared Indicator Electrode*) method. Both AGNES-D and ISPIE approaches used to determine free Ag(I) not complexed in media with ligands or other silver species (such as AgNPs) have their theoretical basis in a Nernstian behavior, which is explained in the chapter corresponding to this part.

In the **second part** of this Doctoral Thesis report, new voltammetric procedures are described whose objective is the detection, characterization of size and quantification of silver nanoparticles, when in the solution we also have Ag(I) ions. For analytical purposes and subsequent application in real or commercial samples of colloidal silver solutions. The results of these procedures, as in the previous part, were compared and validated with those obtained with other dedicated instrumental techniques that I mentioned before.

Two different approaches have been used. In the first, conventional variants of the voltammetry of immobilized (nano)particles on glassy carbon or metallic electrodes have been optimized. A significant improvement was obtained using films of the nafion polymer for a better retention of the silver nanoparticles on the electrode.

In the second, a nanoparticle collision chronocoulometry procedure has been optimized for detection, size characterization and concentration number determination of AgNPs L<sup>-1</sup> in commercial colloidal silver samples (suspensions of AgNPs and Ag(I) ions). Although electrochemical impact techniques have enormous theoretical support, their

## Abstract

analytical applications are very few and almost non-existent. Our work aims to provide analytical applicability. We have also studied those theoretical and mathematical aspects that affect its analytical properties.

The **third part** of this Doctoral Thesis uses the tools developed in the two previous parts for a specific application, such as the study of the interactions that occur between three widely used antibiotics (amoxicillin, enrofloxacin, azithromycin) with ionic silver and silver nanoparticles. The complexing capacity of antibiotics with metals is well known, interactions that have been very studied, particularly with Ag(I) ions that produce a synergistic effect on their antibacterial activity. However, interactions or complexes of nanomaterials (such as AgNPs) with antibiotics have been much less studied. And this is the one of the main objectives of this part, using electroanalytical procedures that have been complemented, compared and / or validated with other procedures that use different instrumental techniques and that I have previously mentioned.

The choice of the three antibiotics for this Doctoral Thesis work is due to their widespread occurrence (in some cases with relatively high concentrations, such as enrofloxacin) in natural waters of river basins in Spain (Navarra, Aragon, Catalonia) and France (Atlantic Pyrenees and Upper Pyrenees). In relation to the **OUTBIOTICS Project (EFA-183-16)** of the European Program of cross-border territorial cooperation that we coordinate and in which we participate, and whose theme is the development of new technologies for the diagnosis, prevention and elimination of emerging contaminants (antibiotics) of the waters of the POCTEFA territory. Our work contributes to a better understanding of the interactions of antibiotics with silver-based nanomaterials. This type of nanomaterials produces a synergistic effect on the antibacterial effect of antibiotics, which helps to reduce their consumption in the surrounding livestock farms and, therefore, their subsequent polluting effect on the environment. In one of the main objectives of the OUTBIOTICS Project.

Procedures (such as the *Deford-Hume* method) have been used for the electrochemical calculation of complexation constants between these 3 antibiotics and Ag(I) or AgNPs. And these same complexes have been characterized by measuring other physical-chemical

## *Abstract*

properties, to contrast and complement analytical information about the nature of these interactions.

Throughout the different parts of this Doctoral Thesis report, the **tools** used are described (instrumentation, solutions and reagents, experimental procedures), and the results obtained are compared and discussed. The particular **conclusions** of each of the three parts and a final list summarize the most important conclusions. The **bibliographic** background has also been distributed, due to its different subject matter, in the three parts into which I have divided the experimental work that I have carried out throughout my doctoral studies.

# Parte. I

---



## I. Nuevos procedimientos electroquímicos para la detección y cuantificación de plata iónica en presencia de nanopartículas de plata.

### 1.1 Introducción y objetivos.

Las nanopartículas metálicas de plata (AgNPs), que forman parte de productos de uso diario (detergentes, envases de alimentos y textiles) o con aplicaciones biomédicas, pueden evolucionar con su uso a lo largo del tiempo, cambiando su superficie y liberando iones

Los iones metálicos de plata tienen un fuerte efecto antibactericida frente a una gran variedad de bacterias *Gram-negativas* y *Gram-positivas*, y provocan la disminución de sus poblaciones en matrices como el agua y fluidos biológicos[1]. Es muy importante conocer y diferenciar entre las distintas especies de plata en estos medios, por lo que debemos desarrollar estrategias analíticas que nos permitan su detección y su caracterización. Uno de los objetivos principales de este trabajo de Tesis Doctoral es la propuesta de nuevos procedimientos de especiación de especies iónicas y nanoparticuladas de plata mediante la información analítica que nos dan las técnicas voltamétricas y electroquímicas en general.

En general, la detección de iones en presencia de las nanopartículas que los generan es relativamente complicada y generalmente presenta problemas de interferencias, por lo que frecuentemente se necesitan de procedimientos de separación previa [. La espectroscopía de absorción atómica (AA)[2], el análisis de activación de neutrones(NAA)[3] y la espectroscopía de plasma-masas acoplada inductivamente (ICP-MS) [6], han sido de los más utilizados para la determinación de plata en muestras ambientales, dada su sensibilidad. Sin embargo, con estas técnicas instrumentales sólo puede medirse la cantidad total de plata, independientemente de las distintas especies de plata que puedan estar presentes en la muestra. En muchos casos, son necesarios procedimientos de separación previos, que en ocasiones son sencillos, como la ultrafiltración [7], pero en otros casos pueden ser largos y complicados como la extracción en punto de nube [8]; [9].

Las técnicas electroanalíticas, muy especialmente la voltametría por su alta sensibilidad, permiten la detección selectiva de los iones plata (Ag(I)) en presencia de especies relacionadas como las AgNPs, incluso cuando ambos están juntos en la misma disolución [10], y en muchos casos sin la necesidad de procedimientos previos de separación [11].

En principio, la simple reacción electroquímica catódica de reducción de la Ag(I) sobre el electrodo de trabajo es suficiente para diferenciarla de otras especies presentes en el medio, o de otras nanopartículas que requieren un potencial anódico o de oxidación para su detección o determinación voltamétrica. Por lo tanto, un barrido de potenciales anódico o catódico deberían de, en principio, diferenciar entre Ag (I) iónica y AgNPs, tanto en forma libre como complejada (voltametría directa) [12].

No obstante, y dado que las concentraciones a medir van a ser muy pequeñas, en muchos casos va a ser necesario un proceso previo de preconcentración (normalmente electroquímica) sobre el electrodo de trabajo, para medir posteriormente en el proceso de redisolución [12]. La voltametría de redisolución (SV) puede llegar a límites de detección del orden de partes por billón [13]. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado con diversas finalidades, incluso hemos optimizado procedimientos de SV para diferenciar entre especies de plata libres y complejadas con un ligando, discriminando mediante la aplicación precisa del potencial de electrolisis en la etapa de preconcentración [10].

Se describe también en esta memoria el desarrollo de un nuevo método denominado *Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES)* para la determinación de Ag(I) libre en presencia de otras especies complejadas de plata iónica [14]. El método *AGNES*, se basa en un método de redisolución anódica en ausencia de gradientes de concentración [15]. El método *AGNES* se ha empleado con éxito en la determinación de trazas de otros metales y nanopartículas metálicas en presencia de ligandos complejantes [16]. La técnica se aplica en metales que se puedan amalgamar en electrodo de mercurio, y presentan gran solubilidad en este metal. No hay referencias bibliográficas previas del estudio de plata por esta técnica. Si bien la plata es bastante soluble en mercurio, tenemos la dificultad de que los potenciales de oxidación de la plata metálica y del mercurio metal

se encuentran muy próximos, lo que impide en condiciones normales llevar a cabo ambas oxidaciones de forma individual.

Para solventar esta dificultad, hemos desarrollado, en colaboración con el grupo de investigación “*Lleida Electrochemical Group*” de la Universidad de Lérida, pioneros a nivel mundial en esta técnica, un nuevo procedimiento *AGNES* que solventa estas dificultades. Como se describe posteriormente en esta memoria de Tesis Doctoral.

En este apartado se describe la validación de dos métodos voltamperométricos (*DV* y *ASV*) para la determinación de  $\text{Ag(I)}$ . Además, por primera vez se van a evaluar las potencialidades del método *AGNES* en la determinación directa de  $\text{Ag(I)}$ , en presencia de otras especies de plata complejadas.

Se han planteado los siguientes objetivos:

- Implementar y validar un método de determinación de  $\text{Ag(I)}$  por *DV*.
- Implementar y validar un método de determinación de  $\text{Ag(I)}$  por *ASV*.
- Nuevo método *AGNES* para la determinación de  $\text{Ag(I)}$ .

## 1.2 Instrumentación.

- Potenciostato Autolab tipo III (Metrohm-Autolab BV, Utrecht, the Netherlands). Resolución de potencial  $\pm 3\mu\text{V}$ , precisión de la corriente  $\pm 0,2\%$ , resolución medida de la corriente  $0,0003\%$ . Impedancia de entrada  $>100\text{ GOhm}$ . Corriente mínima de medida  $0,3\text{fA}$ .
- Potenciostato Eco Chemie Autolab PGSTAT10 (Metrohm Autolab) (Metrohm Autolab BV, Utrecht) provisto de un módulo ECD de baja corriente. tensión de salida máxima:  $\pm 12\text{V}$ ; corriente de salida máximas:  $\pm 80\text{mA}$ ; resolución de corriente mínima de  $0,3\text{ fA}$  y está equipado con un filtro Sallen-Key. Corriente mínima de medida  $0,3\text{fA}$  (cada  $2,5\text{ ms}$ ).

## Parte II

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, AAnalysts 200 (Massachusetts, USA) equipado con una lámpara de cátodo de plata (2mA, longitud de onda de 328,1nm).
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis de doble haz Jasco V-730 (Jasco, Oklahoma, USA). Ancho de banda espectral de 1nm.
- Espectrómetro de masas Perkin-Elmer NexION 2000B ICP (Toronto, Canadá) con nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de pulverización ciclónica desconcertada.
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Modelo 2000 FXII, JEOL, Tokio, Japón), equipado para medidas de dispersión de energía (EDS) por espectrometría de rayos X, y difracción de electrones a 200kV.
- Microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FESEM). Las medidas EDS se realizaron con un FESEM Merlin™ equipado con una columna Gemini (ambas de Carl Zeiss Nano Technology Systems, Jena, Alemania, [www.imaging-git.com](http://www.imaging-git.com)), y se combinaron con un Microanalizador de rayos X X-Max (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido, [www.oxinst.com](http://www.oxinst.com)). Las imágenes FESEM se midieron trabajando a 5kV con el detector de electrones secundario en la lente, y para mejorar la resolución, EDS se midió a 10kV.
- Cromatógrafo Waters 2796 Bioseparations Module (Waters Corporation, Milford, USA). Con columna PL-PSDA tipo 1 (Agilent Technologies, Germany) de longitud 80cm y diámetro interno de 7,5mm con un rango nominal de separación de 5 -300nm. El detector utilizado fue UV-Vis (Waters 996 Photodiode Array detector).
- Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) de Malvern® (Worcestershire, United Kingdom), para el cálculo de potenciales Z.
- Ultracentrífuga con rotor de Angulo fijo para tubos eppendorf (Thermo Heraeus Multifuge X1R, Walthman, USA).

## Parte I

- Balanza analítica GH-200 con precisión de  $\pm 0,1$ mg, hasta un máximo de 1100g (A&D Phoenix).
- Agitador orbital analógico Reax 2 (Heidolph), con control analógico desde 1 a 16rpm (Heidolph, Schwabatch, Alemania).
- pH-metro BasiC 20 Crison (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Resolución:  $\pm 0,01$  pH,  $\pm 1$ mV,  $\pm 0,1$ °C. Error en las medidas ( $\pm 1$  dígito):  $\leq 0,01$  pH  $\leq 1$ mV,  $\leq 0,2$ °C.
- Baño de ultrasonidos Ultrasons-P (J.P. Selecta, Cugat del Vallés, Barcelona, España). Frecuencia 40 KHz.
- Electrodo de hilo de platino, diámetro 0,5mm, BASi (BioAnalytical systems, [www.basinc.com](http://www.basinc.com)).
- Electrodo de referencia Ag/AgCl, 3M., con vidrio vycor como interface BASi (BioAnalytical systems, [www.basinc.com](http://www.basinc.com)).
- Microelectrodo de carbono vítreo BASi ( $11 \pm 2$   $\mu$ m)
- Electrodo de carbono vítreo, 3mm de diámetro, BASi (BioAnalytical systems, [www.basinc.com](http://www.basinc.com), West Lafayette, USA).
- Celdas electroquímicas de vidrio de 10 y 50mL (BASi, West Lafayette, USA).
- Ultrafiltros con membranas de corte de 3kDa (Nanosep Pall, MERC)
- Cubetas de cuarzo de 3mL. Paso óptico de 10mm (Navarra, España).
- Pipetas Pasteur desechables 3mL (Vilassar de Dalt, Barcelona).
- Celdas electroquímicas de vidrio de 50mL (BASi, West Lafayette, USA).
- Viales ámbar de vidrio de 1,5mL (Thermo Scientific™, Madrid, España).
- Cubetas de poliestireno de 10 x 10 x 45mm modelo DTS0012, (Sarstedt®) Malvern Panalytical (Worcestershire, United Kingdom)
- Tubos Falcon de 50mL (Sarstedt Ag & Co, Nümbrecht, Alemania).
- Vasos de precipitado de 10mL, 50mL, 100mL y 500mL (Merck, Darmstadt, Germany).

- Tubos eppendorf de 3mL.
- Micropipetas 5-50 $\mu$ L, 50-200 $\mu$ L y 200-1000 $\mu$ L (Crison, Barcelona, España).

### 1.3 Reactivos y disoluciones empleadas.

- Nanopartículas de plata (AgNPs) esféricas de diámetro nominal 10,5 $\pm$ 0,4; 20,0 $\pm$ 1,2; 40,1 $\pm$ 2,1; 58,9 $\pm$ 6,1, and 100,1 $\pm$ 10,2nm recubiertas de citrato de 0,02mg mL<sup>-1</sup> (San Diego, CA, USA, nanocomposix.com).
- AgNPs esféricas de diámetro nominal 75nm (74,6 $\pm$ 3,8nm) recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP) de 0,02mg mL<sup>-1</sup> de NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, Material de referencia 8017)
- Nanopartículas de plata esféricas de 50nm recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP) de 5mg mL<sup>-1</sup> (San Diego, CA, USA, nanocomposix.com).
- Estándar plata Ag(I) de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> 5% (Sigma Millipore, Madrid, España)
- Amoxicilina, (AMX) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)
- Enrofloxacin, (ENRO) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)
- Azitromicina, (AZT) (Merck, KGaA, Darmstadt, Germany)
- Productos de consumo antibactericidas: *High Stability*<sup>™</sup>, *Biovedik*<sup>™</sup> y *Wellness colloidal silver*<sup>™</sup> (www.amazon.com).
- Nafion<sup>™</sup> 5% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 69% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Alumina de tamaño de partícula 11 $\mu$ m (BASi, West Lafayette, USA).
- Dispersión de diamante de 1 y 3 $\mu$ m (BASi, West Lafayette, USA).
- Perclorato de sodio (NaClO<sub>4</sub>) 98% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Nitrógeno gas (N<sub>2</sub>) 78% (Zaragoza, España)

## Parte I

- Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) 99% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 97% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ) 37%, (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 69%, (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 98% (Merck, Madrid, España)
- Ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 100% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85% (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 99% (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) 99,5% (Sigma Millipore, Madrid, España)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 99,8% (Fisher Chemical, Madrid, España)
- Agua Milli-Q 18,2M $\Omega$  cm a 298K (MilliQ Advance, Molsheim, Francia)

### 1.3.1 Disoluciones y tampones

- Disoluciones de Ag(I)): El patrón de Ag(I) de 1000mg L<sup>-1</sup> fue diluido 1 /100 (v/v) en agua MQ para obtener una concentración de 10mg L<sup>-1</sup>. A partir de la disolución de Ag<sup>+</sup> de 10mg L<sup>-1</sup> se prepararon disoluciones entre 0,5mg L<sup>-1</sup> y 4mg L<sup>-1</sup>. Las disoluciones entre 2,5 $\mu\text{g}$  L<sup>-1</sup> y 20 $\mu\text{g}$  L<sup>-1</sup> fueron preparadas de la misma forma, pero en NaClO<sub>4</sub> 0,1M. Todas las disoluciones de plata se protegieron de la luz y se almacenaron en tubos Falcon a temperatura ambiente.
- Dispersiones de AgNPs de 10; 20; 40; 60; 75 y 100nm: Los estándares de AgNPs se sometieron a ultrasonidos durante 120s, se tomaron las alícuotas necesarias y se diluyeron apropiadamente con NaClO<sub>4</sub> o en H<sub>2</sub>O hasta la concentración deseada. Las dispersiones de AgNPs se conservaron en nevera a 4°C y se sometieron a ultrasonidos durante 120s antes de su uso. La estabilidad de las suspensiones se controló mediante espectroscopía UV-Visible a través del pico de absorbancia del plasmón superficial.

## Parte II

- Nafion™ 0,25%; 1,6% y 1,25% (v/v): Las disoluciones de Nafion se prepararon diluyendo la cantidad de reactivo Nafion™ al 5% en la cantidad necesario de metanol. El reactivo tras su uso se conservó herméticamente cerrado a 4°C en nevera y resguardado de la luz para evitar su polimerización.
- Productos de consumo de plata coloidal *High Stability™*, *Biovedik™* y *Wellness colloidal silver™*: Los productos comerciales se sometieron a ultrasonidos durante 120s antes de tomar las alícuotas. Las alícuotas se diluyeron apropiadamente con NaClO<sub>4</sub> o en H<sub>2</sub>O según la forma de medida. Estas muestras se almacenaron a temperatura ambiente resguardadas de la luz.
- Disolución NaClO<sub>4</sub> 0,1M y 0,02M pH 5,25: 14,05g de NaClO<sub>4</sub> se disolvió en agua y se llevó a un volumen de 1L en matraz aforado. Las disoluciones se almacenaron en botellas de teflón a temperatura ambiente hasta un máximo de 30 días desde su preparación.
- Disolución amortiguadora Britton – Robinson pH 7, fuerza iónica 0,1 M: Se disolvió 2,754g de NaOH, 1,575 de CH<sub>3</sub>COOH, 2,570g de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,622g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y 1,804g de KCl en un vaso de precipitados con agua MQ y se llevó a un volumen de 1L en matraz aforado. El pH fue ajustado con disoluciones de HCl o NaOH 0,1M, según cada caso. Esta disolución se almacenó en recipiente de teflón hasta un máximo de 30 días desde su preparación.
- Disolución patrón de amoxicilina (AMX) 0,1M: Se disolvieron aproximadamente 91,35mg del patrón primario en 10mL de agua MQ a la que se le había añadido 300μL de NaOH 0,1M. Las disoluciones de AMX se prepararon diariamente.
- Disolución concentrada de enrofloxacin (ENRO) 28mM: Se preparó disolviendo 250mg de patrón en 25mL de agua MQ, a la que se le añadió 66,5μL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 98%. Las disoluciones de ENRO se prepararon diariamente.
- Disolución estándar de azitromicina (AZT) 13mM: Se preparó su disolución estándar 13mM, disolviendo 100mg de AZT en 10mL de CH<sub>3</sub>OH. Estas disoluciones de AZT se prepararon diariamente.

Parte I

- Mezclas numeradas m-0 a m-7 de AMX con Ag(I): Las disoluciones mezcla del antibiótico AMX con Ag(I) se han numerado m-0 a m-7. Se prepararon mezclando una concentración de AMX 0,15mM con concentraciones variables de Ag(I), para las relaciones molares resumidas en la Tabla 1. Resumen de las concentraciones y relaciones molares AMX / Ag(I) en las disoluciones numeradas como m-0 a m-7. en un volumen final 25mL de tampon Britton- Robinson pH=7. Las mezclas se prepararon en tubos tipo Falcon (50mL) con agitación orbital durante 2h (40 rev min<sup>-1</sup>).

Tabla 1. Resumen de las concentraciones y relaciones molares AMX / Ag(I) en las disoluciones numeradas como m-0 a m-7.

Disoluciones	Concentraciones (mM)		Relación molar
	AMX	Ag(I)	
m-0	0,15	--	0
m-1		1,5	1:10
m-2		3,0	1:20
m-3		6,0	1:40
m-4		9,0	1:60
m-5		12,0	1:80
m-6		15,0	1:100
m-7		30,0	1:200

- Disoluciones numeradas E-0 a E-4 de enrofloxacin con Ag(I): Las disoluciones numeradas E-0 a E-4 se prepararon mezclando un volumen dado de ENRO 28mM con distintas concentraciones de Ag(I) a partir del estándar 93mM, para obtener las concentraciones resumidas en la Tabla 2 en un volumen final de 25mL en un medio

tampón Britton- Robinson pH=7. Para preparar estas disoluciones se agitaron orbitalmente en tubos tipo Falcon de 50mL a 40rev min<sup>-1</sup> durante 2h.

Tabla 2. Resumen de las concentraciones de ENRO y Ag(I) y relaciones molares en las disoluciones que se han numerado E-0 a E-4.

Disoluciones	Concentraciones (mM)		Relación molar
	ENRO	Ag(I)	
E-0	0,015	-	0
E-1		0,05	1:3
E-2		0,5	1:30
E-3		2,5	1:160
E-4		5,0	1:320

- **Disoluciones mezcla de antibióticos con AgNPs, numeradas como m\_10nm-0 a m\_10nm-5.** Las disoluciones m\_10nm-0 a m\_10nm-5 se prepararon a partir de AgNPs 0,05mM de 10nm con las distintas concentraciones de los antibióticos AMX, ENRO y AZT. Se emplearon los estándares de antibióticos en concentraciones aproximadas AMX 0,1M, ENRO 28mM y AZT 13mM. Y del patrón comercial de AgNPs de 10nm de 0,02mg mL<sup>-1</sup>, para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 3 (volumen final 3mL) en tubos *ependorf*. Estas disoluciones se dejaron reaccionar protegidas de la luz durante 2h antes de su uso.

Tabla 3. Concentraciones de los 3 antibióticos AMX, ENRO, AZT y AgNPs de 10nm, y sus relaciones molares, en las disoluciones denominadas m\_10nm-0a m\_10nm -5.

Mezclas	Concentraciones (mM)		Relación Molar
	AgNPs	Antibiótico	
m_10nm-0	0,05	-	0
m_10nm -1		0,05	1:1
m_10nm -2		0,10	1:2
m_10nm -3		0,50	1:10
m_10nm -4		1,00	1:20
m_10nm -5		5,00	1:100

- Disoluciones de reacción de antibióticos con AgNPs, denominadas m\_50nm-0 a m\_50nm-5. Las disoluciones m\_50nm-0 a m\_50nm-5 se prepararon reaccionando disoluciones de AgNPs con concentraciones variables de AMX, ENRO, AZT, para obtener las concentraciones y relaciones molares resumidas en la Tabla 4. Se emplearon AgNPs de 50nm de diámetro ( $5\text{mg mL}^{-1}$ ). Estas disoluciones se prepararon en un volumen final de 10mL en tubos *ependorf*, y se dejaron reaccionar durante 2h, protegidas de la luz ambiental, antes de su uso.

Tabla 4. Resumen de las concentraciones de AMX ENRO, AZT y AgNPs de 50nm en las disoluciones numeradas como m\_50nm-0 a m\_50nm -5.

Mezclas	Concentraciones (mM)		Relación Molar
	AgNPs	Antibiótico	
m_50nm-0	0,05	-	0
m_50nm -1		0,05	1:1
m_50nm -2		0,10	1:2
m_50nm -3		0,50	1:10
m_50nm -4		1,00	1:20
m_50nm -5		5,00	1:100

- **Disoluciones de reacción de Ag(I) con antibióticos, numeradas como Ag(I)-S0 a Ag(I)-S4.** Estas disoluciones se prepararon a partir de Ag(I) 0,01mM con concentraciones variables de AMX, ENRO y AZT. Se prepararon en un volumen final de 25mL con KNO<sub>3</sub> 0,1M como electrolito soporte, y se agitaron en orbital a 40rev min<sup>-1</sup> durante 2h. Las concentraciones finales y relaciones molares se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las concentraciones AMX y Ag(I) en las disoluciones de reacción numeradas como Ag(I)-S0 a Ag(I)-S4

Disoluciones	Concentraciones (mM)		Relación Molar
	Ag(I)	Antibiótico	
Ag(I)-S0	0,01	-	0
Ag(I)-S1		0,01	1:1
Ag(I)-S2		0,05	1:5
Ag(I)-S3		0,1	1:10
Ag(I)-S4		0,2	1:20

- **Disoluciones de reacción de Ag(I) con antibióticos numeradas Ag(I)-A0 a Ag(I)-A4.**

Estas disoluciones se prepararon haciendo reaccionar Ag(I) 2 $\mu$ M con concentraciones variables de AMX, ENRO, AZT. Se prepararon a partir de las disoluciones estándar de antibióticos indicadas anteriormente con Ag(I). Las concentraciones preparadas se resumen en la Tabla 6. Estas disoluciones de prepararon en un volumen final de 25mL y disolución amortiguadora *Britton- Robinson* pH=7. En su preparación, se dejaron reaccionar con agitación orbital a 40rev min<sup>-1</sup> durante 2h.

Tabla 6. Resumen de las concentraciones de la reacción de Ag(I) con los 3 antibióticos AMX, ENRO y AZT, numeradas como Ag(I)-A0 a Ag(I)-A5

Disoluciones	Concentraciones (relaciones molares)			
	Ag(I)	AMX	ENR	AZT
Ag(I)-A0	2μM	-	-	-
Ag(I)-A1		0,2mM (1:100)	2μM (1:1)	2μM (1:1)
Ag(I)-A2		0,8mM (1:400)	20μM (1:10)	20μM (1:10)
Ag(I)-A3		1,0mM (1:500)	100μM (1:50)	200μM (1:100)
Ag(I)-A4		1,5mM (1:750)	200μM (1:100)	2000μM (1:1000)
Ag(I)-A5		-	500μM (1:250)	-

## 1.4 Procedimientos experimentales

### 1.4.1 Detección de AgNPs en las muestras *High Stability*, *Biovedik™* y *Wellness Colloidal Silver™* por EAM-UV-Vis.

La presencia de AgNPs en las muestras *Biovedik™* y *Wellness Colloidal Silver™* se determinó registrando la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) por EAM-UV-Vis en un intervalo entre 500 y 300nm. La velocidad de barrido de longitudes de onda fue 100nm por minuto. La disolución patrón de AgNPs de 40nm de 5mg L<sup>-1</sup> y las muestras *Biovedik™* y *Wellness Colloidal Silver™* fueron medidas en una cubeta espectrofotométrica de cuarzo de 3,5mL y paso óptico 10mm.

## Parte I

### 1.4.2 Digestión de las muestras *Biovedik*<sup>TM</sup> y *Wellness Colloidal Silver*<sup>TM</sup>.

La digestión de las muestras *Biovedik*<sup>TM</sup> y *Wellness Colloidal Silver*<sup>TM</sup> para la determinación de plata total se llevó a cabo añadiendo mezclando un mismo volumen de muestra que de HNO<sub>3</sub> 69% y dejando actuar el ácido por 1h a 25°C.

### 1.4.3 Ultrafiltración de las muestras *Biovedik*<sup>TM</sup> y *Wellness Colloidal Silver*<sup>TM</sup>.

Las muestras se sometieron a 10min de ultrafiltración a una velocidad de 9000rpm. Se utilizaron filtros de 3kDa de tamaño de poro, que no permiten el paso de partículas mayores de 2nm. Los filtros se activaron antes de su uso con 500µL de agua MQ. Se filtró un mismo volumen de las muestras.

### 1.4.4 Determinación de plata por AAS.

Para la determinación de plata se empleó un espectrómetro de absorción atómica de llama, equipado con una lámpara de cátodo hueco de plata a 2mA y longitud de onda 328,1nm. La determinación de plata total se llevó a cabo después de una digestión acida. La Ag(I) se determinó empleando ultrafiltración para separar la Ag(I) de las AgNPs.

### 1.4.5 Determinación de Ag(I) en presencia de AgNPs por SWASV.

Estas determinaciones voltamétricas se llevaron a cabo después de diluir con NaClO<sub>4</sub>UV-vis (0,1 M), para obtener las concentraciones de trabajo adecuadas. 15mL de las muestras se transfirieron a una cubeta voltamétrica de vidrio de 20mL. Las medidas voltamétricas se realizaron con un potenciostato AutoLab PGSTAT-12, con el software *Autolab* v.2.2, con electrodo auxiliar de hilo de platino, electrodo de referencia 3M. Ag / AgCl con un puente salino KNO<sub>3</sub> 0,1 M., y de trabajo electrodo de carbono vítreo (GC, diámetro 3mm) todos de BASi. La etapa de depósito se llevó a cabo con agitación, con un potencial de electrolisis  $E_d = -0,5V$  durante un tiempo de  $t_d = 120s$ . Después un tiempo de reposo de 5s sin agitar, el barrido anódico lineal de potencial hasta +0,5V con un incremento de paso  $\Delta E = 4mV$ , velocidad de barrido  $v = 0,04V s^{-1}$ , frecuencia  $f = 25Hz$  y amplitud  $Amp = 25mV$ . Las muestras

se desoxigenaron con corriente de  $N_2$  durante 120s. antes de cada medida. El electrodo de trabajo se pulió con alúmina ( $\varnothing=3\mu\text{m}$ ), lavado con agua y sometido a ultrasonidos previamente a su uso. Todos los recipientes empleados se limpiaron con ácido nítrico 50% (v/v) y se mantuvieron con disoluciones de ácido nítrico al 1% después de su uso.

#### 1.4.6 Determinación de Ag(I) por voltimetría (directa) diferencial de pulsos con electrodo de platino.

Las medidas se realizaron con un potenciostato  $\mu$ Autolab III (Metrohm). Se emplearon electrodos de trabajo de platino (3mm de diámetro), auxiliar de hilo de platino y referencia 3M. Ag/AgCl. Las muestras se desoxigenaron durante 120s con corriente de  $N_{2(g)}$ . El barrido catódico diferencial de pulsos fué desde  $E_i=+0,2\text{V}$  hasta  $E_f=-0,9\text{V}$ , con unas condiciones: incremento de paso de potencial  $\Delta E=-0,01\text{V}$ , potencial del impulso de modulación  $\Delta E_p=0,05\text{V}$ , tiempo de modulación  $t_p=0,5\text{s}$ , y tiempo de paso  $t_m=0,05\text{s}$ . El electrodo de trabajo se pulió con dispersiones de diamante ( $\varnothing=3\mu\text{m}$  y  $1\mu\text{m}$ ) durante 2min sobre una superficie de nylon, se lavaron con agua y sometieron a ultrasonidos previamente a su uso.

#### 1.4.7 Determinación de Ag(I) con método AGNES.

Las medidas de *Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES)* se realizaron con un potenciostato *Eco Chemie* Autolab-PGSTAT10 conectado a un sistema automatizado de 3 electrodos Metrohm 663 VA-*Stand*. Para este tipo de estudio se empleó un electrodo de trabajo de gota pendiente de mercurio (*HMDE*), electrodo auxiliar de carbono vítreo, y electrodo de referencia 3M. de Ag/AgCl con un puente salino 0,1M  $KNO_3$ . Se utilizó una celda de vidrio termostatazada a  $25^\circ\text{C}$  (Metrohm), y se desoxigenó con corriente de  $N_2$  durante 20min antes de cada medida. En la primera etapa se mantuvo un potencial constante  $-0,5154\text{V}$  durante 500s y posteriormente  $-0,4562\text{V}$  durante un tiempo variable (50-500s), con agitación a 400rpm. En la segunda etapa se mantuvo el potencial a  $-0.4473\text{V}$  durante 150s, sin agitación.

#### 1.4.8 Determinación de Ag(I) con el método “*In Situ Prepared Indicator Electrode*”.

Las medidas de *In Situ Prepared Indicator Electrode (ISPIE)* se realizaron con un potenciostato Eco Chemie Autolab-PGSTAT10 conectado a un sistema de electrodos Metrohm 663 VA-stand. Se empleó un electrodo de trabajo rotatorio de carbono vítreo (multimodo Metrohm), electrodo auxiliar de carbono vítreo y de referencia 3M. Ag/AgCl con un puente salino 0,1M KNO<sub>3</sub>. La primera etapa en este tipo de medida fue de depósito a 0,1V durante 800s, con agitación a 400rpm. En la segunda etapa el potencial varió entre 360mV y 740mV con saltos de potencial de 20mV de duración 30s. Las medidas se llevaron a cabo en una celda termostatzada a 25°C. Determinación de plata iónica en presencia de nanopartículas de plata empleando voltametría de redisolución anódica.

## Resultados y Discusión

### 1.5 Determinación de plata iónica en presencia de nanopartículas de plata empleando voltametría de redisolución anódica.

Numerosos artículos estudian la determinación de plata por técnicas electroquímicas [13]; [17–19], y más concretamente empleando voltamperometría de redisolución anódica. El procedimiento general de las técnicas de redisolución implica la preconcentración de la plata en la superficie del electrodo de trabajo, seguido de la etapa de redisolución en donde se registra la corriente anódica de oxidación de la plata previamente depositada. Esta corriente permite la identificación y la cuantificación de las especies de plata, en función de cómo se haya diseñado experimentalmente.

Una primera dificultad importante, es que la plata tiene un potencial de oxidación muy próximo al del mercurio, solapándose las corrientes anódicas de ambos metales. Por este motivo, se han estudiado un gran número de alternativas como electrodos de trabajo sólidos [20], como por ejemplo electrodos de base carbono [21]; [22], carbón vítreo, y una muy extensa variedad de electrodos químicamente modificados [23]. Sin embargo, el uso de electrodos de mercurio para preconcentrar la plata en procedimientos de voltametría de redisolución es casi inexistente, salvo muy pocos trabajos que han intentado solventar la dificultad mencionada, empleando ligandos complejantes de la plata o del mercurio, o bien empleando disoluciones no acuosas que puedan conseguir una mínima separación de los potenciales de oxidación de ambos metales [24]

Un problema que aparece en la determinación ASV de plata, es la formación de distintos depósitos de  $\text{Ag}^0$  sobre el electrodo de trabajo, combinados con procesos de adsorción, que requieren energías potenciales distintas para su oxidación. Es decir, que se producen uno o varios picos de corriente de redisolución con distintos valores de potencial de pico ( $E_p$ ), que dificulta la cuantificación de la plata. Se han descrito varios métodos en los que se utilizan soluciones ácidas de diferentes electrolitos para mejorar su “electro-disolución” [22]; [25].

Sin embargo, no hay referencias bibliográficas de otros grupos de investigación en donde se aborde la detección y cuantificación directa de plata iónica Ag(I) en presencia de nanopartículas de plata (AgNP) por ASV, utilizando electrodos de GC, salvo este estudio que hemos realizado en nuestro laboratorio [10]. Hasta nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta un método SWASV para determinar Ag(I) en presencia del AgNPs y es aplicado en muestras reales [10]

En este apartado se describe el desarrollo y optimización de un método voltamétrico de redisolución de onda cuadrada (SWASV) que permite la determinación directa de Ag(I) en presencia de AgNPs. Este método se aplicó a muestras reales que contenían plata (I) y plata coloidal. Los resultados electroquímicos se compararon con los obtenidos por absorción atómica (AAS) para las mismas muestras.

### 1.5.1 Validación del método SWASV para la determinación de Ag(I) en presencia de AgNPs.

El método que se ha desarrollado se ha validado cumpliendo los criterios y requisitos EURACHEM establecidos en su guía para la validación de métodos bioanalíticos [26]; [27]. Las propiedades analíticas evaluadas y criterios a cumplir fueron en relación a la confiabilidad, repetibilidad, linealidad, rango de trabajo, robustez, recuperación, y límites de detección y de cuantificación. Se realizaron entre 4 y 1<sup>º</sup> réplicas de cada una de las medidas.

#### ▪ Identificación:

Para evaluar la fiabilidad del método, se midieron cuatro replicas (n=4) de un control positivo que contenía Ag(I) y AgNPs de 60nm a 0,5mg L<sup>-1</sup> en NaClO<sub>4</sub> 0,1M y cuatro réplicas de un control negativo. El control negativo estuvo formado por electrolito soporte NaClO<sub>4</sub> 0,1M y AgNPs de 60nm a 0,5mg L<sup>-1</sup>. Los controles positivos y los negativos se midieron en las mismas condiciones.

La plata se depositó a -0,5V durante 120s, y después de un tiempo de equilibrio  $t_e=5s$  se realizó un barrido de 0 a 0,45V con un potencial de paso ( $\Delta E$ ) de 0,004V y una velocidad de

barrido de potenciales  $v_b=0,04V s^{-1}$ . Otros detalles del procedimiento se describen en el apartado 1.4.5. En el estudio de las condiciones óptimas de medición se descartaron aquellas en las que se obtuvieron más de una señal en la etapa de redisolución. Las señales múltiples no permiten una correcta cuantificación. Estas se producen porque bajo algunas condiciones la plata se deposita sobre la superficie del electrodo de forma no homogénea obteniéndose así depósitos con diferentes estructuras cristalinas [28].

La Figura 1 muestra los voltamperogramas anódicos típicos para Ag (I) en presencia de AgNPs de 40nm y el de una muestra blanco. Utilizando los parámetros instrumentales que se describen en el apartado 1.4.5 fue posible obtener un pico único a  $0,240\pm 0,008 V$  que corresponde a la oxidación del depósito de plata. Mientras que los blancos no mostraron señales en intervalo de barrido de potencial del método.

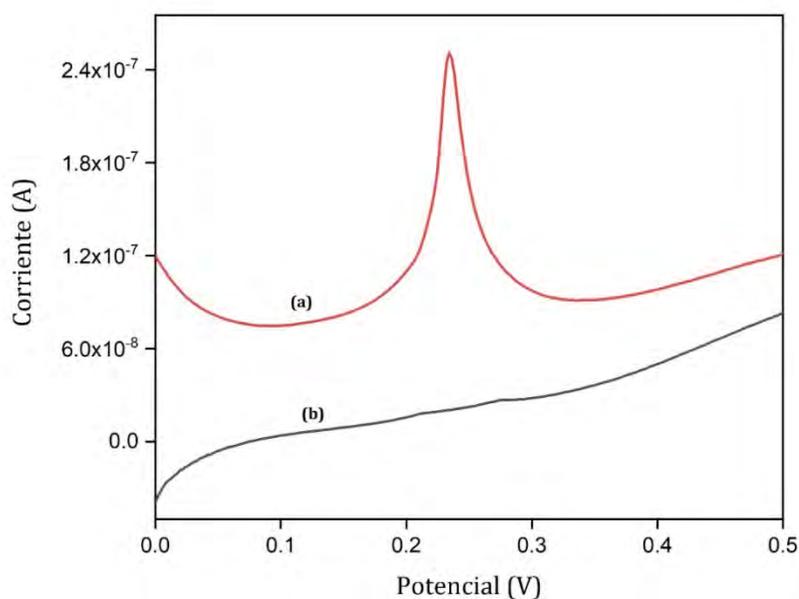


Figura 1. (a) SWASV del control positivo (Ag(I) y AgNPs de 60nm a  $0,5 mg L^{-1}$ ) (rojo); (b) control negativo (AgNPs de 40nm a  $0,5mg L^{-1}$ ) (azul). El electrolito soporte fue  $NaClO_4$  0,1M.  $E_d=-0,5V$ ;  $t_d=120$ ;  $t_r=5s$ ; Barrido de potencial: 0 a 0,5V;  $\Delta E=0,004V$ ,  $v_{pb}=0,04V s^{-1}$

Las pequeñas diferencias entre la línea de base del blanco (muestras sin Ag(I)) y la línea base de las muestras positivas (muestras con Ag(I)) responde a las diferencias entre las composiciones de ambas muestras.

#### ▪ Repetibilidad

La precisión del método se evaluó en dos niveles de concentración, control superior (CS) y control inferior (CI), y se midieron seis réplicas de cada control (n=6). El CI fue preparado en concentraciones de Ag y AgNPs  $10\mu\text{g L}^{-1}$  y el CS  $20\mu\text{g L}^{-1}$  de ambas. Las réplicas se midieron solo una vez para evitar la interferencia de la posible oxidación de las AgNPs.

El método mostró una desviación estándar relativa (%RSD) del 13,64% para control superior y del 8,54% para el control inferior (Tabla 7.). Estos valores cumplen con el criterio mínimo exigido para su validación [29], dado que se permite un %RSD de hasta 25% en el CI y 15% en el CS [26]; [29]; [30]. En procedimientos voltamétricos similares, los valores habituales se sitúan en un %RSD del orden del 10% [.

#### ▪ Linealidad e intervalo de trabajo:

Para evaluar la linealidad, se representaron tres curvas de calibrado empleando como señal el área del pico (culombios) en función de la concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Se prepararon cuatro disoluciones de calibración (2,5; 5; 10;  $20\mu\text{g L}^{-1}$ ) a partir de una disolución estándar de plata de  $10\text{mg L}^{-1}$ . A cada una de las disoluciones se les añadió una concentración constante de AgNPs de 40nm ( $5\mu\text{g L}^{-1}$ ). Estas disoluciones fueron medidas por cuadruplicado (n=4).

Se observó una relación lineal del valor del área de pico en función de la concentración (coeficiente de regresión,  $R=0,9998$ ), cumpliendo los criterios de validación. Por lo tanto, se tiene un intervalo de respuesta lineal de 2,5 a  $20\mu\text{g L}^{-1}$  de Ag(I), concentraciones similares a los obtenidos en otros trabajos [22].

La ecuación de la línea recta de regresión y el coeficiente de regresión se muestran en la Tabla 7.

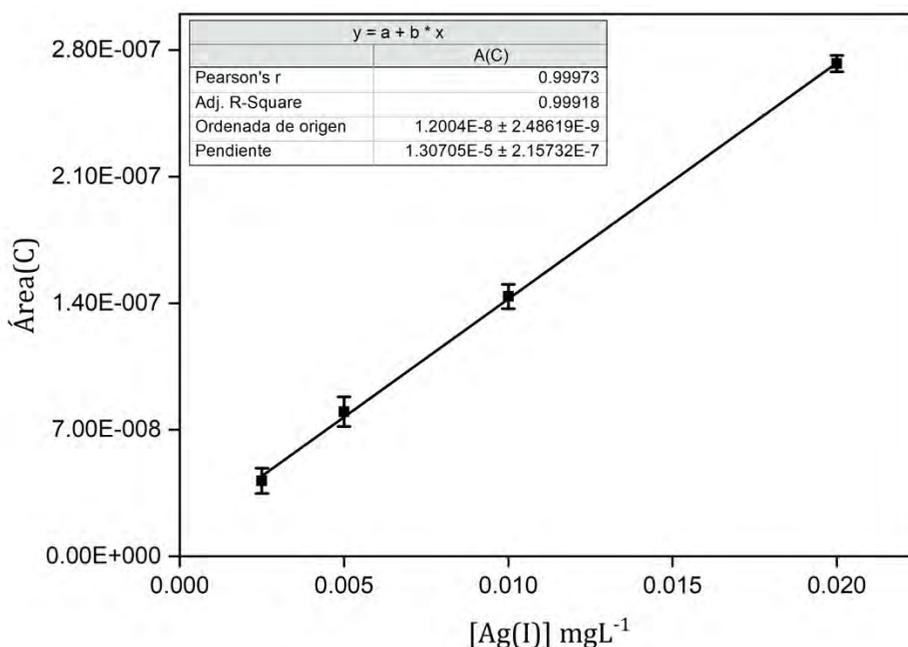


Figura 2. Calibrado en la determinación por SWASV de Ag(I) en presencia de AgNPs (electrolito soporte NaClO<sub>4</sub> 0,1M)

▪ **Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ): s**

Se calcularon a partir de la desviación estándar de las medidas de concentración ( $s_a$ ) y de la pendiente media ( $b$ ) de las tres curvas de calibrado [31], :

$$LD = 3s_a/b \quad (1)$$

$$LQ = 10s_a/b \quad (2)$$

En la mayoría de los métodos analíticos, el LD y el LQ se calculan atendiendo a la relación señal-ruido. Sin embargo, dado que el concepto de ruido es distinto en la medida SWASV que en la mayoría de otras señales empleadas en otras técnicas instrumentales, creemos que esta medida es más correcta [26]; [31] .

Los valores obtenidos fueron LD=1,3µg L<sup>-1</sup> y LQ=4,2µg L<sup>-1</sup> de Ag(I). Son valores pequeños, similares [13]; [22]; [34]. y en algunos casos inferiores [8] a los encontrados en la

bibliografía, que muestran una buena sensibilidad de este procedimiento para la determinación de Ag(I).

▪ **Recuperación y robustez:**

La recuperación se determinó comparando los resultados de cuantificar una muestra de concentración conocida ( $25\text{mg L}^{-1}$  de Ag(I)) medida por AAS y SWASV ( $n=4$ ). Las mismas muestras ( $n=4$ ) se midieron en primer lugar por un método validado de AAS, y luego por SWASV una vez diluidas con  $\text{NaClO}_4$  0,1M. La recuperación fue superior al 90%. En la literatura se obtienen recuperaciones del orden del 70-30% [4]; [23].

La robustez es una forma de medir la fiabilidad del método, siguiendo el mismo procedimiento de validación [28]. Se define como la capacidad del método de no verse afectado por variaciones pequeñas deliberadas de sus parámetros o condiciones de medida [28]. Se evaluó midiendo la recuperación de una muestra de  $25\text{ mg L}^{-1}$  de plata con dos electrodos de trabajo distintos (GCE\_1 y GCE\_2). La recuperación con GCE\_1 fue  $92\pm 1\%$  y de GCE\_2 fue  $90\pm 3\%$ . Los datos obtenidos con ambos electrodos distintos no mostraron diferencias significativas (test t) para un nivel de confianza del 95%.

La Tabla 7 resume las propiedades analíticas medidas con el procedimiento SWASV que hemos desarrollado para la determinación de Ag(I) en presencia de AgNPs.

Tabla 7. Repetibilidad, linealidad, rango de trabajo, recuperación, robustez, límite de detección y cuantificación del método de SWASV

Parámetro	Descripción	Resultado
Repetibilidad	20µg L <sup>-1</sup> (n=6)	13,6%
	10µg L <sup>-1</sup> (n=6)	8,5%
Linealidad	R2=0,9985	y=1,3 ·10 <sup>-5</sup> x + 6,9 ·10 <sup>-9</sup>
Intervalo de trabajo		2,5 -20 µg L <sup>-1</sup>
Límite de detección	LD=3sa/b	1,3 µg L <sup>-1</sup>
Límite de cuantificación	LQ=10sa/b	4,2 µg L <sup>-1</sup>
Robustez	GCE_1 (n=3)	GCE_1 =92±1%
	GCE_2 (n=3)	GCE_2=90±3%
Recobrado	25 mg L <sup>-1</sup> (n=3)	92±1%

### 1.5.2 Aplicación del procedimiento SWASV para la determinación de Ag(I) en presencia de Ag coloidal en muestras reales.

Para demostrar la aplicabilidad en muestras reales del método que se ha desarrollado para la determinación de Ag(I) en presencia de plata coloidal, se emplearon tres productos comercializados como antibactericidas de uso tópico o como complemento alimenticio, denominados *Biovedik™*, *High Stability™*, and *Wellness™ colloidal silver* (Figura 3). En sus especificaciones se indica un contenido de plata coloidal superior a 25mg L<sup>-1</sup> (*Biovedik™*), y 30mg L<sup>-1</sup> (*Wellness™*).



Figura 3. Disoluciones comerciales de plata coloidal y Ag(I) comercializadas como antibactericidas: *Biovedik*<sup>TM</sup> ionic silver and colloidal, *High Stability*<sup>TM</sup> silver, and *Wellness*<sup>TM</sup> colloidal silver.

El espectro EAM-UV-Vis de ambas muestras tiene un máximo de absorbancia correspondiente a la banda de absorción del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, confirmando que contienen AgNPs. En la Figura 4 se muestran los espectros de absorción de disoluciones 5 mg L<sup>-1</sup> de AgNPs (40nm), y de las dos muestras, que presentan máximos de absorbancia a 422 (*Biovedik*<sup>TM</sup>) y 412nm (*Wellness*<sup>TM</sup>). Las diferencias entre las longitudes de onda de la máxima absorbancia se deben a distintos valores de la resonancia de plasmón superficial (*SPR*) producidos por distintos diámetros de las nanopartículas. La variación de la posición e intensidad de la banda *SPR* es un tema muy estudiado. En el apartado de esta memoria dedicado a la interacción de las AgNPs con la amoxicilina se explica de forma más detallada la variación de la posición de la banda *SPR* con la variación del diámetro y el recubrimiento de las AgNPs

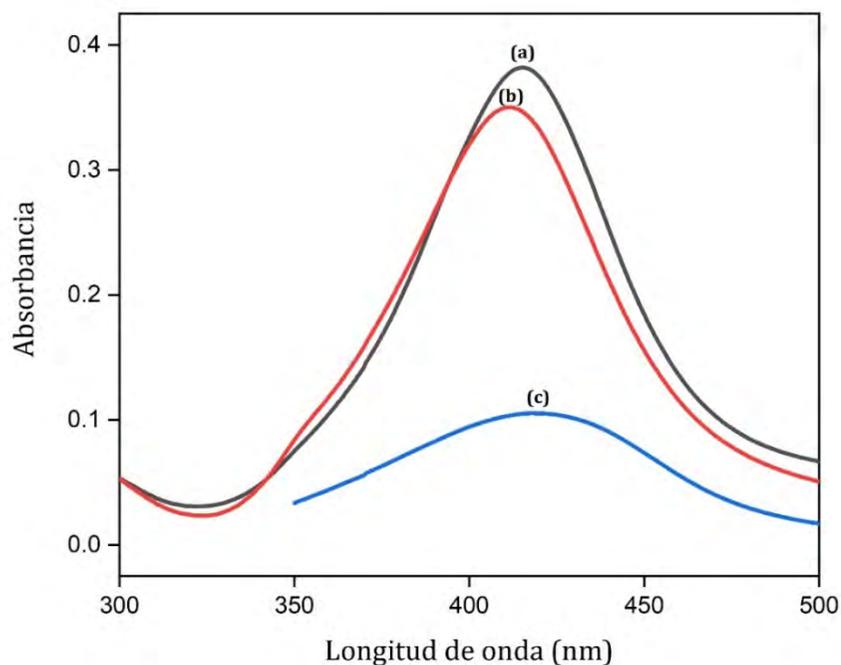


Figura 4. Espectro de absorción molecular ultravioleta-visible de: (a) disolución estándar de AgNPs de 40nm ( $5\text{mg L}^{-1}$ ); (b) *Wellness Colloidal Silver*<sup>TM</sup> y (c) *Biovedik*<sup>TM</sup>. Velocidad de barrido  $100\text{nm min}^{-1}$ .

El método SWASV se empleó en la detección y cuantificación de Ag(I) en estas dos muestras, y la concentración total de plata una vez que llevamos a cabo una digestión ácida previa (Figura 5). En este caso, calculamos la concentración de la plata total como la suma de las concentraciones de Ag(I) y de AgNPs. La única preparación de las muestras fue su dilución en el volumen adecuado para obtener disoluciones  $\text{NaClO}_4$  0,1M. Disoluciones alícuotas se trataron con  $\text{HNO}_3$  concentrado para la determinación de plata total mediante SWASV (apartado 1.4.5).

En la Figura 5 se muestran los voltagramas obtenidos en la determinación directa de Ag(I). Las muestras se cuantificaron por el método de calibrado externo. Las concentraciones se muestran en la Tabla 8.

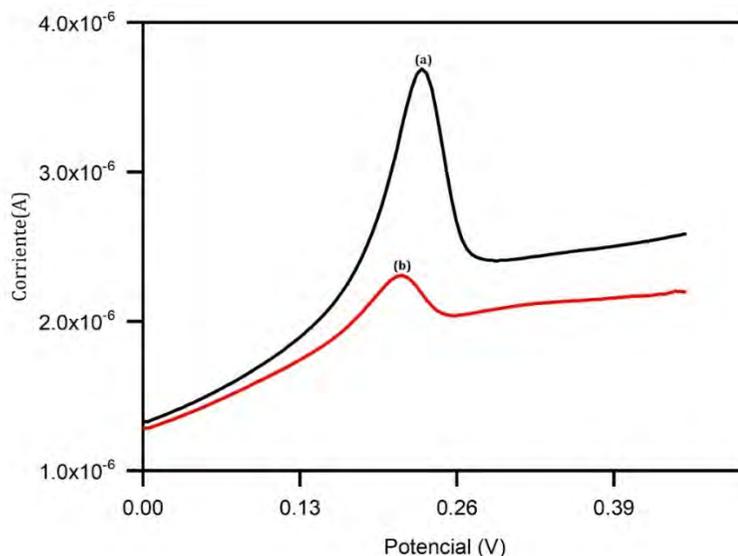


Figura 5. Voltagramas de redisolución SWASV de las muestras: (a) *Wellness Colloidal Silver™* (rojo) y (b) *Biovedik™* (negro) en  $\text{NaClO}_4$  0,1M (1:10). Condiciones de medición como en Figura 4

Estos resultados voltamétricos se compararon con los obtenidos con EAA (procedimiento del apartado 1.4.4). La  $\text{Ag}_{\text{total}}$  se determinó después de su transformación ácida, y la concentración de  $\text{Ag(I)}$  se obtuvo a través de su separación a partir de las muestras originales por ultrafiltración [35], descrito en el apartado 1.4.4 (retención de nanopartículas superiores a 1nm de diámetro), lo que permite cuantificar por EAA solo la  $\text{Ag(I)}$ . Las concentraciones medidas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de  $\text{Ag}_{\text{total}}$  y  $\text{Ag(I)}$  determinadas por SWASV y AAS. Las concentraciones de  $\text{AgNPs}$  se obtuvieron por diferencia.

Muestra	$\text{Ag}_{\text{total}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )		$\text{Ag(I)}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )		$\text{AgNPs}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
	AAS	SWASV	AAS	SWASV	Diferencia
<b>Biovedik™</b>	20,9±0,4	20,5±2,0	15,0±1,0	14,7±0,9	5,9±0,1

---

<b>Ag nominal</b>					
<b>&gt;25mg L<sup>-1</sup></b>					
<hr/>					
<b>Wellness</b>					
<b>Ag nominal</b>	32,6±1,1	32,0±2,0	0,36±0,01	0,4±0,1	32,1±0,2
<b>30mg L<sup>-1</sup></b>					

---

No hay diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por ambos métodos, para un nivel de confianza del 95% (test-t). Las concentraciones totales de plata medidas por ambos métodos coinciden con las indicadas en las especificaciones de ambos productos por los fabricantes, mostrando que se están refiriendo a la suma de concentraciones de Ag(I) y de AgNPs, pero no solamente al contenido en nanopartículas de plata como indica en su etiquetado.

El contenido de Ag(I) en la muestra de *Biovedik™* constituye alrededor del 70% del total de plata, siendo la concentración [AgNPs]=5,9±0,1mg L<sup>-1</sup>. La muestra *Wellness Colloidal Silver™* tiene una concentración [Ag<sub>total</sub>]=33mg L<sup>-1</sup> y la Ag(I) es solamente un 1% de Ag(I) del total. El método SWASV mostró ser efectivo para la determinación de plata iónica en ambas muestras para este amplio rango de concentraciones, en presencia conjunta de ambas especies de plata. El método electroquímico es un método sencillo y eficiente, con una buena sensibilidad y reproducibilidad, para diferenciar y cuantificar las distintas especies de plata en la misma muestra.

En resumen, el método voltamétrico que hemos desarrollado permite la cuantificación rápida y sencilla de Ag<sub>total</sub>, AgNPs y Ag(I) en muestras que contienen concentraciones variables y en un alto rango de plata metálica (AgNPs) y plata iónica disuelta, en comparación con otros procedimientos voltamétricos con otro tipo de electrodos o que requieren de la modificación química del electrodo de trabajo [13]; [22]; [25]. El procedimiento correcto de limpieza de los electrodos (pulido y lavado) evita la aparición de varios picos de redisolución de la plata depositada con distintas energías potenciales, un problema que ocurre frecuentemente con este metal dadas las distintas estructuras

cristalinas que pueden formarse [30]. En estas condiciones, no es necesaria la modificación química del electrodo de trabajo, lo que simplifica el procedimiento.

Hasta nuestro conocimiento, este trabajo publicado en la revista *Electroanalysis* (2019) es la primera aportación al uso de procedimientos voltamétricos con electrodos sin modificar para la especiación de muestras que contienen diversas especies de plata [10].

## 1.6 Uso de electrodos metálicos para la determinación de plata iónica por voltametría (directa) diferencial de pulsos.

La especiación en química analítica permite la diferenciación de un elemento entre sus diferentes formas físico-químicas [36]. En el caso de las especies de plata, tal como se ha comentado en la introducción, tiene gran importancia por la influencia en sus propiedades antibactericidas, su biodisponibilidad, o su comportamiento en el medio ambiente, por ejemplo. Por lo que cada vez se demanda más metodología analítica en este sentido [37].

Para la determinación de plata por voltametría de redisolución, técnica voltamétrica muy sensible, es preciso un material de electrodo que ofrezca la suficiente capacidad de retener la plata metálica. Es la técnica adecuada cuando se requieren medidas del orden de ppb's o incluso ppt's. Para la determinación de concentraciones superiores, en este caso no es preciso llevar a cabo la preconcentración de la plata, pudiéndose llevar a cabo una determinación voltamétrica directa. Sin embargo, este elemento presenta diversas dificultades, ya mencionadas. En primer lugar, no es muy soluble en mercurio, a diferencia de otros metales como Cd, In o Pb. Pero, más importante, presenta un potencial de onda media muy próximo al del mercurio. Lo que impide, por ejemplo, llevar a cabo una preconcentración en forma de amalgama para su posterior medida con técnicas de redisolución [26].

Para la determinación directa de la plata (también indirecta por métodos de redisolución), se han estudiado numerosos tipos de materiales de electrodos de trabajo. Los más habituales son los electrodos de base carbono [22]; [38]; [39], como el carbón vítreo [34]; [40-42] o los electrodos de pasta de carbón [17]; [23]; [25]; [43]. Este tipo de electrodos, presentan altas velocidades de transferencia de carga en la determinación de

Plata. En menor medida, también se han empleado electrodos metálicos de cobre [44] oro [45], Platino [46], e incluso mercurio [26]

### 1.6.1 Determinación de Ag(I) por voltametría (directa) diferencial de pulsos sobre electrodo metálicos: comparación de electrodos.

La reducción de Ag(I) sobre electrodos sólidos de oro (*AuE*) y platino (*PtE*) se llevó a cabo en celdas de vidrio de 20mL de capacidad y un sistema de tres electrodos donde los electrodos de trabajo fueron electrodo de disco de 2mm de diámetro de Au y Pt, el electrodo de referencia de Ag/AgCl y el auxiliar electrodo de hilo de platino de 0,5mm de diámetro (Figura 6). El electrodo de referencia se puso en contacto con la disolución a través de un puente salino conteniendo  $\text{KNO}_3$  0,1M, para evitar la precipitación de  $\text{AgCl}_{(s)}$  por la pérdida de iones cloruros de su disolución de relleno interna. Todas las muestras se desoxigenaron durante 60s con corriente de  $\text{N}_{2(g)}$  antes de cada medida voltamétrica. El tipo de barrido empleado fue diferencial de pulsos, evitando en lo posible corrientes capacitativas y residuales, siendo un barrido voltamétrico aún lento uno de los más sensibles en condiciones de bajas velocidades de transferencia de carga.



Figura 6. Celda voltamétrica y sistema de tres electrodos. Electrodo de trabajo (EPt o EAu de  $d=2\text{mm}$ ), electrodo de referencia 3M. Ag/AgCl con puente salino  $\text{KNO}_3$  0,1M, y electrodo auxiliar (hilo de Pt, diámetro 0,5 mm).

### Parte I

Las medidas del electrolito soporte ( $\text{KNO}_3$  0,1M) con electrodo de platino ( $\text{PtE}_1$  y  $\text{PtE}_2$ ) y oro ( $\text{AuE}_1$  y  $\text{AuE}_2$ ) se observan en la Figura 7 y Figura 8. Estas medidas no mostraron señales interferentes en el intervalo de potenciales utilizado. Los  $\text{PtE}_1$   $\text{PtE}_2$  muestran una honda de potencial debido a la descarga de iones hidrógenos a partir de los -0,8V. En los  $\text{AuE}_1$  y  $\text{AuE}_2$  no se observó onda de potencial en el intervalo medido.

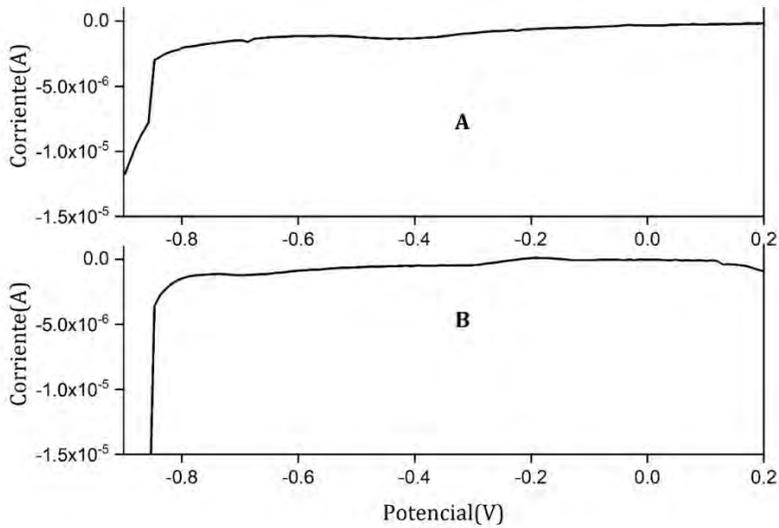


Figura 7. Voltamperograma de  $\text{KNO}_3$  0,1M (electrolito soporte) con electrodos de trabajo  $\text{PtE}_1$  (A) y  $\text{PtE}_2$  (B).  $E_i=0,2\text{V}$ ;  $E_f=-0,9\text{V}$ ;  $\Delta E= -0,01\text{V}$ ;  $\Delta E_p=0,05\text{V}$ ;  $t_m=0,05\text{s}$  y  $t_p=0,5\text{s}$ .

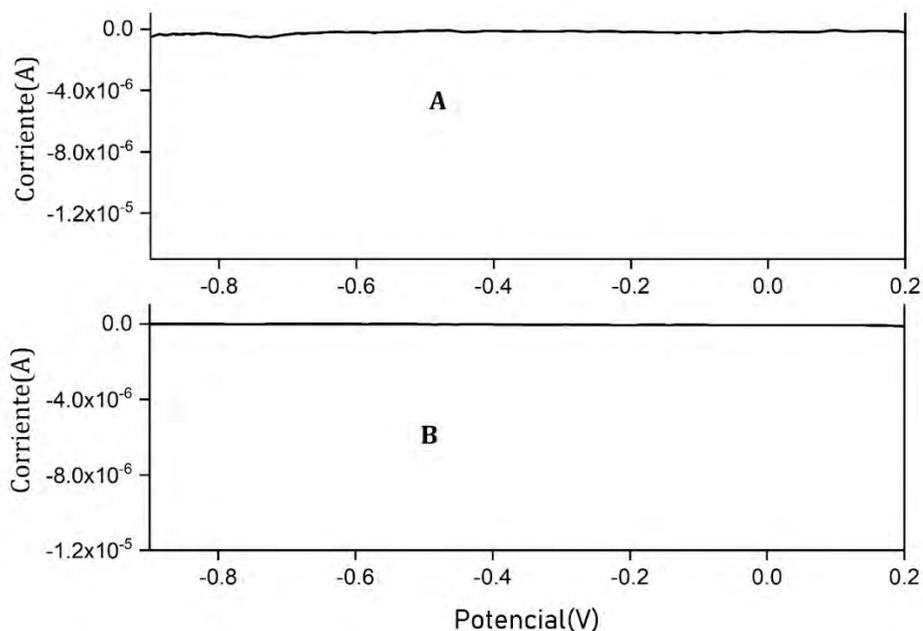


Figura 8. Voltamperograma de  $\text{KNO}_3$  0,1M (electrolito soporte) con electrodos de trabajo AuE1 (A) y AuE2 (B)  $E_i=0,2\text{V}$ ;  $E_f=-0,9\text{V}$ ;  $\Delta E=-0,01\text{V}$ ;  $\Delta E_p=0,05\text{V}$ ;  $t_m=0,05\text{s}$  y  $t_p=0,5\text{s}$ .

Al medir una disolución de  $\text{Ag(I)}$  de  $10\text{mg L}^{-1}$  con los  $\text{PtE}_{1,2}$  y los  $\text{AuE}_{1,2}$  se pudo observar el pico de reducción de  $\text{Ag(I)}$  (Figura 9). Las medidas realizadas con  $\text{PtE}_{1,2}$  mostraron un menor  $E_p$  que las realizadas con  $\text{AuE}_{1,2}$  mostrando mayor poder electrocatalítico del platino frente al oro. Los picos obtenidos con  $\text{PtE}_{1,2}$  fueron más estrechos que con  $\text{AuE}_{1,2}$  lo que indica una cinética de reducción más rápida lo que se encuentra relacionado con el mayor poder electrocatalítico del platino frente al oro en la reducción de la  $\text{Ag(I)}$ . Otro punto a favor del uso de PtE es que las medidas hechas entre diferentes electrodos ( $\text{PtE}_1$  y  $\text{PtE}_2$ ) fueron más precisas.

Parte I

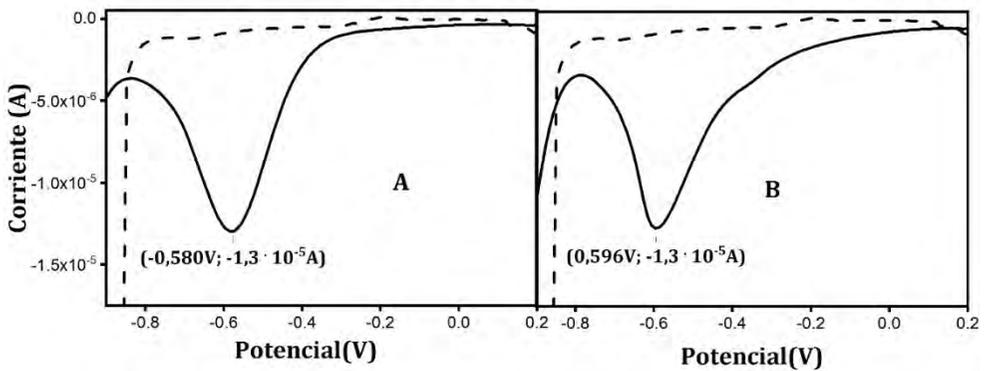


Figura 9. Voltamperogramas de disolución de  $\text{KNO}_3$  0,1M (líneas discontinuas) y disolución de  $\text{Ag(I)}$   $10\text{mg L}^{-1}$  (líneas continuas) con: (A) EPT1 y (B) EPT2. Condiciones de medida como en la Figura 8.

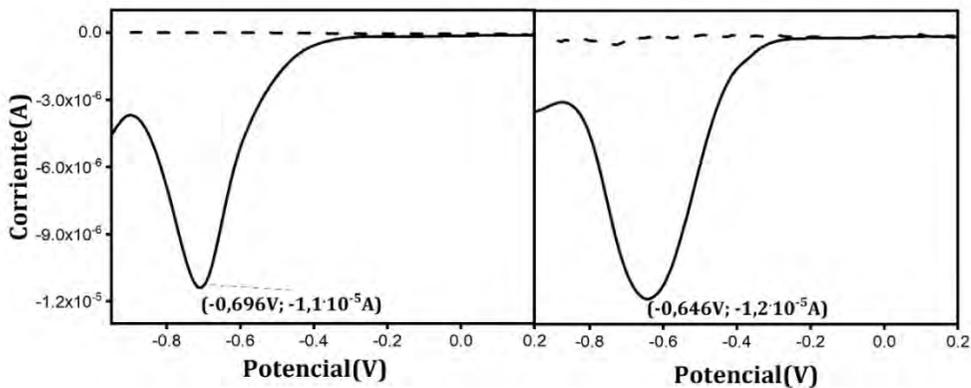


Figura 10. Voltamperogramas de disolución de  $\text{KNO}_3$  0,1M (líneas discontinuas) y disolución de  $\text{Ag(I)}$   $10\text{mg L}^{-1}$  (líneas continuas) con: (A) AuE1 y (B) AuE2. Condiciones de medición como en la figura anterior.

Se determinaron algunas propiedades analíticas del método para conocer el intervalo de concentraciones en las que muestra resultados fiables y así aplicar el mismo adecuadamente a la determinación de  $\text{Ag(I)}$  en medios con antibióticos. Lo cual se discutirá en el capítulo 3 de esta tesis.

Las propiedades analíticas evaluadas fueron la repetibilidad, linealidad y límite de detección

▪ **Repetibilidad**

Para evaluar este parámetro se analizaron tres réplicas (n=3) de dos disoluciones de Ag(I) a dos niveles de concentraciones. Un control superior (CS) a 10mg L<sup>-1</sup> y un control inferior (CI) a 1mg L<sup>-1</sup>. La desviación estándar relativa (%RSD) de las áreas (A) de los picos de los controles se determinó con el programa Origin 2019.

La %RSD en el CS y CI del A y fueron 8,53% 16% respectivamente. Los valores obtenidos están de acuerdo con otros métodos electroanalíticos reportados, los cuales presentan una variabilidad de aproximadamente el 15% [47].

▪ **Linealidad e intervalo de trabajo**

Se midieron tres réplicas de disoluciones de Ag(I) de concentraciones de 0,1mg L<sup>-1</sup>; 0,5mg L<sup>-1</sup>; 1mg L<sup>-1</sup>; 2mg L<sup>-1</sup> y 10mg L<sup>-1</sup>.

El gráfico de concentración frente a área de pico mostró una dependencia lineal. La regresión se ajustó en un 99,25% a la ecuación que se muestra en la Tabla 9.

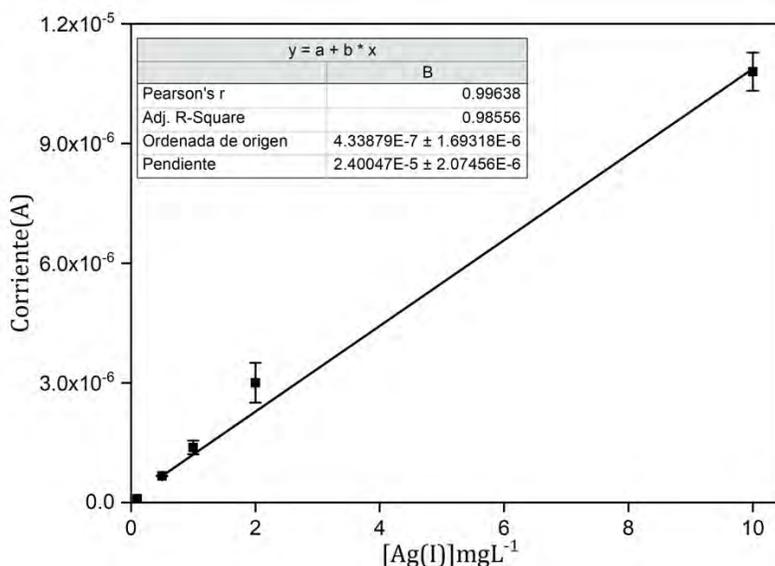


Figura 11. Curva de calibrado (lineal) de Ag(I) en KNO<sub>3</sub> 0,1M por voltimetría directa sobre PtE.

▪ **Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ)**

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a través de los parámetros pendiente e intercepto de las líneas de calibrado como se explica en el apartado 1.5.1.

Los valores de LD y LQ fueron 0,18mg L<sup>-1</sup> y 1,8mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Estos valores son más elevados que los obtenidos para el método de determinación de Ag(I) por redisolución anódica validado en el apartado 1.5.1 como es de esperar para un método voltamétrico directo, pero está de acuerdo con los límites de detección de otros métodos voltamétricos directos [48].

Tabla 9. Repetibilidad, linealidad, rango de trabajo, robustez, LD y LQ de voltametría directa sobre PtE.

<b>Parámetro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Resultado</b>
<b>Repetibilidad</b>	1mg L <sup>-1</sup> (n=3)	8,53%
	10mg L <sup>-1</sup> (n=3)	16%
<b>Linealidad</b>	R <sup>2</sup> =0,9953	y=1,07·10 <sup>-6</sup> x + 1,3·10 <sup>-8</sup>
<b>Intervalo de trabajo</b>		0,2 -10mg L <sup>-1</sup>
<b>Límite de detección</b>	LD=3s <sub>a</sub> /b	0,18mg L <sup>-1</sup>
<b>Límite de cuantificación</b>	LQ=10s <sub>a</sub> /b	0,6mg L <sup>-1</sup>

El método fue utilizado en la especiación de plata en presencia de agentes acomplejantes (antibióticos) teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado. Este estudio se encuentra detallado en el capítulo 3 de este manuscrito.

## 1.7 Determinación directa de Ag(I) en presencia de AgNPs o especies complejadas empleando “Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping” e “In Situ Prepared Indicator Electrode”.

AGNES (*Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping*) es una técnica electroanalítica novedosa diseñada para determinar las concentraciones de iones metálicos libres en disoluciones en presencia de sus especies complejadas. AGNES es una técnica de *redisolución* que consta de dos etapas. En la primera se aplica un potencial (o programa de potenciales) que genera una *ganancia de concentración* de valor conocido entre las concentraciones externas e internas del metal en la superficie del electrodo de mercurio. Este proceso de electrodeposición se lleva a cabo en ausencia de gradientes de concentración, tanto dentro del electrodo (se emplea normalmente un electrodo de gota de mercurio de área constante) como fuera del electrodo (seno de la disolución). Esta es la característica que diferencia la técnica AGNES de otras técnicas voltamétricas de redisolución (*stripping*), como por ejemplo la ASV. En la segunda etapa el metal amalgamado se oxida en condiciones controladas, obteniéndose una corriente solamente debida a la concentración del metal libre, no complejado.

El método AGNES se ha empleado con buenos resultados en la determinación selectiva de metales libres en situaciones y matrices en las que se encuentran estos metales complejados con un gran número de ligandos, por ejemplo, en muestras de medio ambiente. Algunos ejemplos incluyen la determinación de Cd(II), Zn(II), Cu(II), Pb(II) e In(III) en muestras medioambientales [49], y de otros metales en estuarios, aguas marinas, y aguas de río [50]; [51]. Esta técnica se aplica a muestras con muy distinta fuerza iónica, sin la interferencia de mayores corrientes residuales al alcanzarse el equilibrio, debidas a la composición inicial de las muestras [52-54].

El trabajo inicial en AGNES sobre electrodos estacionarios de mercurio (*HMDE*), se ha ampliado posteriormente a electrodos sólidos de Bi y Au en la determinación de Pb y Cu [55]. Sin embargo, el mercurio es el mejor material de electrodo, y además mejora la selectividad del AGNES dado que sólo se miden aquéllos metales que tengan

## Parte I

suficiente solubilidad en mercurio, por ejemplo Cu, Pb, Zn, Cd, In, Au y Ag entre otros [15]; [53]; [56]; [51]. En algunos casos, no son necesarios patrones de calibrado al basarnos en la equivalencia faradaica [16].

Otros ejemplos son, por ejemplo, la detección de iones en dispersiones de nanopartícula de ZnO [14]; [57] y TiO<sub>2</sub> [58] entre otros [59]. Estos trabajos anteriores de determinación de iones en presencia de nanopartículas nos animaron a abordar la determinación de iones Ag(I) en presencia de otros ligandos o de nanopartículas de plata. No hay referencias previas del estudio de la determinación de Ag(I) libre con la técnica *AGNES*, ya que los potenciales en los que se oxidan la Ag(0) y el Hg(0) tienen valores muy próximos, lo que dificulta enormemente esta posibilidad. Si bien, lo valoramos en su momento como un reto interesante.

Como ya se ha indicado, el trabajo experimental de esta parte de la Tesis Doctoral se llevó a cabo en la Universidad de Lérida, en colaboración y bajo las directrices del Prof. Josep Galceran (grupo de investigación "*LLeida Electrochemical Group*"), que es una referencia a nivel mundial en esta técnica electroquímica. El Prof. Galcerán ha establecido las bases teóricas de las técnicas *AGNES* [54], y la influencia de aspectos experimentales como, por ejemplo, la influencia de la fuerza iónica de las disoluciones en la determinación *AGNES* de concentraciones libres de metales pesados [55], en el estudio de la labilidad de complejos de Indio(III) [44], o nuevas estrategias para reducir el tiempo de depósito en la determinación de Zn(II) [56]. También ha propuesto distintos tipos de electrodos distintos del uso convencional de gota de mercurio, por ejemplo, película de bismuto [48], electrodos serigrafiados [57], o electrodo rotatorio de película de mercurio [58].

Especialmente importantes son los estudios del grupo del Prof. Galcerán en la aplicación de los métodos *AGNES* a la especiación electroquímica de metales en el medio ambiente [59], con aplicaciones concretas en la determinación de Zn(II) en aguas de estuario [60], y la especiación de Antimonio(III) [61], o Indio(III) [62].

La determinación de la concentración de iones metálicos libres en matrices con un gran número de posibles complejantes tiene interés en estudios de especiación y bioabsorción [36], y el método *AGNES* presenta indudables ventajas frente a otros procedimientos que

se han desarrollado para la misma finalidad [57]. Si bien los electrodos selectivos de iones (*ESI*) permiten la determinación selectiva de la parte libre de muchos iones, por ejemplo, el problema principal de las técnicas potenciométricas son sus altos límites de detección, normalmente por encima de los ppm's, lo que impide determinar concentraciones de estos iones en valores habituales de ppb's en muestras de medio ambiente o de tipo clínico [60]. Por otro lado, la voltametría de redisolución presenta los menores límites de detección (la mayor sensibilidad) de las técnicas electroquímicas, sobre todo al emplearse de forma inversa en las técnicas de redisolución [61]. Sin embargo, la aplicación de la ASV no permite la determinación selectiva de los metales libres en presencia de numerosos ligandos, pues la propia medida ya altera las condiciones termodinámicas de los complejos, además de medir las concentraciones debidas a los complejos lábiles que se disocian en las condiciones de la pre-concentración electroquímica, y que se suman a la concentración del metal libre [62].

Para solventar algunas de las dificultades encontradas con la Ag(I), hemos desarrollado también un procedimiento que denominamos "*In Situ Prepared Indicator Electrode*", no descrito hasta la fecha, y que tiene ciertas similitudes con *AGNES*

De manera simultánea al desarrollo del método *AGNES*, y dadas las dificultades que ya se han mencionado, se estudió un método alternativo basado también en una situación de equilibrio, para la determinación específica de Ag(I) libre en presencia de especies complejadas de plata. El método lo hemos denominado "*In Situ Prepared Indicator Electrode*" (*ISPIE*), y básicamente consiste en la preparación *in situ* de un electrodo sólido de plata para el cálculo de la concentración de Ag(I) a través del potencial de equilibrio nernstiano del par redox Ag(I)/Ag(0). Ya se han desarrollado procedimientos *ISPIE* para otros metales, como Ni(II) y Cu(II) . Pero es la primera vez que se estudia este método para la plata.

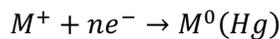
El electrodo se prepara *in situ* en una primera etapa por depósito electroquímico sobre la superficie de un electrodo inerte. En una segunda etapa, el depósito de Ag(0) se redissuelve en condiciones de equilibrio de potencial gobernado por la ecuación de Nerst para Ag(I)/Ag(0), y sin paso de corriente eléctrica. El potencial de oxidación medido es

proporcional a la concentración de Ag(I) en la disolución, lo que permite la cuantificación selectiva de iones Ag(I) una vez que se ha realizado un calibrado previo.

En este apartado se detalla el fundamento de ambos métodos, y se describe el desarrollo de ambos métodos para la cuantificación de Ag(I), mostrando las dificultades y limitaciones encontradas y su valoración en cada método.

### 1.7.1 Fundamentos básicos del método “*Absence of Gradient Nernstian Equilibrium Stripping*” (AGNES).

El método AGNES permite la cuantificación directa de la concentración de iones metálicos libres en disolución. Es un procedimiento voltamétrico de dos etapas [16]. *En la primera etapa*, el ión metálico ( $M^{n+}$ ) en disolución se reduce y se amalgama sobre el electrodo de mercurio ( $M^0$ ), aplicando un programa de potenciales predefinido, que siempre termina con un potencial de depósito  $E_1$  [16]



Si  $E_1$  es ligeramente más negativo que el potencial estándar ( $E^o$ ) del par  $M^+/M^0(Hg)$  y mantenemos este potencial  $E_1$  durante un tiempo suficientemente largo  $t_1$ , el flujo de  $M^0$  que cruza la superficie del electrodo finalmente terminará, porque se alcanza un equilibrio de potenciales Nernstiano, y la concentración de metal libre en la superficie del electrodo es igual a la concentración en el seno de la disolución ( $C_M^*$ ) (en estas condiciones no se produce gradiente de concentraciones).

Si definimos  $Y$  como la relación de concentraciones a cada lado de la superficie del electrodo (término denominado ganancia):

$$Y = \frac{C_{M0}^o}{C_M^*} \quad (\text{ecuación 3})$$

cuando se ha alcanzado el estado de equilibrio en ambos lados de la superficie del electrodo de mercurio la ecuación de Nernst se puede expresar como:

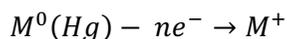
$$Y = \frac{C_{M0}^*}{C_M^*} = \exp \left[ -\frac{nF}{RT} (E_1 - E^{o'}) \right] \quad (\text{ecuación 4})$$

en donde:  $E^{o'}$  es el potencial estándar formal del par redox,  $C_{M^0}^*$  concentración de  $M^0$  dentro de la gota de mercurio, e  $Y$  es la ganancia (o factor de concentración) en concentración del metal dentro de la gota de mercurio después de la aplicación del potencial  $E_1$ . El valor de  $Y$  está relacionado directamente con el valor  $(E_1 - E^{o'})$ . Los términos  $n, F$  y  $RT$  son términos constantes en el proceso y pertenecen al número de electrones transferidos, la constante de Faraday, la constante de los gases ideales y la temperatura.

A menos que la transferencia de electrones para la pareja  $M^+/M^0(Hg)$  sea extremadamente lenta, el tiempo necesario hasta alcanzar el equilibrio nernsciano (ecuación (3)) será mucho menor que el tiempo necesario para alcanzar la condición de ausencia de gradientes de concentración. Especialmente si se usan diámetros de electrodo de gota pendiente de mercurio del orden de micrómetros.

Debido al equilibrio que se expresa en la ecuación 4, la concentración  $C_{M^0}^*$  solo depende de  $C_{M^0}^*$  y es independiente de otras características del medio, como la presencia de complejos del metal o procesos de adsorción de estos metales o de sus complejos sobre la superficie del mercurio. Todas las experiencias se llevan a cabo con altas fuerzas iónicas en las disoluciones medidas y de valor constante, para así poder trabajar con concentraciones en lugar de actividades al tener coeficientes de actividad constantes.

En la segunda etapa del AGNES, el metal preconcentrado dentro de la gota de mercurio a lo largo de la primera etapa  $M^0(Hg)$  es cuantificado. Para ello, se aplica un potencial de reoxidación  $E_2$  y se produce el proceso inverso al de la primera etapa, es decir su redisolución anódica:



La medida en esta segunda etapa puede ser la corriente faradéica ( $I_f$ ) resultante de la oxidación en condiciones de difusión limitada. El valor  $I_f$  lo determinamos experimentalmente restando a la corriente total la corriente capacitiva medida en una disolución blanco (disolución sin  $M^+$ ).

## Parte I

La principal ventaja del AGNES es que en condiciones de difusión limitada, donde  $C_{M0}^0 = 0$ , los procesos de adsorción, convección, o formación de complejos del metal no afectan a la corriente  $I_f$ . De esta forma, con la utilización de AGNES no es necesario conocer el medio en el que se encuentra la especie  $M^+$  para cuantificar su concentración como metal libre, dado que no influyen las concentraciones de los ligandos presentes, las constantes cinéticas y/o termodinámicas de formación de los complejos, los coeficientes de difusión de las distintas especies, o las características hidrodinámicas de las medidas.

Como la corriente medida esta linealmente relacionada con la  $C_{M0}^*$  y  $C_{M0}^* = Y \cdot C_M^*$ , se deduce que la concentración de iones metálicos libres es directamente proporcional a la corriente medida, con un factor de proporcionalidad ( $h$ ). Este factor depende del potencial  $E_1$  y de la geometría y difusión del electrodo de mercurio. Sin embargo,  $h$  se puede calcular experimentalmente llevando a cabo medidas de corrientes en disoluciones de concentración conocida bajo las mismas condiciones de la muestra problema (ecuación 5), es decir mediante una calibración previa [51].

$$h = \frac{I_f}{C_M^*} \quad (\text{ecuación 5})$$

En la Figura 12 se muestran dos modelos típicos de experiencias AGNES, el modelo **A** representa una medida en la que la primera etapa se lleva a cabo en un solo paso (un solo potencial) [59] y el modelo **B** una experiencia que la primera parte consta de dos etapas (programa de potenciales) [51]. El modelo B es una evolución más avanzada del modelo A, produciéndose la mayor parte del depósito antes de una electrolisis más lenta en condiciones de equilibrio y de ausencia de gradiente, para de esta forma disminuir los tiempos muchas veces elevados de la primera etapa.

Los tiempos  $t_1$  de la primera etapa suelen cumplir con las ecuaciones que se muestran en la Figura 12, pero es un parámetro experimental que ha de evaluarse y que puede variar para cada analito. Para obtener una  $Y=500$  de una disolución de Zn(II) en agua de río fue necesario un  $t_{1a}=350s$  y un  $t_{1b}=50s$  [51] mientras que para la detección simultanea de Zn(II), Cd(II) y Pb(II) se reporta un  $t_{1a}=350s$  y un  $t_{1b}=1050s$  [65]. Para mediciones de Ag(I) se utilizaron  $t_{1a}$  que variaron entre de 500s a 1000s y  $t_{1b}$  que variaron entre 50s y 500s.

El segundo paso se realiza a un potencial  $E_2$  más positivo, y las medidas en esta etapa de redisolución se pueden llevar a cabo con distintas técnicas electroquímicas, como voltametría de barrido lineal (LSV) o cronopotenciometría de redisolución (SCP), entre otras.

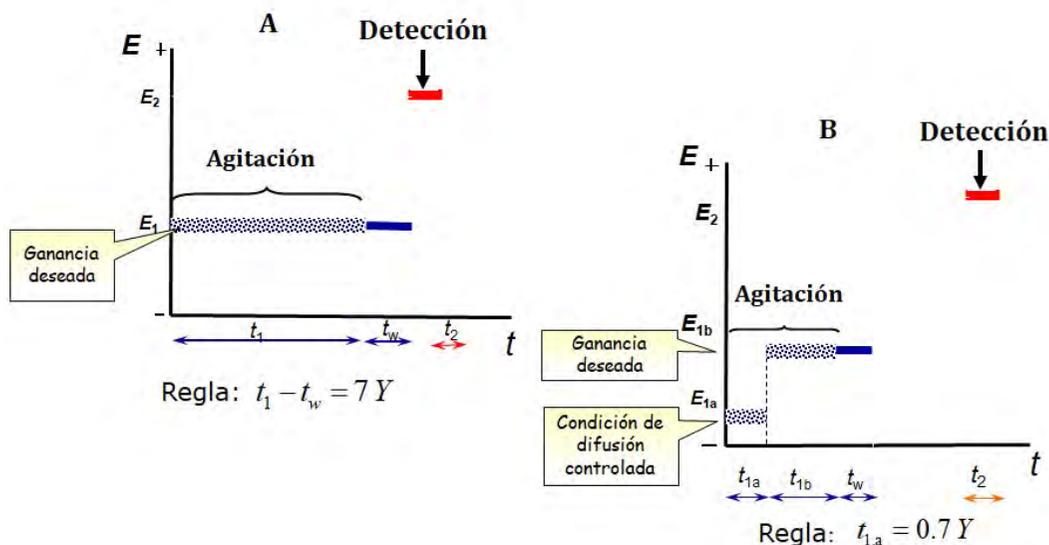


Figura 12. Fundamento del método AGNES: (A) la primera etapa se lleva a cabo en un solo paso (un solo potencial) y (B) la primera parte se lleva a cabo en dos pasos (programa de potenciales).

### 1.7.2 Aplicación del método AGNES para la determinación de Ag(I). Tipos de medida en la segunda etapa.

Una vez explicado el procedimiento AGNES convencional, muy estudiado en una amplia variedad de metales [15], dadas las dificultades de la determinación de la plata con electrodos de mercurio, se intentaron solventar con el estudio de nuevas variantes de la técnica. A estas variantes se les denominó [16]:

AGNES-I, AGNES-LSV, AGNES-Q y AGNES-SCP.

Todas ellas se basan en los mismos principios explicados en el apartado anterior, y su diferencia se encuentra en la forma como se lleva a cabo la medida en la segunda etapa de

redisolución. En todos los casos, en esta segunda etapa se elimina completamente la  $\text{Ag}^0(\text{Hg})$  amalgamada durante la primera etapa.

En cada una de las variantes *AGNES* anteriores se mide la corriente de redisolución con barrido lineal de potencial (*AGNES-LSV*), la medida de la corriente necesaria para la oxidación completa (*AGNES-I*), la cantidad de carga total con corriente aplicada constante (*AGNES-Q*), o la carga total medida por cronopotenciometría (*AGNES-SCP*).

El primer reto para la determinación de  $\text{Ag(I)}$  por *AGNES* convencional es que el potencial de oxidación de la plata y del mercurio son muy próximos, alrededor de  $E_p=+0,8\text{V}$  con respecto al electrodo normal de hidrogeno (*ENH*) y  $E_p=+0,6\text{V}$  con respecto a electrodo de referencia secundario 3M  $\text{Ag/AgCl}$ . Esto implica que la eliminación completa de  $\text{Ag}^0(\text{Hg})$  amalgamada en la gota de mercurio durante la segunda etapa lleva consigo la inevitable oxidación simultánea del mercurio. Esto no es deseable, ya que la señal con la que cuantificamos la  $\text{Ag}^0$  tendría un componente variable debido a la corriente anódica de oxidación del  $\text{Hg}^0$ .

Para superar esta dificultad, hemos desarrollado un procedimiento diferencial en una nueva variante del *AGNES* clásico, explicado a continuación. Si expresamos la ecuación de Nernst para la  $\text{Ag(I)}$  y el  $\text{Hg(II)}$  teniendo en cuenta que la actividad de  $\text{Hg}^0$  es igual a 1, obtendremos las ecuaciones 6 y 7.

$$Y_{Agj} = \frac{[\text{Ag}^0]}{[\text{Ag}^+]} = \exp \left[ -\frac{F}{RT} (E_j - E_{Ag}^{0'}) \right] \quad (\text{ecuación 6})$$

$$Y_{Hgj} = \frac{[\text{Hg}^0]}{[\text{Hg}^{2+}]} = \frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]} = \exp \left[ -\frac{2F}{RT} (E_j - E_{Hg}^{0'}) \right] \quad (\text{ecuación 7})$$

Si asumimos un valor común de potencial redox estándar y combinamos estas ecuaciones obtendremos (*ecuación 8*).

$$Y_{Hgj} \approx (Y_{Agj})^2 \quad (\text{ecuación 8})$$

Esta ecuación (*ecuación 8*) indica que cuando oxidemos cierta ganancia de  $\text{Ag(0)}$  también se oxidará una ganancia de  $\text{Hg(0)}$  incluso mayor.

$$[Hg^{2+}] = \frac{1}{Y_{Hgj}} = \frac{1}{(Y_{Agj})^2} \quad (\text{ecuación 9})$$

Por ejemplo, si queremos una ganancia de Ag de 10 000, se oxidará una cantidad de  $Hg^{2+}$  igual  $10^{-8}$  M, una concentración que no es nada despreciable (ecuación 9). Como puede observarse, el concepto más importante empleado cuando cuantificamos con la técnica AGNES no se refiere a concentraciones en sí, sino a ganancias.

Una posible alternativa pudiera ser no llevar a cabo el *vaciado* completo de la  $Ag^0$  amalgamada en el mercurio, es decir su electrolisis completa, sino un diferencial de la concentración total de la  $Ag^0$  pre-concentrada en el mercurio. Este “diferencial de carga” en esta segunda etapa será proporcional a un “diferencial de ganancia” en la misma etapa ( $Y = Y_1 - Y_2$ ). Le llamaremos a esta nueva variante *AGNES-D* o *AGNES-diferencial*.

Se realizaron experiencias *AGNES-D* sobre una disolución de  $Ag(I)$  de concentración  $1 \cdot 10^{-6}$  M. La etapa de pre-concentración se llevó a cabo en dos pasos, con ganancias  $Y_{1a}=100000$  ( $E_{1a}=-0,5154$ );  $Y_{1b}=1200$  ( $E_{1b}=-0,4586$ ). Las medidas se mantuvieron con ganancia  $Y_{1a}$  durante 500s y a una ganancia  $Y_{1b}$  durante 50-500s, variando de 50 en 50s en cada experiencia. En la segunda etapa *la* se impuso una ganancia de  $Y_2=500$  ( $E_2=-0,4473$ ). Todas las medidas se llevaron a cabo sobre una misma gota de mercurio (diámetro=0,28mm). La descripción completa de este método *AGNES-D* se explica en el apartado 1.4.7.

En la Figura 13 podemos ver, en las tres primeras experiencias ( $t_{1b}=50; 100; 150$ s), cómo se está *llenando* la gota de mercurio (se va produciendo la amalgama  $Ag^0(Hg)$ ). Las corrientes negativas durante el tiempo de espera ( $t_w$ ) indican que se producen todavía procesos de reducción. El  $t_w$  es el tiempo de transición entre la primera y la segunda etapa, y se caracteriza por no tener agitación. Se emplearon valores  $t_w=50$ s y ganancia  $Y_{1b}$ . En la cuarta experiencia ( $t_{1b}=200$ ), no parece ocurrir ningún proceso redox durante  $t_w$ , porque la corriente a lo largo de este tiempo es cero. Este hecho podría interpretarse como que la gota de mercurio está completamente *llena* (se produce la saturación de la  $Ag^0$  sobre el volumen del electrodo de gota de mercurio) lo que indica que para *llenar* en un solo paso la gota pidiendo una ganancia  $Y_{1b}$  hacen falta  $t_{1b}$  de 400s. Todos los experimentos

## Parte I

posteriores al cuarto ( $t_{1b}=200$ ; 250 hasta 500s) mostraron corrientes positivas durante  $t_w$  indicando que estaba ocurriendo un proceso de oxidación. Esto podría explicarse como el *vaciado* del electrodo, porque ya estaba *lleno* (la cantidad acumulada debido al creciente  $t_{1b}$  es mayor que el valor predeterminado para  $Y=1200$ ).

La primera parte de esta experiencia se comportó de acuerdo con lo previsto teóricamente. Al pasar a la segunda parte de redisolución (*stripping*) donde la ganancia cambia de  $Y_{1b}=1200$  a  $Y_2=500$ , el sistema no llegó al equilibrio. La caída de corriente en la etapa de redisolución fue muy lenta en estas condiciones, y no se alcanzó la corriente de valor 0 como se esperaba. Esto imposibilita la cuantificación exacta de la plata, por lo que el *AGNES-D* no es eficaz, debido también a que los tiempos de redisolución para poder producir estos valores de ganancia fueron excesivamente largos (tiende a infinito). En resumen, una vez que se ensayó en numerosas ocasiones, la conclusión es que tanto el *AGNES* clásico es aplicable a la cuantificación de la  $Ag(I)$ , pero los valores obtenidos vienen interferidos por la oxidación parcial del  $Hg^0$  simultáneamente a la oxidación de la  $Ag^0(Hg)$ . El intento de cuantificación de la  $Ag(I)$  a través de la oxidación de la  $Ag^0(Hg)$  junto a la oxidación parcial y controlada del mercurio, en el método que hemos denominado *AGNES-diferencial*, tampoco produjo buenos resultados analíticos, al no poder conseguir el *vaciado* completo de la plata en la segunda etapa de redisolución. Además, el método diferencial no resultó eficaz debido a que el proceso de relajamiento hacia el equilibrio es extremadamente lento, un tiempo del tiende a infinito.

Se ensayaron otras variables al objeto de intentar superar estas dificultades, como fueron el utilizar agitación (convección) durante la segunda etapa, para mejorar la eficiencia en la oxidación de la  $Ag^0$ , o utilizar materiales del electrodo de trabajo distintos al mercurio.

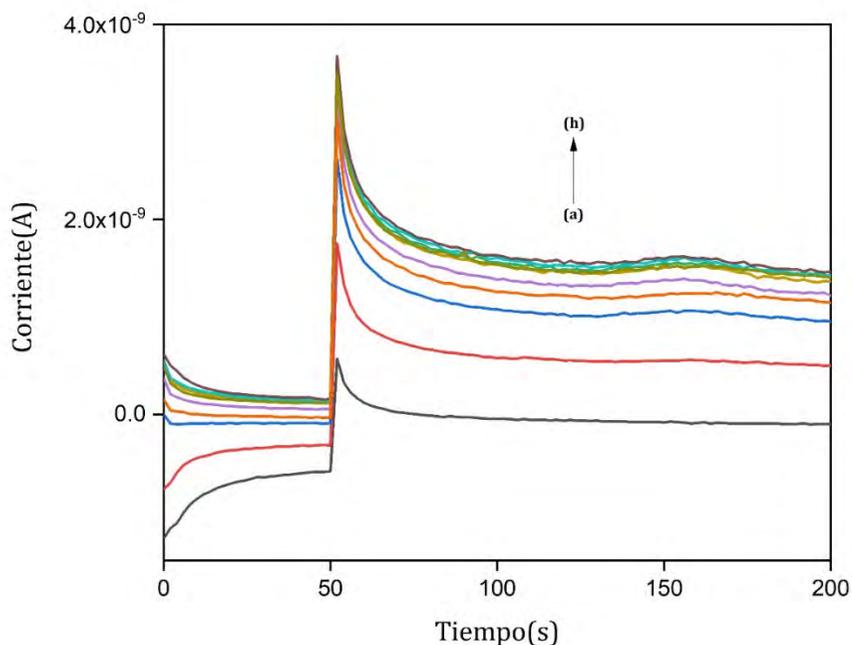
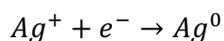


Figura 13. Experiencia AGNES-D de una disolución de Ag(I) de  $10^{-6}$  M.  $E_{1a} = -0,5154V$  ( $t_{1a} = 500s$ ),  $E_{1b} = -0,454586V$  ( $t_{1b} = 50-500$ ) y  $E_2 = -0,4473V$  ( $Y_2 = 500$ ).

### 1.8 Fundamento teórico del procedimiento “*In Situ Prepared Indicator Electrode*”.

El procedimiento “*In Situ Prepared Indicator Electrode*” (*ISPIE*) fue una propuesta del profesor Josep Galceran, catedrático de la Universidad de Lérida y director del grupo de investigación “*Lleida Electrochemical Group*”. Este nuevo método tuvo el objetivo de superar y dar respuesta a las dificultades de los métodos *AGNES* aplicados a la cuantificación de Ag(I).

El método *ISPIE* se basa en el cumplimiento de la ecuación de Nernst para un par redox en el que una de las especies es un sólido. En el caso de la plata:



## Parte I

Para una concentración dada de Ag(I) en equilibrio, y teniendo en cuenta la actividad 1 de la Ag<sup>0</sup> sólida, podemos poner la ecuación de Nernst aplicada a este sistema en la forma siguiente para calcular la concentración de Ag(I):

$$[Ag^+] = \exp \left[ \frac{F}{RT} (E_{nulo} - E_{Ag}^{0'}) \right] \quad (\text{ecuación 10})$$

La Ag(I) será la concentración a determinar en el seno de la disolución y la Ag(0) se generará por electrodeposición en la superficie de un electrodo "inerte" como puede ser un electrodo de carbón vítreo (GC). La ecuación se puede escribir en términos de un potencial  $E_j$  nulo ( $E_{nulo}$ ), el subíndice nulo significa que es el potencial al cual no existe corriente faradaica debido al estado de equilibrio. Siendo  $E^{0'}$  el potencial estándar formal del par redox Ag(I)/Ag(0) y  $F, R, T$  constantes conocidas. La idea importante de este método propuesto es que determinando el valor de  $E_{nulo}$  podremos calcular mediante *ecuación 10* la concentración de Ag(I) libre en la disolución. Cuanto más exacta sea la determinación de  $E_{nulo}$ , la concentración de plata la cuantificaremos con mayor exactitud.

La corriente faradaica se puede estimar con un modelo simple de difusión hacia y desde el seno de la disolución cuya concentración se restablece a una cierta distancia  $\delta$  de la superficie del electrodo (Ag(0)) y suponiendo un proceso reversible con una alta velocidad de transferencia de carga. Esta corriente, conociendo el área del electrodo y los coeficientes de difusión, tendrá un valor:

$$I = - \frac{FD_{Ag(I)} \left( [Ag(I)] - \exp \left[ \frac{F}{RT} (E_{nulo} - E_{Ag}^{0'}) \right] \right)}{\delta} A \quad (\text{ecuación 11})$$

Teniendo en cuenta la *ecuación 11*, la variación de  $I_f$  con respecto al potencial tendría una representación gráfica ideal como la que se muestra en la Figura 14. En este modelo a potenciales menores que  $E_{nulo}$  se obtiene una corriente negativa debida a la reducción de la plata sobre la superficie del electrodo. En el valor  $E_{nulo}$  la corriente  $I_f=0$ , indicando en este punto que el sistema se encuentra en equilibrio. El valor  $E_{nulo}$  en estas condiciones nos permite por lo tanto calcular la concentración de Ag(I) en la disolución. A potenciales mayores que  $E_{nulo}$  las corrientes son positivas, debido a que se está produciéndose la oxidación de la Ag<sup>0</sup>. Para determinar  $E_{nulo}$  con exactitud es necesario utilizar en la segunda etapa un método donde el potencial varíe lentamente. En la determinación de la Ag(I) se

utilizaron dos métodos: a) una voltametría lineal donde el potencial varía a razón de  $0,1\text{mV s}^{-1}$  y b) una voltametría donde el potencial varía en pulsos sucesivos de  $20\text{mV}$  de diferencia

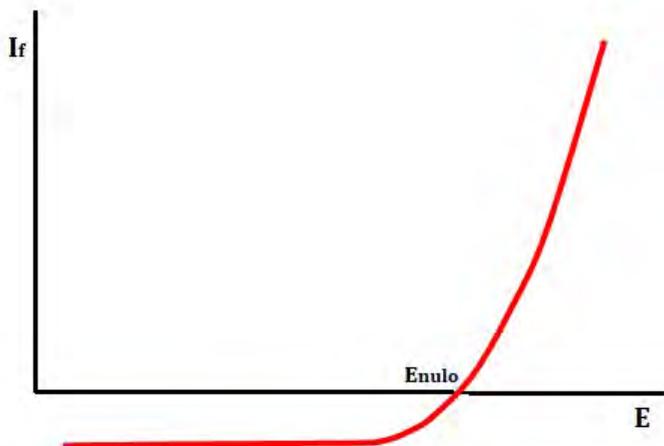


Figura 14. Representación gráfica del modelo teórico ISPIE de la variación de la corriente en función del potencial (ecuación 11).

En la práctica, en voltametría siempre existe una pequeña corriente residual, fundamentalmente de tipo capacitativo, aunque también por otras causas como corriente faradaica debida a impurezas (por ejemplo, ultratrazas de oxígeno no eliminado completamente o debida al movimiento de iones presentes en las muestras o en la matriz. Por lo que  $I_f$  debe de medirse en referencia a las corrientes de una disolución blanco, y en unas condiciones de estado superficial del electrodo que sean constantes. En esta situación, el valor  $E_{nulo}$  de la muestra analizada puede calcularse de forma reproducible con respecto al potencial de cruce debido a una corriente de base tomada como referencia. Otra posibilidad de medida reproducible es la de definir un  $E_{nulo}$  correspondiente a una concentración conocida de  $\text{Ag(I)}$  ( $E_{nulo \text{ de calib}}$ ), a modo de calibrado, incluso en presencia de la matriz del problema, que nos sirviera de referencia para la cuantificación de  $\text{Ag(I)}$  en el mismo tipo de muestra medida bajo las mismas condiciones experimentales.

En los dos siguientes apartados se demuestra bajo de un punto de vista práctico la determinación ISPIE de  $\text{Ag(I)}$  bajo las premisas teóricas anteriores. En el primero se utilizó

un barrido lineal de potenciales en un intervalo que permita ver un cambio desde la reducción de la plata a su oxidación, para obtener el valor  $E_{nulo}$ . En el segundo nos basaremos en un aumento lento del potencial a través de impulsos desde una línea de base, que permita ver con precisión el potencial en el que empieza a producirse una corriente positiva (desde un valor negativo) debida a la oxidación de la Ag.

### 1.8.1 Aplicación práctica del método “in situ prepared indicator electrode” (ISPIE) a la determinación de Ag(I).

El barrido voltamétrico lineal (LSV) en la segunda etapa del ISPIE para determinar el  $E_{nulo}$  se llevó a cabo con un electrodo rotatorio de disco carbono (RDE-GCE), con una velocidad de rotación de 400rpm, un barrido de potenciales desde +0,1V a +0,65V, y después de un depósito de Ag0 con  $E_e=+0,1V$  y  $t_e=200s$ . La velocidad de barrido de potencial fue muy lenta  $v=0,1mV s^{-1}$  para determinar el  $E_{nulo}$  con mayor exactitud, y el incremento del potencial de paso de 2,44 mV).

Con estas condiciones de medida se registró una disolución blanco, electrolito soporte,  $KNO_3$  0,1M sin Ag(I). Después de esta medida se añadió Ag(I) a la disolución blanco hasta alcanzar una concentración  $8,75 \cdot 10^{-6}M$ , y se volvió a medir por triplicado ( $n=3$ ). A continuación, se aumentó de la misma manera la concentración de plata a  $7 \cdot 10^{-5}M$ , y se volvió a medir por triplicado. La figura Figura 15 muestra los resultados, voltamperogramas del blanco (a), y de las réplicas de las disoluciones que contenían Ag(I)  $8,75 \cdot 10^{-6}M$  (b) y  $7 \cdot 10^{-5}M$  de Ag(I) (c).

En el voltamperograma (a) del blanco se observa una diferencia del valor residual por debajo de 2nA, pero mayor a cero. En los voltamperogramas (b) y (c), se observó un valor  $E_{nulo}=0,426V$  ((potencial de cruce). Los voltamperogramas (d) y (e) pertenecen a dos de las réplicas de la muestra  $8 \cdot 10^{-5}M$  de plata, con  $E_{nulo}=0,438V$ . Para facilitar su visión a, algunas gráficas no se representan en la Figura 15.

Estos resultados nos muestran el comportamiento esperado, con un desplazamiento del valor de  $E_{nulo}$  hacia mayores potenciales al aumentar la concentración de Ag(I) en la disolución. Sin embargo, la diferencia entre los valores  $E_{nulo}$  fue de 12mV, distinto al valor

teórico que para las concentraciones indicadas es de 20mV, lo que significa que es preciso mejorar experimentalmente la exactitud y la precisión de este procedimiento.

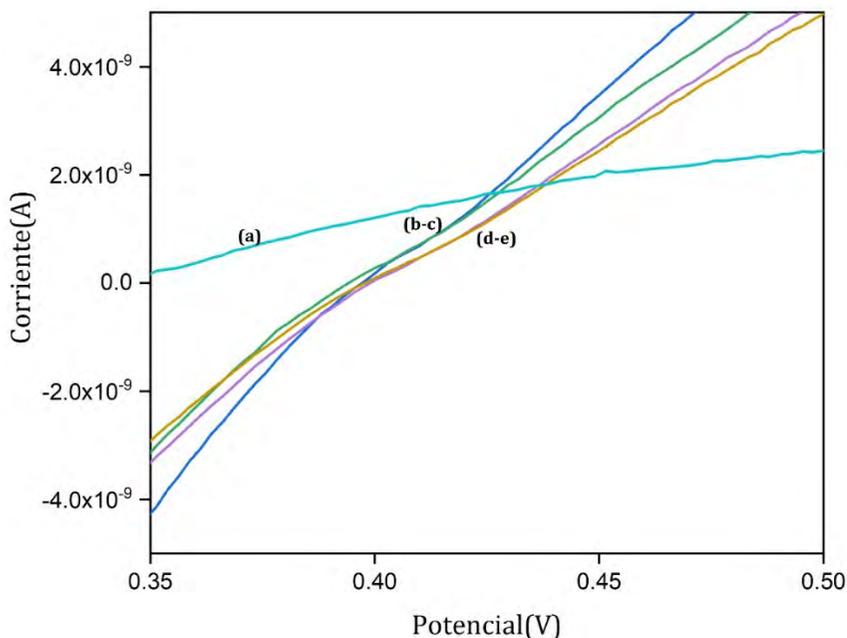


Figura 15. Barridos LSV en el procedimiento ISPIE: (a) electrolito de soporte  $\text{KNO}_3$  0,1M (azul claro); (b, c) disoluciones  $\text{Ag(I)}$   $0,875 \cdot 10^{-6}$  M (azul oscuro y verde); (d, e) disolución  $\text{Ag(I)}$   $7 \cdot 10^{-5}$  M (violeta y amarillo).  $E_i=+0,1\text{V}$ ;  $E_f=+0,65\text{V}$ ;  $v_{bp}=0,1\text{mV s}^{-1}$ ,  $\Delta E=0,1\text{mV}$ ;  $E_e=0,1\text{V}$  y  $t_e=200\text{s}$ .

Se ensayó una forma de mejorar la medida de  $E_{nulo}$  (exactitud, precisión) sustituyendo el barrido lineal LSV por un aumento realizado con impulsos crecientes del potencial. En la primera etapa se aplicó  $E_e=0,1\text{V}$  durante  $t_e=800\text{s}$  con agitación de 400rpm. En la segunda etapa el potencial varió entre 360mV y 740mV con saltos de potencial de 20mV y duración de 30s. La Figura 16 muestra esquemáticamente la variación cronoamperométrica de potencial. En estas condiciones, se midieron disolución blanco de electrolito soporte y dos concentraciones de  $\text{Ag(I)}$   $5 \cdot 10^{-7}$  y  $6 \cdot 10^{-6}$  M, a  $\text{pH}=5,3$ .

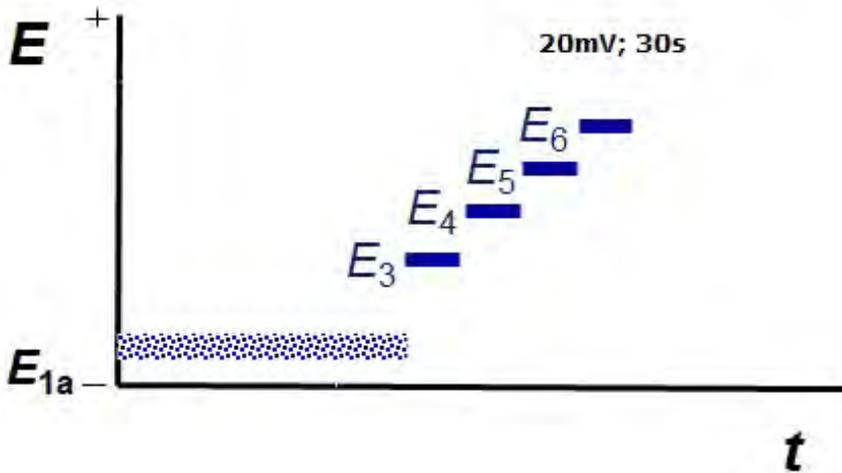


Figura 16. Variación de potencial por saltos de 20mV en un tiempo de 30s, empleados en el segundo método ISPIE para el cálculo de  $E_{nulo}$ .

La forma de los voltagramas (Figura 17) tienden a parecerse a la suma de pequeños cronoamperogramas, con un aumento de la corriente máxima y posterior disminución con una función  $t^{-1/2}$  (comportamiento definido por la ecuación de Cottrell). Se representan en la figura los voltagramas (a) disolución blanco ( $KNO_3$  0,1M, electrolito soporte); (b)  $[Ag(I)]=5 \cdot 10^{-7}M$ ; y (c)  $[Ag(I)]=6 \cdot 10^{-6}M$ . La gráfica en color rojo muestra el cruce de la señal con el voltamperograma del blanco, cumpliéndose un desplazamiento del  $E_{nulo}$  hacia potenciales más positivos al aumentar la concentración de  $Ag(I)$ .

El cruce de la disolución (c) ( $[Ag(I)]=6 \cdot 10^{-6}M$ ) ocurre tres saltos después del cruce de la disolución (b) ( $[Ag(I)]=5 \cdot 10^{-7}M$ , aumentando el potencial en 20mV. La diferencia de los potenciales de cruce de las disoluciones de  $Ag(I)$  de  $5 \cdot 10^{-7}$  y  $6 \cdot 10^{-6}M$  fue entonces de 60mV. El valor teórico de la diferencia de los  $E_{nulo}$  entre estas concentraciones es de 58mV. La diferencia entre el valor teórico y el experimental es de 2mV, es una diferencia menor que la del método  $LSV$ , por lo que esta variación de la medida ha mejorado considerablemente la exactitud de la determinación cuantitativa de  $Ag(I)$ .

## Parte II

Una vez que el método *ISPIE* demuestra una gran potencialidad en la medida de la concentración selectiva de  $\text{Ag(I)}$ , desde nuestro punto de vista aún requiere de más trabajo futuro. Por ejemplo, aplicando impulsos de potencial menores durante menores tiempos, para disminuir la corriente capacitativa en cada salto y facilitar la medida mejorando su reproducibilidad. Otra opción interesante de trabajo futuro es la disminución del tamaño del electrodo, o incluso la posible utilización de microelectrodos, que mejoran drásticamente la corriente de tipo capacitativo y la relación de corrientes señal/ruido de fondo. Finalmente, otra línea de trabajo interesante sería la de desarrollar procedimientos matemáticos que compensaran y discriminaran entre la corriente faradaica y capacitativa, dado que en función del tiempo de aplicar el potencial mientras  $i_c$  (corriente capacitativa) disminuye exponencialmente ( $i_c \sim K \cdot e^{-t}$ ), la corriente faradaica disminuye más lentamente ( $i_F = K \cdot t^{-1/2}$ ). Lo que permite procedimientos diferenciales que lleven a cabo un cálculo más preciso y exacto de  $E_{nulo}$ .

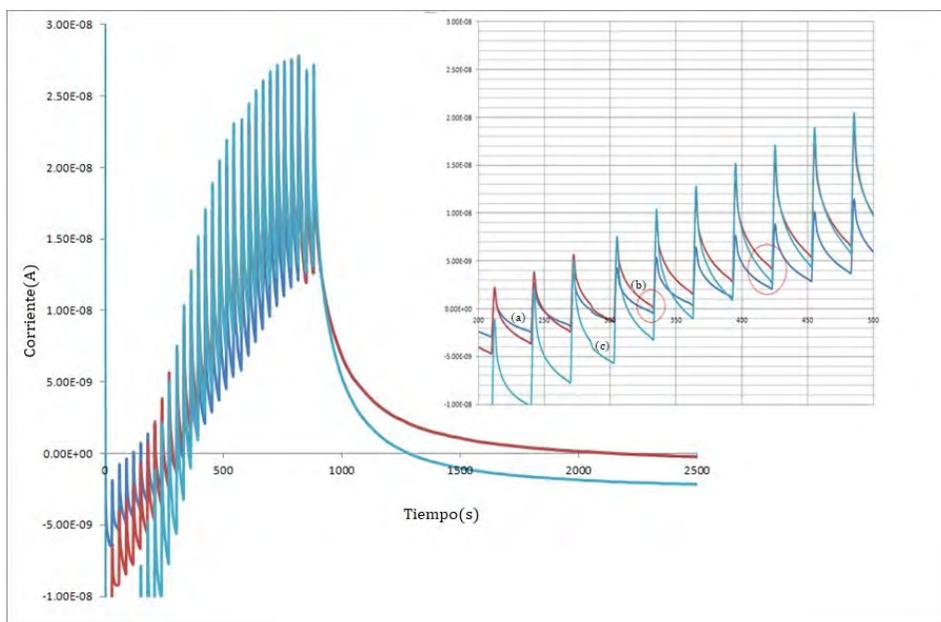


Figura 17. Voltamperogramas de (a)  $\text{Ag(I)}$   $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  (rojo), (b)  $\text{Ag(I)}$   $6 \cdot 10^{-6} \text{M}$  (azul claro) y (c) supporting electrolyte (azul oscuro).  $E_e=0,1\text{V}$ ;  $t_e=800\text{s}$ .  $E_i=0,16\text{V}$ ;  $E_r=0,74\text{V}$ ; saltos=20mV. Tiempo de saltos 30s.

## Conclusiones

- Se ha desarrollado y validado un procedimiento voltamétrico de redisolución de onda cuadrada que permite la determinación selectiva de Ag(I) en presencia de nanopartículas de plata.
- Este método se ha empleado con veracidad en la cuantificación de Ag(I) y de Ag<sub>total</sub> en muestras comerciales de plata coloidal. Este método requiere un mínimo de preparación de muestra, y permite medir concentraciones muy pequeñas (LOD=1,3ng m L<sup>-1</sup>)
- Al objeto de su aplicación en la parte III sobre la interacción de iones Ag(I) con antibióticos, se desarrolla un procedimiento voltamétrico directo diferencial de pulsos sobre electrodos metálicos de platino (PtE). Su sensibilidad es suficiente para medir de forma rápida (sin preconcentración sobre el electrodo) concentraciones muy pequeñas debidas a la disociación de complejos (antibióticos, parte III) (LOD=100ng m L<sup>-1</sup>).
- Por primera vez se ha abordado la determinación de Ag(I) libre (no complejada) por el método AGNES sobre electrodo de mercurio. Las dificultades en la oxidación separada de la plata y el mercurio nos impulsaron a desarrollar un nuevo método que hemos denominado AGNES-D (diferencial), en el que se asume esta situación y se proponen procedimientos para la eliminación de las señales concurrentes debidas al mercurio (tiempos de relajación largos).
- De forma adicional al AGNES, se han propuesto nuevas bases teóricas y el desarrollo de un nuevo método electroquímico que hemos denominado ISPIE, que permite determinar la concentración de Ag(I) libre en presencia de otras especies de plata. Esta técnica se basa en la formación de un electrodo de plata in-situ, y tiene un fundamento basado en un equilibrio termodinámico nernstiano.

## Parte. II

---

## II. Nuevos procedimientos voltamétricos para la caracterización de tamaño de nanopartículas de plata en presencia de plata iónica. Comparación con otras técnicas instrumentales.

### 2.1 Introducción y objetivos

El rápido aumento en el uso de los nanomateriales y de las AgNPs en particular ha creado gran conciencia sobre su potencialidad contaminante y de toxicidad, lo que ha llevado al desarrollo de normativas mucho más estrictas y al desarrollo de metodología analítica que dé respuesta a este problema.

Para este control no solamente es muy importante la cuantificación de las AgNPs, sino también la caracterización de su tamaño, por su influencia en su transporte en el medio ambiente y sobre todo en su toxicidad. La biotoxicidad de las AgNPs depende principalmente tanto del número de nanopartículas como del tamaño de las mismas [2]; [71].

El tamaño de las AgNPs puede determinarse con técnicas analíticas con gran aplicabilidad en caracterización del tamaño de nanomateriales, como la microscopía electrónica de barrido/transmisión (*FESEM/TEM*) [6]; [72], la dispersión dinámica de la luz (*DLS*) [73] y la difracción de rayos X (*XRD*) [74]. Recientemente, en el laboratorio de nuestro grupo de investigación se han utilizado técnicas de separación muy potentes en combinación con plasma de acoplamiento inductivo espectrometría de masas (*ICP-MS*) [8]; [3] como son: el fraccionamiento de flujo de campo (*FFF*) [75] y la cromatografía hidrodinámica (*HDC*) [6]. La metodología de detección de nanopartículas individuales (*single particle*) por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (*SP-ICP-MS*) [76] también ha demostrado ser una herramienta muy útil e importante para la detección de AgNPs, dando información cuantitativa y de polidispersidad. Sin embargo, el uso del *SP-ICP-MS* tiene limitaciones en los límites de detección del tamaño o concentraciones de AgNPs cuando en las mismas disoluciones hay un alto contenido en plata iónica  $\text{Ag(I)}$  [70]. En este sentido, las técnicas electroanalíticas pueden aportar información analítica complementaria muy interesante [77].

Principalmente se han utilizado tres tipos de métodos electroanalíticos para la caracterización de AgNPs. Los basados en sensores electroquímicos [77], las voltametrías de partículas inmovilizadas (*VIP*) [6] y la coulombimetría de colisión de partículas (*PCC*) [1].

Los sensores electroquímicos se basan en ligandos que se unen selectivamente a las AgNPs. Si bien en la bibliografía no hay muchas referencias al respecto, se trata de dispositivos sencillos que permiten una detección rápida y cuantificación sencilla [77]. Algunos de los ligandos empleados incluyen sobre todo la cisteína (en los llamados *sticky electrodes*), y otros como la 8-mercaptoquinolina [80]. Con frecuencia se emplean electrodos de carbón vítreo por su versatilidad, o electrodos metálicos (Au, Pt) junto a monocapas autoensambladas de tioles (*SAMs*) como procedimientos de inmovilización de los ligandos, basados normalmente en grupos funcionales de tipo tiol, amino o carboxilo.

Sin embargo, la mayoría de estos ligandos tienen afinidad por los iones Ag(I), compitiendo con los sitios activos del sensor, comprometiendo la precisión de la determinación [11]. En algunos casos, también se obtiene con este tipo de sensores información sobre el diámetro de las AgNPs, al producirse una vez retenidas selectivamente su redisolución voltamétrica a distintos potenciales según su tamaño [77].

La voltametría de partículas inmovilizadas (*VIP*) es otra aproximación sencilla para el estudio voltamétrico de nanopartículas [81]. Esta técnica implica el depósito de un microvolumen de muestra sobre la superficie del electrodo, seguido de su oxidación con un barrido de potenciales anódico (normalmente escalonado o impulsional) [12]. Los voltagramas de redisolución permiten la detección de las AgNPs (en un determinado potencial de pico), su cuantificación y una evaluación de su tamaño, al influir en la energía potencial necesaria para su oxidación (es decir, en el valor de  $E_p$ ); [82]. En principio esta técnica permite la cuantificación de las AgNPs y los resultados no se ven interferidos por la presencia de iones Ag(I) [82].

La coulombimetría de colisión de partículas (*PCC*) es también una técnica muy empleada y una línea de investigación con un trabajo muy intenso en la actualidad. Inicialmente desarrollada por el grupo de investigación de A. J. Bard [83], el grupo de investigación del Prof. R.G. Compton ha aportado una buena parte de sus aspectos teóricos en numerosos

artículos [12]; [84]; [85]. Esta técnica se basa en el movimiento Browniano de las nanopartículas de plata en disoluciones muy diluídas. Este movimiento estocástico produce picos transitorios de corriente cuando colisionan con un electrodo de trabajo polarizado a un potencial anódico suficiente para producir la oxidación completa de estas nanopartículas. A partir de la medida de la cantidad de carga total  $Q$  empleada en la oxidación completa de las AgNPs, puede calcularse faradaicamente el diámetro de las AgNPs, asumiendo que son esféricas. La frecuencia del impacto también depende de la concentración, lo que permite la cuantificación de las AgNPs [85]. La PCC permite de esta manera la detección de nanopartículas individuales de plata, y proporciona información analítica sobre su diámetro (distribuciones de tamaño), concentración numérica, agregación o aglomeración de las AgNPs, y coeficientes de difusión [86]

Ambas técnicas *VIP* y *PCC* se han empleado sobre todo desde un punto de vista teórico para la caracterización de AgNPs en muestras dopadas. Sin embargo, en escasas ocasiones se han empleado con una finalidad analítica para la caracterización y cuantificación de AgNPs en muestras reales, siendo éste uno de los principales objetivos de nuestro trabajo descrito en esta parte de la memoria de Tesis Doctoral.

La PCC es una técnica de detección individual de nanopartículas, similar a la detección de nanopartículas individuales por espectrometría de masas acoplado a plasma inductivamente (*SP-ICP-MS*). Ambas llevan a cabo la detección rápida de nanopartículas, del orden de cientos de partículas por minuto, proporcionando información complementaria sobre el tamaño y concentraciones de estas nanopartículas [82]. La PCC no se ve influenciada por la presencia de iones  $Ag(I)$  en la misma disolución que las AgNPs (muy frecuentemente en muestras reales en concentraciones elevadas), por ejemplo, con respecto a la interferencia que producen en las medidas con la técnica *SP-ICP-MS*, limitando la caracterización de pequeños diámetros. Por otro lado, en PCC se obtienen mejores medidas cuanto menor sean los diámetros de las AgNPs medidas, pues se produce más fácilmente su oxidación completa y es más precisa la caracterización de los tamaños de las AgNPs, a diferencia que la *SP-ICP-MS* en donde las medidas son más reproducibles con diámetros grandes de AgNPs. Por lo que ambas técnicas proporcionan información

analítica complementaria, obtenida con mecanismos distintos y por lo tanto con distintas aplicaciones y ventajas o inconvenientes.

En este capítulo nos planteamos los siguientes **objetivos** trabajando con las técnicas anteriores.

- Aplicar la *VIP* para la detección, caracterización del tamaño y cuantificación de AgNPs en productos de consumo.
- Determinar la influencia de la modificación de electrodo de trabajo (Nafion) en la cuantificación de las AgNPs por *VIP*.
- Aplicar analítica de la *PCC* para la detección, caracterización del tamaño y cuantificación de AgNPs en productos de consumo
- Determinar la influencia del procesamiento matemático de los resultados en las distribuciones de tamaño obtenidas por *PCC*.
- Comparar los resultados de la caracterización de las muestras por *VIP* y *PCC* con las técnicas *SP-ICP-MS* y microscopía electrónica *FESEM/TEM*.

## 2.2 Procedimientos experimentales

### 2.2.1 Caracterización y determinación de tamaño de nanopartículas de plata por voltimetría de partículas inmovilizadas.

Los estándares de AgNPs (diámetros nominales 20, 40, 50, 100 nm) y las muestras problema se diluyeron en electrolito soporte ( $\text{NaClO}_4$  0,02M) hasta una concentración del orden de  $0,5\text{mg L}^{-1}$ . Todas las dispersiones de AgNPs se homogeneizaron en baño de ultrasonidos durante 20s antes de su uso.

Las medidas voltamétricas se llevaron a cabo con un sistema de tres electrodos, empleando un electrodo de carbono vítreo (*GCE*, diámetro 3,0mm) como electrodo de trabajo, *Ag/AgCl* como electrodo de referencia, y un electrodo de hilo de Pt como auxiliar. El *GCE* se modificó depositando  $3\mu\text{L}$  de las disoluciones a medir sobre el electrodo de

trabajo, secando posteriormente con la ayuda de una pequeña corriente de nitrógeno. Las disoluciones empleadas se desoxigenaron previamente con el paso de corriente de nitrógeno durante 5min aproximadamente. El electrodo *GCE* se pulió antes de cada uso con alúmina de 3 $\mu$ m de diámetro sobre papel de fieltro, se lavó con agua MQ y se eliminaron restos de alúmina sólida con ultrasonidos.

Se utilizó un potenciostato PGSTAT-10 (Metrohm Autolab BV, Utrecht, Países Bajos, [www.metrohm-autolab.com](http://www.metrohm-autolab.com)) y se empleó un barrido voltamétrico de potenciales de onda cuadrada (SWV), entre un potencial  $E_i=0$  y  $E_f=+0,5V$ , con unas condiciones instrumentales  $f=25Hz$ ,  $\Delta E_s=1,95mV$ ,  $\Delta E_p=20mV$  ( $v_{bp}=39mV s^{-1}$ ). Las medidas voltamétricas se trataron con el software NOVA (Autolab) y OriginPro v.8.1.

### 2.2.2 Determinación y caracterización de tamaño de nanopartículas de plata por cronoculombimetría de colisión de partículas.

Las muestras y los estándares de AgNPs (diámetros nominales 10, 40, 60 y 100nm) se diluyeron con electrolito de soporte ( $NaClO_4$  0,02M) hasta una concentración de aproximadamente 25ng L<sup>-1</sup>. Todas las suspensiones de AgNPs se homogeneizaron con ultrasónicas durante 20s antes de diluirse o medirse. Para las medidas cronoculombimétricas, se aplicó un potencial inicial de equilibrio de +0,05V durante 5s y posteriormente un potencial anódico de medida  $E_e=+0,70V$  durante 10s. Las medidas de corriente a este potencial se tomaron cada 2,5ms, la máxima resolución que permite el módulo de baja corriente ECD.

Se empleó un potenciostato PGSTAT-10 (Metrohm Autolab BV, Utrecht, Países Bajos, [www.metrohm-autolab.com](http://www.metrohm-autolab.com)) equipado con un módulo de amplificación baja corriente (ECD), dos intervalos de corrientes de 1nA y 100pA con resoluciones de corriente mínima de 30fA y 0,3fA respectivamente y un filtro *Sallen-Key* de tercer orden para integrado con tres constantes de tiempo L que ayudan a filtrar el ruido electrónico.

Para reducir el ruido, la celda voltamétrica con los tres electrodos se protegieron dentro de una caja de Faraday, y los cables de conexión se apantallaron con papel de aluminio. Para evitar ruido de fondo, procesos de adsorción, y una óptima relación S/N, en este tipo de medidas se emplearon microelectrodos de fibra de carbono (diámetro 11 $\pm$ 2 $\mu$ m) junto a

electrodo de referencia Ag/AgCl y auxiliar hilo de Pt (BASi, BioAnalytical systems, www.basinc.com). El control del potencióstato se realizó con el software NOVA v.2.1 (Metrohm). Todos los experimentos se realizaron a una temperatura  $20 \pm 3$  °C.

El microelectrodo de fibra de carbono se pulió de igual forma a los electrodos de tamaño convencional, empleando alúmina de  $3 \mu\text{m}$  de diámetro. Todos los recipientes y materiales de vidrio empleados se mantuvieron al menos 12h con *agua regia* ( $\text{HCl} + \text{HNO}_3$  3+1 (v/v)) para garantizar la eliminación completa de la plata, y las disoluciones se desoxigenaron con corriente de nitrógeno durante aproximadamente 60s antes de cada medida.

### 2.2.3 Caracterización del tamaño de nanopartículas de plata con SP-ICP-MS

Los estándares de AgNPs se prepararon pesando sus alícuotas en balanza de precisión y diluyendo con agua MQ. Las suspensiones empleadas se homogeneizaron en baño de ultrasonidos durante 1min antes de emplearse. Partiendo inicialmente de las concentraciones espedificadas por el fabricante, las muestras llamadas *Biovedik*<sup>™</sup> y *High Stability*<sup>™</sup> se diluyeron a una concentración de plata de  $40 \text{ng L}^{-1}$  aproximadamente, y *Wellness*<sup>™</sup> se diluyó aproximadamente a una concentración de  $200 \text{ng L}^{-1}$  AgNPs

Se usó un espectrómetro de masas Perkin-Elmer NexION 2000B ICP (Toronto, Canadá) para las medidas de SP-ICP-MS. El sistema de introducción de muestra consistió en un nebulizador concéntrico de vidrio y una cámara de pulverización ciclónica desconcertada.

Para la determinación de las concentraciones de plata total y plata iónica en las muestras, se empleó también espectrometría de absorción atómica. Se usó un espectrómetro de absorción atómica de llama (F-AAS) Analyst 200 (Perkin Elmer, Toronto, Canadá), equipado con una lámpara de cátodo hueco de plata (corriente de operación 2mA, longitud de onda de  $328,1 \text{nm}$ ), para la determinación de plata total. Las concentraciones de Ag(I) se midieron con AAS una vez que las muestras se ultrafiltraron para su separación de las AgNPs (tamaño de poro 3kDa). Por diferencia entre ambas concentraciones, se calcularon las concentraciones de AgNPs.

#### 2.2.4 Caracterización del tamaño de nanopartículas de plata con microscopía electrónica.

Los resultados de los procedimientos electroquímicos que hemos desarrollado en este trabajo se compararon con las medidas de tamaño de las AgNPs con microscopía electrónica de transmisión (*TEM*) y microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (*FESEM*). Las muestras se prepararon depositando 20µL de las suspensiones coloidales sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono, dejando secar a temperatura ambiente. Previamente, estas suspensiones se homogeneizaron durante 1min en baño de ultrasonidos.

Se obtuvieron distribuciones de tamaño de las nanopartículas empleando simultáneamente imágenes de electrones secundarios *TEM* y *FESEM*. Los tamaños promedio y las desviaciones estándar se calcularon midiendo más de 150 nanopartículas en regiones aleatorias de las imágenes. El análisis de la imagen y las determinaciones de tamaño se llevaron a cabo utilizando el software ImageJ (versión 1.52).

Las medidas *TEM* se llevaron a cabo utilizando un sistema *TEM* (Modelo 2000 FXII, JEOL, Tokio, Japón), junto con espectrometría de rayos X de dispersión de energía (EDS) equipado con difracción de electrones, a 200kV. La microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (*FESEM*) y el análisis EDS se realizaron con un Merlin™ *FESEM* equipado con una columna Gemini (ambas Carl Zeiss Nano Technology Systems, Jena, Alemania, [www.imaging-git.com](http://www.imaging-git.com)), y se combinaron con un Microanalizador de rayos X X-Max (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido, [www.oxinst.com](http://www.oxinst.com)). Las imágenes *FESEM* se grabaron trabajando a 5kV con el detector de electrones secundario en la lente, para mejorar la resolución, y los análisis EDS se llevaron a cabo a 10kV

## Resultados y Discusión

### 2.3 Voltametría de partículas inmovilizadas para la caracterización de nanopartículas de plata.

Las medidas *VIP* constan básicamente de dos etapas, de forma similar a la voltametría de redisolución. En la primera etapa se lleva a cabo el depósito de las AgNPs sobre la superficie del electrodo de trabajo, y en la segunda etapa la oxidación de las partículas inmovilizadas [1].

La inmovilización de las AgNPs en *VIP* puede realizarse mediante interacciones electrostáticas [87], reacciones químicas [88] o por simple depósito y secado de un microvolumen de la muestra sobre el electrodo. Esta última es la forma más utilizada, al ser la más simple y rápida, y requerir la mínima manipulación de la muestra. Típicamente se depositan unos pocos microlitros de la muestra sobre el electrodo y se dejan secar, preferiblemente bajo un flujo de gas inerte ( $N_2$ ) con una lenta velocidad de secado para evitar la aglomeración de las AgNPs [6].

El electrodo modificado se transfiere a una celda electroanalítica que contiene un electrolito soporte y se realiza un barrido de potencial que permita la oxidación de las AgNPs. El potencial de oxidación de una AgNPs aislada es menor que el potencial estándar redox de la  $Ag(0)$  y depende del radio y de la energía superficial de la nanopartícula [89].

Las interacciones superficiales entre el material del electrodo y la nanopartícula afectan el potencial de oxidación, cambiando su valor de acuerdo con la energía libre de *Gibbs* de la superficie [12]. En consecuencia, se puede establecer un rango de potenciales para cada composición de nanopartículas que se pueden usar para su identificación.

Para una modificación de la superficie del electrodo lo suficientemente delgada, se puede establecer una relación lineal entre el logaritmo del diámetro de la nanopartícula ( $d_p$ ) y el  $E_p$ , que permita la medida correcta del tamaño de las AgNPs [6]. Por otro lado, el área debajo del pico voltamétrico representa la cantidad de AgNPs oxidadas durante el proceso electroquímico, y podría usarse para obtener información cuantitativa.

El recubrimiento de la superficie AgNPs es otro factor que debe tenerse en cuenta para explicar los voltogramas de oxidación de las AgNPs. Se debe considerar la difusión de los productos de oxidación lejos de la nanopartícula, ya que afecta el potencial máximo en el límite reversible. Si las partículas están demasiado cerca, entonces las capas de difusión de las nanopartículas vecinas se superponen y esto afecta la posición del pico de oxidación correspondiente que se desplaza hacia valores más positivos de potencial  $E_p$  [90].

El procedimiento *VIP* se ha empleado en la determinación del tamaño y la concentración de AgNPs en fármacos con electrodos de carbón vítreo y serigrafiado [12], en donde se obtuvieron respuestas lineales en el rango de  $d_p$  de 10 a 100nm y un intervalo de concentraciones de AgNPs de 0,5 a 6mg L<sup>-1</sup>. La determinación de AgNPs en muestras de agua de mar dopadas también ha sido abordado por este método [88]; [91]. Sin embargo, estos trabajos se realizaron como pruebas iniciales de concepto, sin un estudio analítico completo.

En este apartado se describe la optimización de un método *VIP* sobre electrodos de carbón vítreo para determinación de AgNPs en muestras reales. Además, se describen algunas limitaciones del método y se proponen la utilización del Nafion como estrategia para mejorar los resultados analíticos de la *VIP*.

### 2.3.1 Determinación de tamaño medio de nanopartículas de plata por voltametría de partículas inmovilizadas. Ventajas y limitaciones.

Los voltogramas de las AgNPs que se obtuvieron en el procedimiento *VIP* explicado mostraron picos con valores  $E_p$  de aproximadamente entre +0,20V y +0,36V. Para evaluar el tamaño de las nanopartículas de plata, a través de un calibrado previo con distintos diámetros (nm) se calculó una relación lineal (teórica) de ecuación  $\ln \phi (nm) = a \cdot E_p(V) + b$ , como se muestra en la Figura 18.. Esta ecuación tiene una pendiente nernstiana, que refuerza el valor teórico que tiene la relación entre el potencial de pico voltamétrico y el logaritmo neperiano del diámetro de la nanopartículas medidas con la técnica de *VIP* [87]

Las AgNPs de 10nm mostraron  $E_p$  mayores que los esperados, lo que se debe a la agregación de las mismas durante el proceso de modificación del electrodo de trabajo. Otros autores han descrito un comportamiento similar [1].

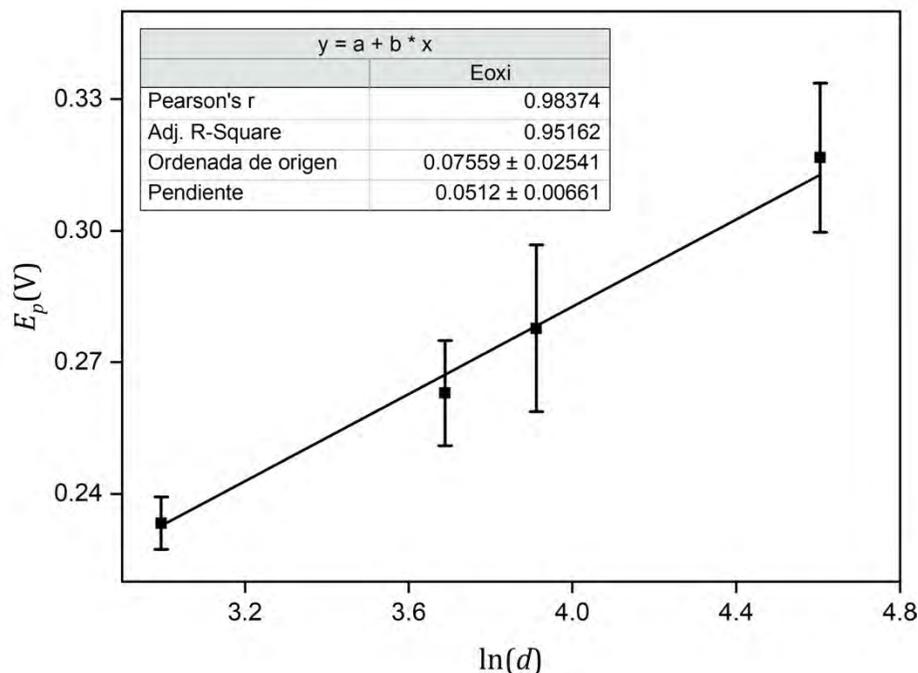


Figura 18. Representación gráfica de la relación entre el potencial del pico voltamétrico  $E_p$  y el logaritmo neperiano del diámetro de las AgNPs en el intervalo de diámetro de 20nm a 100nm. Ecuación lineal medida y coeficiente de regresión (R). Cada medida es el valor medio de 3 réplicas.

Como se observa de estos resultados, los valores de  $E_p$  de la redisolución de las AgNPs aumenta al aumentar su diámetro (Figura 18). Este comportamiento es debido a que a medida que el tamaño de las AgNPs aumenta, la energía necesaria para la oxidación del depósito de plata es mayor.

La variación del  $E_p$  entre las réplicas aumenta con el aumento del diámetro de las AgNPs (Tabla 10). Esto se debe a que a partir de un cierto diámetro la oxidación de las AgNPs es incompleta. La oxidación incompleta de las AgNPs se no se encuentra ampliamente discutida en la bibliografía. Un colectivo de autores refiere que esté hecho tiene dos

posibles explicaciones. La explicación se debe a la agregación que se produce en las AgNPs al evaporar el disolvente, que evita en las nanopartículas dentro del aglomerado el contacto eléctrico con el electrodo y, por lo tanto, su oxidación sobre el mismo, dispersándose a la disolución sin producirse la reacción electroquímica correspondiente. Mientras más grandes son las AgNPs menos área superficial tienen los agregados, produciéndose así más AgNPs dispersas no oxidadas.

Otros autores explican este comportamiento en que no todas las AgNPs tienen la misma densidad de cargas en la superficie, o lo que es lo mismo algunas están más recubiertas que otras [81]. Las menos recubiertas se oxidan más fácilmente dejando a las más recubiertas en la superficie del electrodo sin producirse la reacción electroquímica anódica.

Tabla 10. Desviaciones estándar relativas de los valores de  $E_p$  medidos con los patrones de tamaño de AgNPs indicados, en concentraciones  $0,5\text{mg L}^{-1}$

Díámetro (nm)	10	20	40	60	100
$E_p$ (RSD%)	2,7	2,7	4,7	7,0	11,8

Al medir consecutivamente réplicas  $0,5\text{mg L}^{-1}$  AgNPs de 40nm con varios barridos voltamétricos sobre el mismo depósito se observó que, después de los primeros barridos continuaba quedando plata retenida sobre la superficie del electrodo. Al cabo de seis barridos consecutivos se consiguió eliminar toda la plata inmovilizada sobre el electrodo. El desplazamiento del  $E_p$  hacia menores potenciales se debe a la disminución del diámetro de las AgNPs debido al proceso de oxidación (Figura 19). Este resultado confirma que las AgNPs de 40nm no son completamente oxidadas con un único barrido, por lo que es preciso tenerlo en cuenta para reproducir con precisión las condiciones voltamétricas que permitan la cuantificación de las nanopartículas [86].

Según la primera ley de Faraday, la cantidad de masa depositada en un electrodo es proporcional a la cantidad de electricidad que ha circulado por el electrodo. La cantidad de electricidad por unidad de tiempo (carga Q) se puede calcular a través el área del pico voltamétrico [92]. Para una concentración de  $0,5\text{mg L}^{-1}$  la  $Q_{\text{teórica}}$  es de  $1,34 \cdot 10^{-7}\text{C}$ . Al sumar todas las áreas obtenidas en los sucesivos barridos sobre la misma inmovilización, el valor

obtenido  $Q_{\text{práctico}}$  fue de  $2,55 \cdot 10^{-8} \pm 1,13 \cdot 10^{-8}$  C, lo que constituye solo un 19% de valor teórico, lo que confirma que una cantidad significativa de AgNPs se dispersa a la disolución sin haber sufrido ninguna reacción electroquímica anódica sobre el electrodo de trabajo [93].

Los resultados anteriores confirman dos limitaciones propias de la técnica, como son la pérdida de nanopartículas en la disolución durante las medidas y su oxidación incompleta. Para superar estos inconvenientes, se ensayó la inmovilización de las AgNPs y su posterior retención física que impidiera su pérdida hacia la disolución durante el tiempo de las medidas. Con este fin, se evaluó el uso de una película de Nafion sobre la superficie del electrodo, una vez inmovilizadas las AgNPs.

El Nafion<sup>TM</sup> es un copolímero de tetrafluoroetileno sulfonado, de carácter hidrofóbico y con propiedades conductoras. Debido a la presencia de cadenas de perfluoroalquilos el Nafion y su carácter hidrófobo e insoluble en agua, es muy polímero muy empleado y eficiente en la inmovilización de bioreactivos (enzimas, anticuerpos) empleados en biosensores electroquímicos y que nos ha dado muy buenos resultados en estudios anteriores en nuestro laboratorio [94], y permite separar eficientemente las superficies inmovilizadas con las disoluciones acuosas empleadas. Este material se ha utilizado como agente modificante y procedimientos de inmovilización en la fabricación de biosensores sobre todo enzimáticos [95] o como soporte de nanoestructuración con electrodos modificados con grafeno [96].

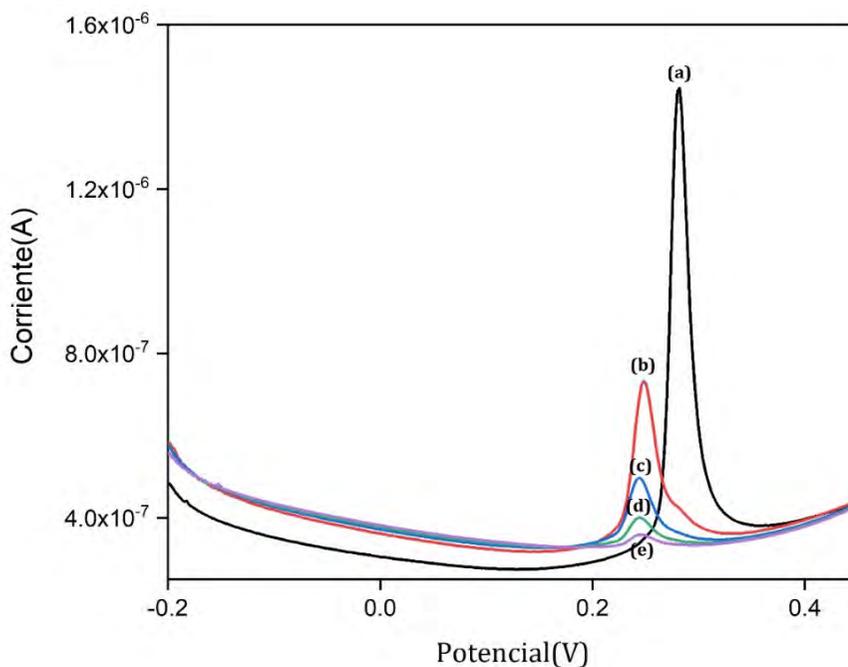


Figura 19. Voltagramas de barridos sucesivos sobre un GCE modificado con  $3\mu\text{L}$  de AgNPs  $40\text{nm}$  ( $0,5\text{m L}^{-1}$ ). (a) barrido 1; (b) barrido 2; (c) barrido 3; (d) barrido 4; (e) barrido 5.  $E_i=0\text{V}$ ;  $E_f=0,5\text{V}$ ;  $\Delta E=1,95\text{mV}$ ;  $f=25\text{Hz}$  y  $\Delta E_p=0,02\text{V}$ .

El procedimiento de depósito de la película de Nafion se describe en el apartado 2.2.1. Sobre el depósito de las AgNPs se depositaron  $3\mu\text{L}$  de disolución de Nafion  $0,25\%$  (m/v) y se secó con flujo de corriente de  $\text{N}_2$ . A simple vista pudo observarse una película blanca uniforme, una vez seca la película del polímero, que al ser insoluble en agua permanece fuertemente retenida sobre el electrodo después de varias medidas. Las medidas voltamétricas *VIP* con película de Nafion se realizaron de igual forma a la indicada anteriormente sin este polímero.

El grosor de las películas de Nafion puede controlarse fácilmente por el volumen o por la concentración del polímero depositado. Para determinar el grosor óptimo, se modificó la superficie del electrodo con disoluciones de Nafion en concentraciones  $5\%$ ,  $2,5\%$ ,  $1,6\%$  y  $1,25\%$  (m/v). El pico más sensible se obtuvo empleando una concentración de Nafion del  $2,5\%$  (m/v) (Figura 20).

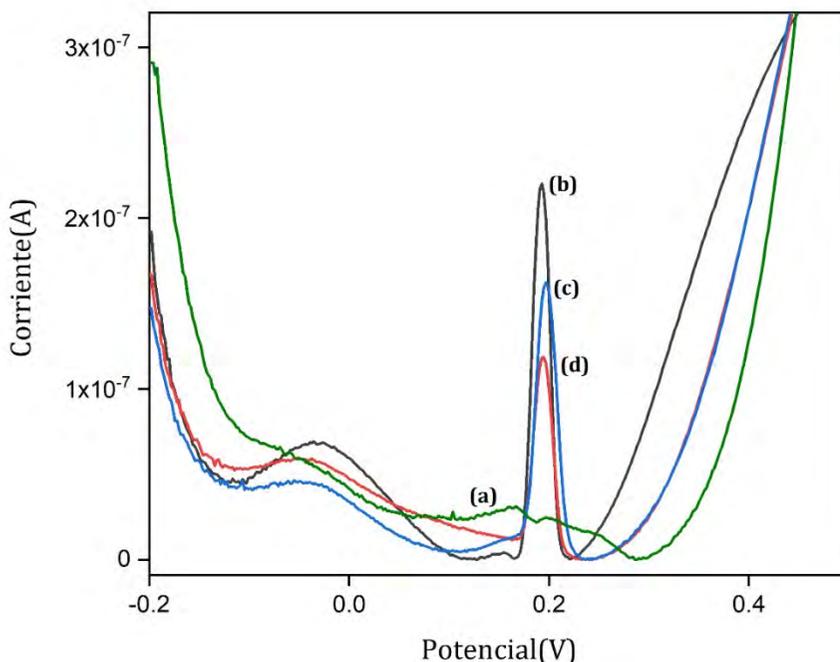


Figura 20. Voltagramas de GCE modificado con  $3\mu\text{L}$  de AgNPs  $40\text{nm}$  ( $0,5\text{mg L}^{-1}$ ) más: (a)  $3\mu\text{L}$  de Nafion™ al 5% (m/v), (b)  $3\mu\text{L}$  de Nafion 2,5%(m/v), (c)  $3\mu\text{L}$  de Nafion 1,6%(m/v), (d)  $3\mu\text{L}$  de Nafion 1,25%(m/v). Mismas condiciones de medida que las empleadas en la figura 2.

En la Figura 20 se muestran las medidas de un depósito de AgNPs de  $20\text{nm}$  modificado con Nafion y otro solo con AgNPs. Para una  $n=6$  se determinaron las variaciones en el  $E_p$  y en el  $A_p$ . En las modificaciones recubiertas con Nafion las AgNPs se oxidaron a un potencial de  $0,193\pm 0,002\text{V}$  mientras que las que no tenían nafion el  $E_p$  fue  $0,220\pm 0,002\text{V}$ . En los voltagramas de electrodos modificados con Nafion se obtuvieron picos estrechos y simétricos, al contrario que en los electrodos no modificados en los que los picos anódicos presentaron un sesgo asimétrico. Esto se debe a que los aniones presentes en el polímero facilitan la transferencia de carga durante la oxidación de las AgNPs aumentando la cinética de la reacción electroquímica. Aunque, en las modificaciones con Nafion se obtuvieron  $Q_{\text{prácticas}}$  más precisas que sin Nafion no se obtuvieron con un solo barrido  $Q_{\text{prácticas}}$  del orden

de la  $Q_{\text{teórica}}$  para una depósito de  $0,5\text{mg L}^{-1}$  de plata. Lo que indica que son necesarios más de un barrido de oxidación para oxidar las modificaciones con todas las AgNPs depositadas.

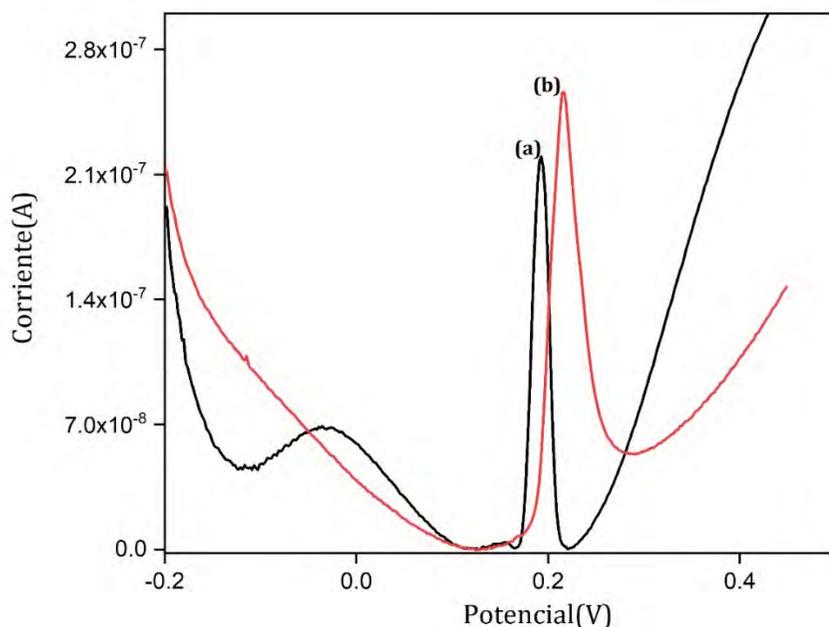


Figura 21. Voltamogramas de GCE modificado con: (a)  $3\mu\text{L}$  de AgNPs  $40\text{nm}$  ( $0,5\text{mg L}^{-1}$ ) más  $3\mu\text{L}$  Nafion™  $0,25\%$  (m/v) y (b)  $3\mu\text{L}$  de AgNPs  $40\text{nm}$  ( $0,5\text{mg L}^{-1}$ ). Condiciones de medida como figura 2.

Para comprobar la capacidad de retención del Nafion™, se realizó una experiencia similar a la anterior, llevando a cabo barridos de potencial consecutivos sobre un depósito de AgNPs ( $40\text{nm}$ ,  $0,5\text{mg L}^{-1}$ ) y con la modificación óptima del Nafion. En este caso fueron necesarios más de 20 barridos anódicos de potencial para eliminar completamente la corriente debida a la plata sobre el electrodo.

Adicionalmente, los valores de área de pico  $A_p$  disminuyeron de forma constante, lo que indica que el nafion tiene un efecto regulador en la oxidación de las AgNPs permitiendo una oxidación “controlada” de las mismas. En la Figura 22 pueden observarse los voltamogramas medidos, junto a los valores  $I_p$  de cada medida (círculos) y las diferencia entre las  $I_p$  de cada medida con la anterior (cuadrados).

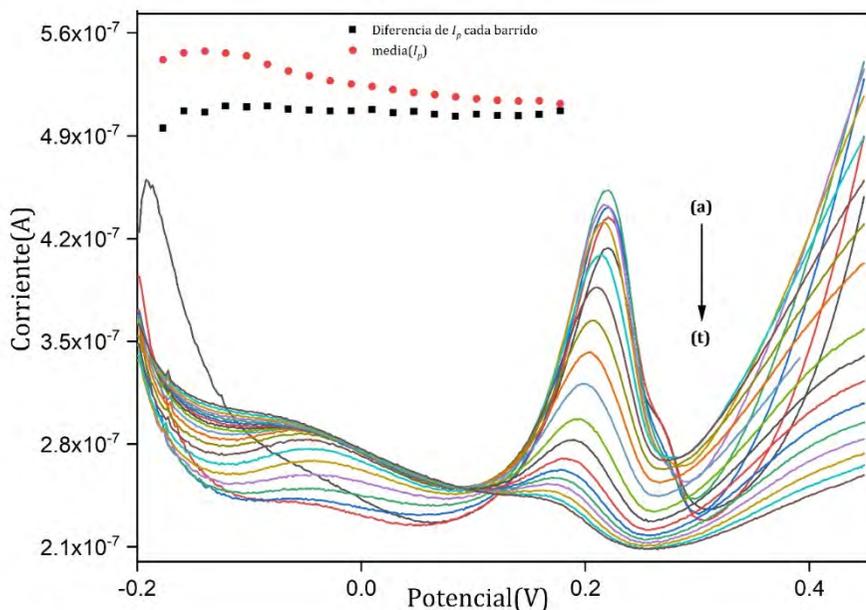


Figura 22. Voltagramas de barridos sucesivos sobre un GCE modificado con 3 $\mu$ L de AgNPs 40nm (0,5m L<sup>-1</sup>) y 3 $\mu$ L de Nafion™ 0,25% (m/v). (a) a (t) barridos de 1 al 20. (·)  $A_p$  de los barridos; (■) Diferencia entre  $A_p$  de los barridos.

La  $Q_{teórica}$  del depósito se calculó sumando las  $A_p$  de todos los barridos. El valor de la  $Q_{teórica}$  para las modificaciones con Nafion fue de  $1,4 \cdot 10^{-7} \pm 4 \cdot 10^{-8} C$ , que no presenta diferencias significativas con el valor teórico ( $1,34 \cdot 10^{-7} C$ ). Este resultado indica que la formación de una película de Nafion sobre el depósito de las AgNPs impide su pérdida en la disolución durante la medida voltamétrica, lo que mejoró la precisión y la exactitud en la aplicación analítica del procedimiento *VIP* con respecto a su uso convencional [6]

En la Figura 23 se representan los valores  $Q_{teórico}$  con una línea discontinua y como círculos los valores  $Q_{práctico}$  medidos en las 6 réplicas de electrodos modificados con Nafion. Los símbolos con forma de triángulos representan los valores  $Q_{prácticos}$  obtenidos de las medidas de las 6 réplicas sin Nafion. A partir de las disoluciones estándar de AgNPs (40nm de diámetro, 0,5mg L<sup>-1</sup>) iniciales, los porcentajes de recuperación en ambos casos fueron del 100,87% de recuperación con Nafion inmovilizado y un 19,03% de recuperación sin recubrimiento de Nafion.

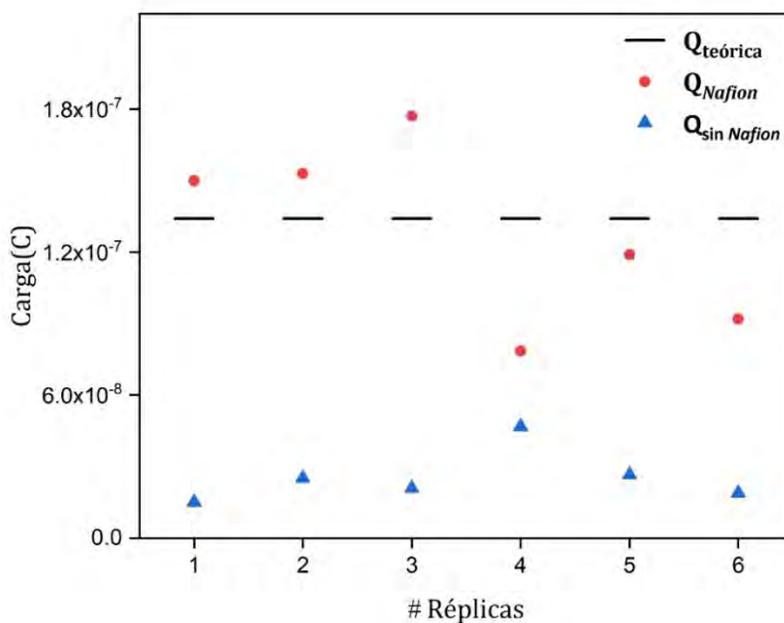


Figura 23. Representación de las cargas (Q) relacionadas con el patrón de AgNPs 40nm (0,5mg L<sup>-1</sup>). (— —) Q<sub>teórica</sub>, (●) Q<sub>práctica</sub> con GCE modificado con Nafion™, (▲) Q<sub>práctica</sub> con GCE modificado con Nafion.

### 2.3.2 Aplicación del método VIP-Nafion™ en la determinación del tamaño medio de nanopartículas de plata en muestras reales.

El método optimizado VIP-Nafion™ se aplicó en 3 muestras comerciales de productos de plata coloidal empleados como suplementos con propiedades bactericidas y anti-fúngicas. Se trata de los mismos productos caracterizados en un apartado anterior de la memoria (*Wellness colloidal silver™*, *Biovedik™*) y el denominado *High Stability™*. La concentración nominal de plata en la muestra *High Stability* es de 20mg L<sup>-1</sup> y el tamaño de las AgNPs indicado por el fabricante es de 0,6 a 5nm.

Partiendo de las especificaciones del fabricante en cuando al contenido de AgNPs, se prepararon por suspensiones de nanopartículas de plata del orden de 0,5mg L<sup>-1</sup>, diluyendo con agua. Se prepararon las medidas VIP-Nafion depositando 3μL de las muestras y 3μL de Nafion 2,5%(v/v). Se midieron 15 réplicas de cada una de las muestras y se estimó el diámetro de las AgNPs según el  $E_p$  del primer barrido.

El tamaño medio obtenido para las AgNPs en la muestra *Wellness™ colloidal silver* fue de  $24\pm 6\text{nm}$ , en la muestra *Biovedik™* de  $30\pm 20\text{nm}$  y en la muestra *High Stability*  $50\pm 20\text{nm}$ . En las medidas se observaron variaciones en los valores iniciales  $E_p$ , que se debieron a la aglomeración de las AgNPs durante la evaporación de los disolventes, pero sobre todo a una alta polidispersión en el tamaño de los AgNPs en este tipo de muestras. En contraste con los resultados obtenidos con estándares de tamaño de AgNPs, que muestran valores mucho más uniformes y con menores dispersiones frente al valor medio, coincidentes con los valores certificados de distribuciones de tamaño de estos estándares.

Estos resultados muestran que la técnica *VIP-Nafion* evalúa rápidamente y con precisión el tamaño y concentración de nanopartículas, que puede ser tomada como punto de partida de otras técnicas de confirmación como la cronocoulombimetría de impacto de nanopartículas (*PCC*), explicada en el apartado posterior de esta memoria. Se compararán en este apartado los resultados de ambas técnicas. También se ha empleado con éxito la técnica *VIP-Nafion* en los estudios de la interacción de AgNPs con antibióticos, que se describen en la Parte III de esta memoria.

Ambas técnicas *VIP* y *PCC* proporcionan información analítica complementaria en la caracterización del tamaño de nanopartículas de plata [82]. La *PCC* permite conocer la distribución de tamaños de las partículas individuales AgNPs, por ejemplo, sin la influencia negativa de posibles aglomeraciones o incluso adsorción sobre el electrodo de trabajo (en la *PCC* se utilizan microelectrodos). Tal como se describirá posteriormente.

Como conclusión final, el procedimiento de modificación del electrodo con una película de Nafion mejora la retención de las AgNPs inmovilizadas para las medidas *VIP* convencionales, y modula su oxidación. Lo que permite con mejor precisión el cálculo de tamaños de estas nanoartículas. Además, nos va a permitir cuantificar con precisión y exactitud concentraciones de AgNPs libres (o complejadas) en la parte posterior de este trabajo de Tesis doctoral en donde abordamos el estudio de las interacciones de las nanopartículas con antibióticos que actúan como ligandos complejantes.

## 2.4 Cronoculombimetría de impacto de partículas para la caracterización de nanopartículas de plata.

La cronoculombimetría de colisión de partículas (PCC), explicada en la introducción teórica anterior, permite determinar tamaños y formas de NPs metálicas, además de estudiar cinéticas de aglomeración / agregación de nanomateriales [34]; [35].

Para una medida típica, se preparan disoluciones muy diluídas de AgNPs para detectar de forma individual su impacto sobre el electrodo. En virtud de su movimiento Browniano, las AgNPs colisionan estocásticamente impactando sobre la superficie del electrodo. Estas colisiones sobre el electrodo polarizado a un potencial anódico suficiente producen picos de corriente transitorios, cuya área permite calcular la cantidad de plata que se ha oxidado en su totalidad por cada nanopartícula. Suponiendo partículas esféricas, la cantidad de carga empleada en la oxidación total de cada nanopartícula se puede relacionar con el diámetro de cada nanopartícula individualmente. .

La carga de cada pico proporciona información cuantitativa sobre números de átomos de un elemento en la NP [99]. Para NP esféricas el diámetro de la NP es:

$$D_{NP} = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{3ArQ}{4nF\pi\rho}} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde  $A_r$  es la masa atómica relativa ( $107,87\text{g mol}^{-1}$ ),  $Q$  es la carga total medida,  $F$  es la constante de Faraday ( $96485,34\text{C mol}^{-1}$ ),  $\rho$  la densidad del material ( $10,49\text{g cm}^{-3}$ ) y  $n$  el número de electrones transferidos.

Las técnicas culombimétricas de nanoimpacto han sido estudiadas de forma teórica muy intensamente, aunque existen en la bibliografía científica muy pocas aplicaciones analíticas. Algunas aplicaciones se han descrito, por ejemplo, en la detección de AgNPs en muestras dopadas con estas nanopartículas de aguas naturales de río [100] o de mar [101], o en estudios aplicados sobre la agregación de las nanopartículas de plata [101].

Algunos avances teóricos describen la detección de femtomoles de AgNPs basándose en la medida en la que se produce el primer impacto sobre el electrodo [102], la influencia del electrolito soporte en la frecuencia de impactos [84], uso de microelectrodos de fibra de carbono modificados y electrodos serigrafados [12], o la mejora de los límites de detección

empleando convección (flujo de la disolución) sobre el electrodo que aumente la frecuencia de los impactos [103]. Las aplicaciones de la PCC en matrices reales son muy escasas.

Si bien la PCC ofrece mucha información, el procesamiento de las medidas es un paso crítico en la obtención de resultados veraces. El uso de la transformada de *Fourier*, por ejemplo, es una herramienta matemática que se ha utilizado para eliminar el ruido de la corriente faradaica producidas por los impactos [101]. Además de métodos de desconvolución en el estudio de las agregaciones [85]. Pero actualmente no hay una metodología generalizada para el tratamiento de los datos. En este apartado, describimos nueva metodología para el tratamiento matemático de las medidas del PCC, bajo un punto de vista de finalidad analítica.

#### 2.4.1 Optimización de la cronocoulombimetría de impacto de partículas para la caracterización de tamaños y cuantificación de nanopartículas de plata.

##### ▪ Instrumentación

Para las medidas de PCC, en las que se emplean microelectrodos (muy pequeña superficie), se ha empleado un potenciostato equipado con un módulo de amplificación de baja corriente (*ECD*), además de un apantallamiento de todas las conexiones y la protección de la celda voltamétrica dentro de una caja de Faraday [104].

La instrumentación que se ha empleado se muestra en la Figura 24: potenciostato PGSTAT-10 (Metrohm) provisto de un módulo de amplificación de baja corriente (*ECD*). Este módulo ofrece dos intervalos de corrientes de 1nA y 100pA con resoluciones de corriente mínima de 30fA y 0,3fA respectivamente. Está equipado con un filtro Sallen-Key (*hardware*) incorporado, de tercer orden con tres constantes de tiempo RC que ayuda a filtrar el ruido electrónico. Los cables se apantallaron con papel de aluminio y la celda de medida se mantuvo dentro de una jaula de Faraday, adaptada en nuestro laboratorio. El potenciostato fue controlado por el software electroquímico NOVA v.2.1 (Metrohm).



Figura 24. Instrumentación empleada en las medidas PCC

El apantallamiento de las conexiones y el uso de la jaula de Faraday permitieron disminuir considerablemente el ruido de fondo y la corriente capacitativa, como se comprobó con medidas sin este apantallamiento con el mismo módulo instrumental. La Figura 25 muestra como varió el ruido en la medida de un blanco al abrir y cerrar la jaula de Faraday.

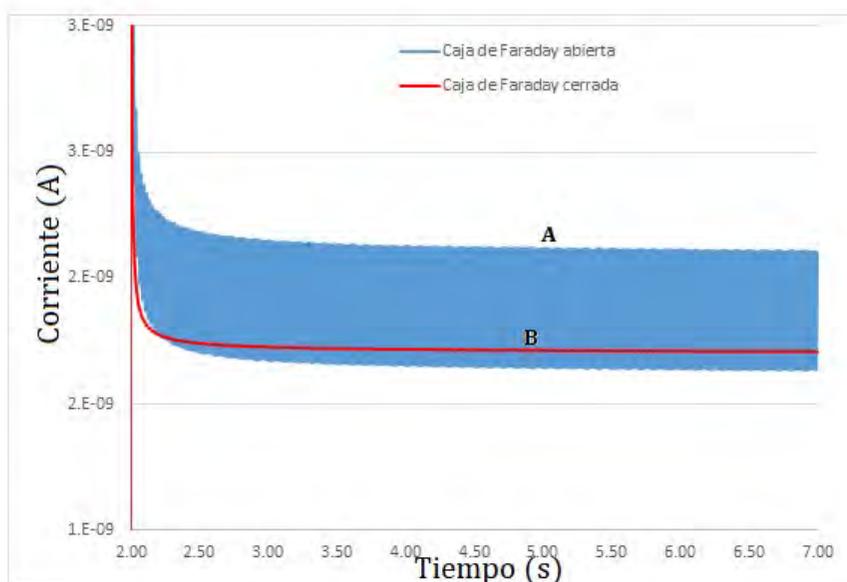


Figura 25. Cronoamperogramas medidos en una disolución blanca (sin AgNPs) de electrolito soporte  $\text{NaClO}_4$  0,02M: (A) medida con caja de Faraday abierta, y (B) medida con caja de Faraday cerrada.

#### ▪ Electrodo de trabajo

Las medidas PCC implican control potencioestático de tres electrodos. [105]. Se utilizaron microelectrodos de fibra de carbono ( $11 \pm 2 \mu\text{m}$  de diámetro), con el objetivo de minimizar la corriente capacitiva y mejorar la relación S/N con respecto al ruido de fondo, además de evitar posibles adsorciones sobre el electrodo y minimizar la influencia de la resistencia eléctrica de la disolución en la medida de muy pequeñas corrientes (del orden de pA). [106].

La influencia del tamaño del electrodo se muestra en la Figura 26, en la que se han realizado medidas de AgNPs de 10nm de diámetro con un mini-electrodo de disco de oro (AuE) de  $500 \pm 50 \mu\text{m}$  de diámetro. El ruido de fondo presenta una intensidad de corriente mayor que la que puede producir el impacto de una AgNPs de 10nm según la ecuación 1, dando como resultado un valor en el diámetro medio de AgNPs no veraz de  $144,5 \pm 22,6 \text{nm}$ .

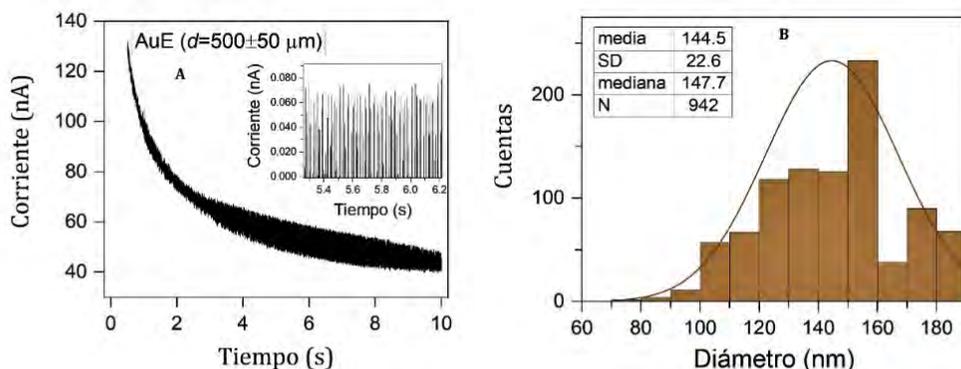


Figura 26. (A) Cronoamperograma de una dispersión de AgNPs (10nm de diámetro,  $10\text{ng L}^{-1}$ ) en  $\text{NaClO}_4$  0,02 M con AuE (diámetro  $0,5 \pm 0,05\text{mm}$ ) y amplificación de las corrientes faradaicas y capacitivas (B) Distribución de tamaño siguiendo la ecuación 1.

#### ▪ Selección del electrolito soporte

La selección del electrolito soporte y de la concentración del mismo tiene un influencia muy importante. Al utilizar altas concentraciones de electrolito de soporte (superior a 0,1M) se reduce la caída de Ohmica y se comprime la doble capa en el electrodo. Sin embargo, este alto contenido iónico puede influir en el comportamiento electroquímico (por ejemplo, en el coeficiente de difusión y velocidad) de las nanopartículas en suspensión. Dado que las partículas tienen un recubrimiento cargado (aniones citrato), una alta concentración de electrolitos soporte puede causar agregación o aglomeración debido a la contracción de la doble capa individual que rodea cada partícula y la disminución de la repulsión asociada [105]. Teniendo en cuenta lo anterior, es adecuada una fuerza iónica pequeña, como la empleada en el electrolito soporte 0,02M de  $\text{NaClO}_4$ .

#### ▪ Selección del potencial de electrolisis ( $E_e$ )

Como indica la ecuación 1, el área de los picos de corrientes ( $Q$ ) está relacionada con los tamaños de las NPs, pero solo se obtienen resultados veraces si las AgNPs se oxidan por completo en el tiempo de dominio de los eventos de colisión. Esto es especialmente importante para AgNPs grandes (diámetros mayores de 40nm), donde puede ocurrir una oxidación incompleta de los NPs con potenciales pequeños sin la velocidad de transferencia

de carga adecuada. Este efecto es similar al observado en las medidas *VIP* y que se han explicado en el apartado 2.3.1.

En la Figura 27 se puede observar la influencia del potencial aplicado sobre las distribuciones de tamaño de los estándares de AgNPs recubiertas de citratos de 10, 20, 40, 60 y 100nm de diámetro. Se representan estas distribuciones aplicando un potencial de electrólisis de  $E_e=+0,50V$  y  $E_e=+0,70V$ . No hubo diferencias significativas ( $P=0,05$ ) en el diámetro de las AgNPs de 10nm y 20nm al aplicarse los dos valores de  $E_e$ . El pequeño tamaño de estas AgNPs hace que un potencial  $E_e=+0,5V$  sea suficiente para que la cinética de la transferencia de carga produzca su oxidación completa. Sin embargo, AgNPs de diámetros superiores (40, 60 y 100nm), el potencial de +0,5V fue insuficiente para oxidar completamente las AgNPs durante las colisiones estocásticas sobre el electrodo (un potencial  $E_e=+0.7 V$  sí es suficiente, obteniéndose distribuciones de tamaño acordes a su diámetro nominal).

Adicionalmente, además del  $E_e$  el recubrimiento de las AgNPs también influyó en la cinética de oxidación de las AgNPs [108]. Un estándar certificado de AgNPs de 75nm de diámetro (Instituto nacional de estándares y tecnologías, NIST) recubiertas de polivinilpirrolidona (*PVP*) se midió con las mismas condiciones experimentales que un estándar de AgNPs de 100nm recubiertas de citratos ( $E_e=+0,70V$ ). El resultando mostró una oxidación incompleta de las AgNPs recubiertas de PVP ya que el diámetro calculado resultó ser de solo de  $42,0\pm 8,2nm$ , mostrando la influencia del recubrimiento en la velocidad de transferencia de carga.

### Parte III

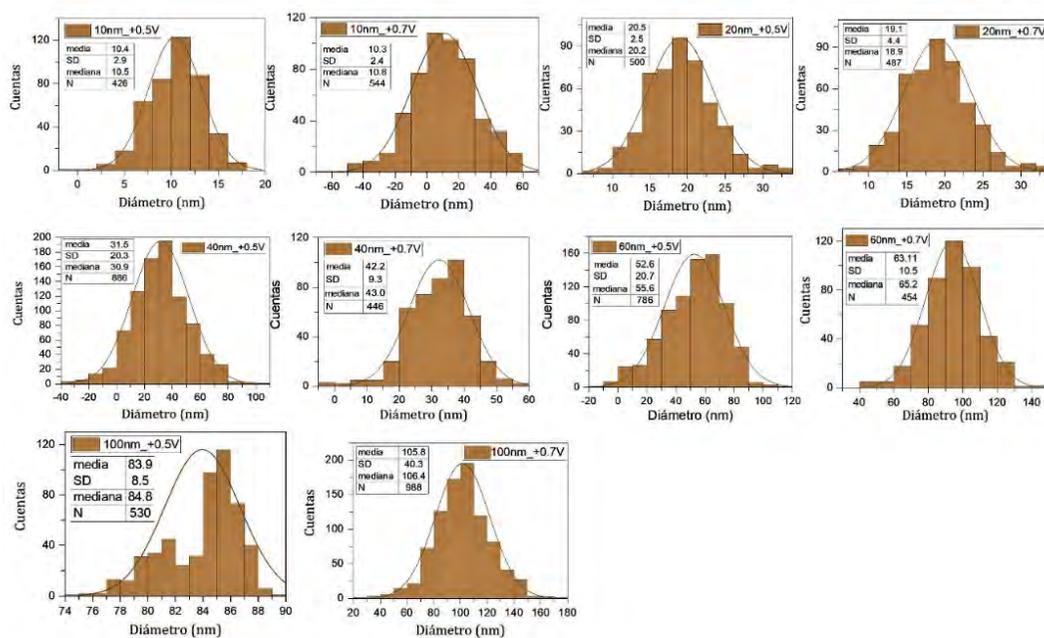


Figura 27. Distribuciones de tamaño a partir de cronoamperogramas de  $25\text{ ng L}^{-1}$  de AgNPs. Condiciones instrumentales:  $E_e=+0,50\text{ V}$  y  $E_e=+0,70\text{ V}$ , para diámetros de: (a): 10nm; (b): 20nm; (c) 40nm; (d) 60nm; y (e): 100nm

#### ▪ Medida de patrones de tamaño y tratamiento matemático de los resultados

Se midieron disoluciones de patrones de  $0,25\text{ ng L}^{-1}$  de AgNPs de 10; 20; 40; 60; 100nm recubiertas de iones citratos. Las condiciones experimentales utilizadas se resumen en el apartado 2.2.2.

En todos los casos se pudieron observar los picos pertenecientes a los impactos de las AgNPs sobre la superficie del microelectrodo, a diferencia de disoluciones blanco en las que estos impactos no se producen. La Figura 28 muestra un cronoamperograma típico de una solución desoxigenada de  $0,25\text{ ng L}^{-1}$  de AgNPs de 20nm de diámetro en electrolito de soporte  $\text{NaClO}_4$  a  $0,02\text{ M}$ . El recuadro (A) de la Figura 28 representa con más detalle los picos de impacto de los AgNPs. Los eventos de colisión son picos agudos de corriente anódica con duraciones de 5-10ms.

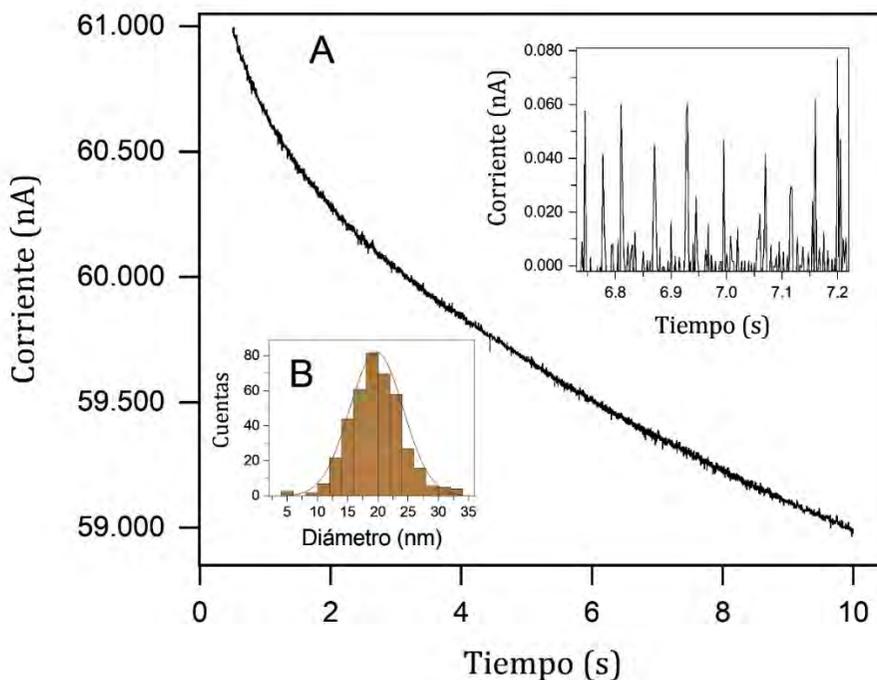


Figura 28. Cronoamperograma de una dispersión de AgNPs de 20nm en  $\text{NaClO}_4$  0,02M ( $20 \text{ ng L}^{-1}$ ).  $E_e=+0,70\text{V}$  durante 10s. Recuadros (A) Ampliación de las medidas de corriente entre 6,7 y 7,2s; (B) Distribución de tamaño calculada a partir de los picos registrados entre 2-10s.

El tratamiento de las medidas de las áreas de los picos voltamétricos incluye dos pasos:

- (1) la eliminación de la variación de la corriente de base (típicamente una disminución de tipo Cottrell con  $t^{-1/2}$ ); y
- (2) la integración de los picos tomando la corriente faradaica debida a las colisiones de las AgNPs y eliminando la componente de corriente residual y capacitativa con un criterio (valor *threshold* o límite) adecuado.

Al objeto de optimizar ambas variables, se estudió el tratamiento matemático más idóneo para obtener valores veraces del diámetro medio, empleando el software de tratamiento de datos OriginPro 2020.

En la bibliografía se ha descrito la eliminación de corrientes residuales y ruido de fondo empleando la transformada de Fourier, para pasar las señales de dominio de tiempo a dominio de frecuencia y restar medidas múltiplo de la frecuencia dominante [1]; [101]. Sin embargo, el filtrado matemático de las corrientes con transformadas de Fourier para analizar el espectro de frecuencia de la línea de base de los cronoamperogramas medidos no mostró ninguna mejora de las señales y de las distribuciones de tamaño calculadas. Esto probablemente se deba al filtro de *del tipo Sallen-Key* de tercer orden proveniente del módulo *ECD* utilizado para medir las corrientes. Este filtro *hardware* elimina interferencias del mismo tipo que las debidas al empleo de la transformada de Fourier, por lo que no fue necesaria esta transformación para la eliminación del ruido de fondo.

Para este tratamiento matemático se empleó la opción de análisis de picos del software OriginPro 2020, que permite con distintos criterios identificar los picos a partir de una señal de fondo y su posterior integración para el cálculo de su área.

En el primer paso se corrigió la deriva de la línea de base del cronoamperograma con un suavizado asimétrico de mínimos cuadrados (*ALS, Asymmetric Least Squares smoothing*). El algoritmo de cálculo ALS minimiza las sumas cuadráticas de dos términos, las distancias entre los puntos medidos y la nueva línea de base, así como la segunda derivada de la línea de base, después de un número determinado de iteraciones (típicamente 10) [109,110]. El cálculo permite obtener la línea de base de los picos para posteriormente restarla a cada punto del cronoamperograma a un valor de referencia constante y con un valor cero de corriente. Se empleó como óptimo (en función de los diámetros nominales certificados de las AgNPs y las distribuciones de tamaño calculadas) un factor de asimetría (*AF*) 0,20, y un valor de discriminación (*threshold, DF(1)*) de 0,0001nA. El factor *AF* tiene un valor entre 0 y 1, más cercano hacia el 0 para picos de corriente positiva, y al 1 para picos de corriente negativa, teniendo en cuenta el factor de discriminación de picos y un factor de suavizado constante (entre 0 y 9, se empleó un valor constante de 2),

Una vez definida la línea de base, en un segundo paso los picos de las corrientes faradaicas se discriminaron de las corrientes capacitivas y del ruido mediante el uso de un valor de discriminación en altura (*DF(2)*) de 0,0001nA, para la integración del área

## Parte II

individual de cada pico. A partir de los valores  $Q_p$  se calcularon los diámetros de las AgNPs y se representaron sus distribuciones de tamaño, con un valor medio y la desviación estándar correspondiente.

En la optimización de los parámetros del cálculo anterior, valores de AF entre 0,20 y 0,27 proporcionaron los mejores resultados, basados en los tamaños de las AgNPs a partir de los histogramas calculados con los datos de un mismo cronoamperograma. La influencia de AF en los histogramas de tamaño se muestra en la Figura 29. Valores de AF muy pequeños (entre 0 a 0,01) nos dan diámetros anormalmente grandes, al obtener una línea de base excesivamente desviada hacia valores de corriente negativos. Valores de AF más altos que los óptimos ( $AF=0,5$ ) producirán un sesgo de las distribuciones hacia diámetros menores que los reales (ver fFigura 29). Los factores que influyen en ASL fueron:  $DF$  (1) igual a 0;  $AS=2$ ; y se realizaron 10 iteraciones de cálculo matemático.

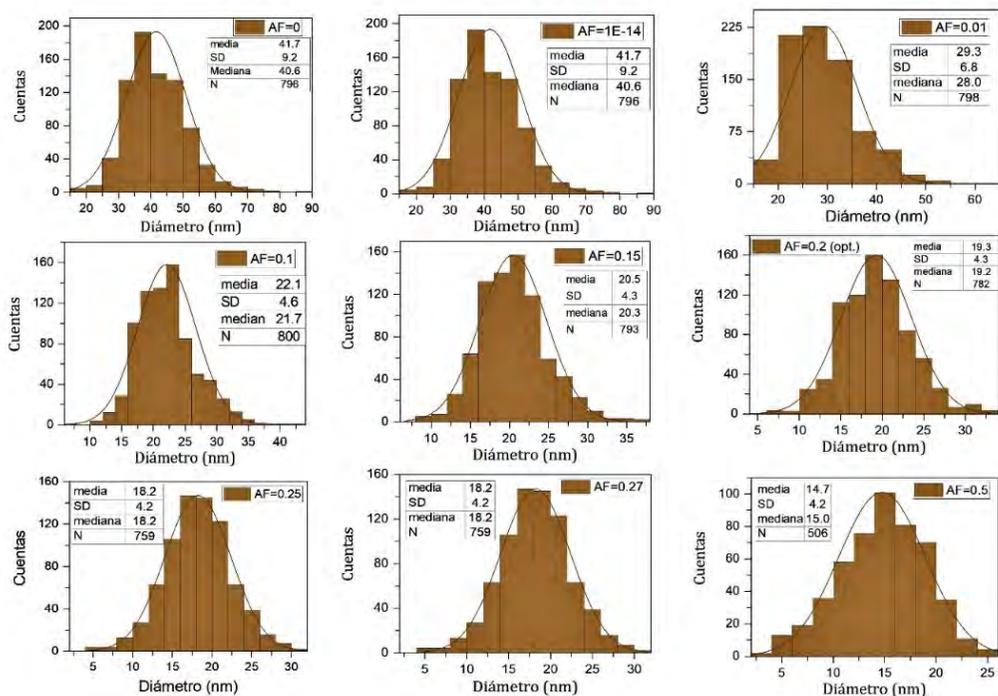


Figura 29. Influencia del factor de asimetría (AF) en las distribuciones de tamaño calculadas, a partir de cronoamperogramas de una dispersión de  $25\text{ng L}^{-1}$  AgNPs estándar ( $20,0\pm 1,2\text{nm}$

### Parte III

de diámetro nominal) en 0,02 M NaClO<sub>4</sub>. Se midieron los picos de colisión en el intervalo de 0,5 a 10s ( $E_e=+0,50V$ )

La Influencia del factor de asimetría ( $AF$ ) y los valores de discriminación ( $DF(1)$ ) en las distribuciones de tamaño calculadas para las medidas PCC de AgNPs de 20nm se muestran en la Figura 29 y Figura 30, respectivamente

Los valores de discriminación (1) en porcentaje (%) en la corrección de la línea de base de ALS son menos importantes para calcular las distribuciones de tamaño de AgNPs. Este es el valor de discriminación para determinar los puntos por encima de la línea de base en el algoritmo ALS para ser considerados como picos positivos (o negativos). Para mostrar este efecto, la Figura 30 resume las distribuciones de tamaño con valores de discriminaciones ( $DF$ ) variables con datos del mismo cronoamperograma de la Figura 29.

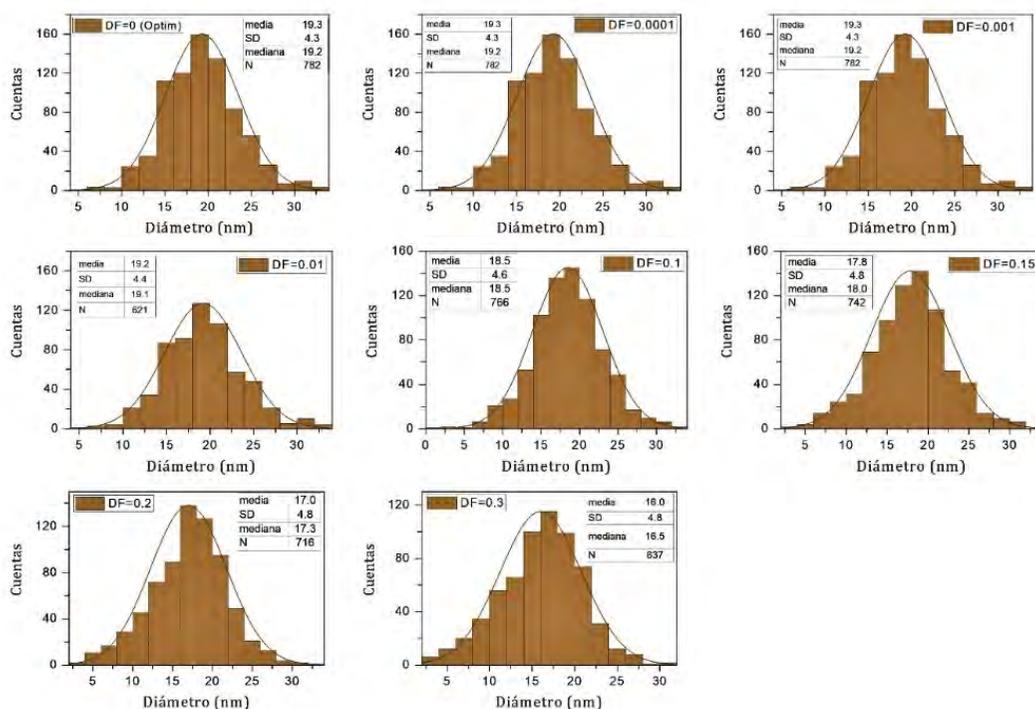


Figura 30. Distribuciones de tamaño de AgNPs 25ng L<sup>-1</sup> (20,0±1,2nm de diámetro nominal) en NaClO<sub>4</sub> 0,02M. Influencia del valor de discriminación  $DF(1)$  en altura de pico en el cálculo ALS. En todos los casos,  $AF=0,20$ . Se midió en el intervalo de 0,5 a 10s ( $E_e=+0,50V$ ).

## Parte II

Después de restar la línea base suavizada de los cronoamperogramas, a veces es necesario aplicar un valor de discriminación de altura  $DF(2)$  para discriminar entre corrientes faradaicas, capacitivas y debidas al ruido instrumental. Este valor ha de ser adecuado para obtener resultados veraces del diámetro, debidas exclusivamente a la carga total faradaica de cada impacto individual, por lo que también se optimizó sobre el mismo cronoamperograma que las optimizaciones anteriores. Los valores óptimos que se encontraron experimentalmente con diámetros estándar de AgNPs en el rango de 10-100nm fueron valores muy pequeños, del orden de los 0,0001nA. La influencia de  $DF(2)$  en las distribuciones de histograma de tamaño se puede ver en la Figura 31, sobre las mismas disoluciones que en las figuras Figura 29 y Figura 30.

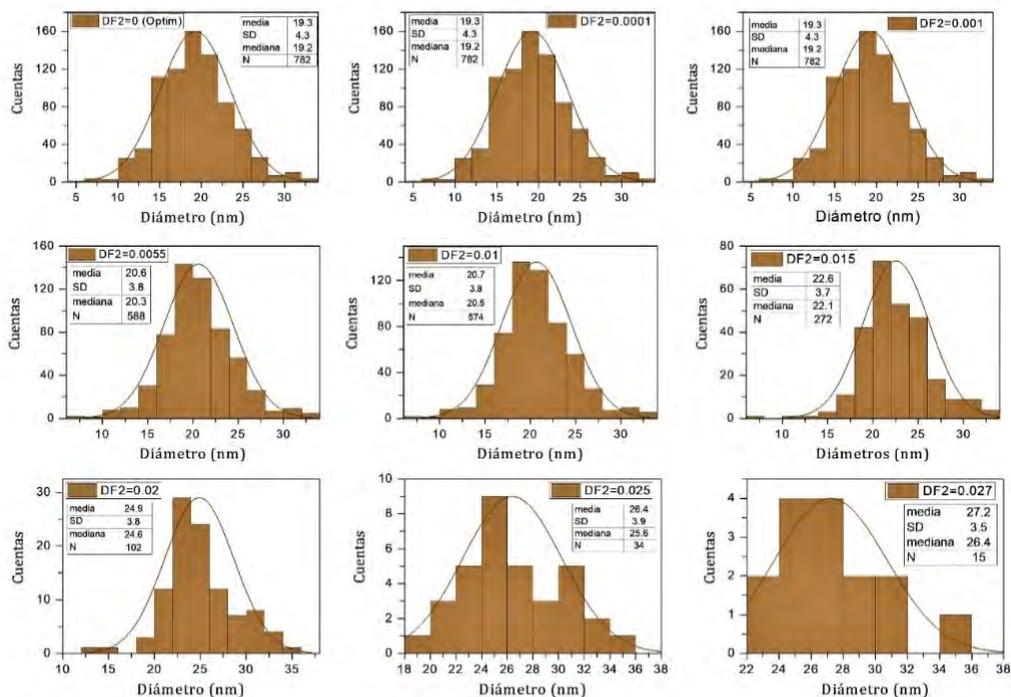


Figura 31. Distribuciones de tamaño de AgNPs  $25\text{ng L}^{-1}$  ( $20,0\pm 1,2\text{nm}$  de diámetro) en  $\text{NaClO}_4$   $0,02\text{M}$ . Influencia del valor de discriminación  $DF(2)$ . Condiciones;  $AF=0,20$ ;  $DF(1)=0$ ,  $ASL=2$ . Las medidas se realizaron en el intervalo de 4 a 10s ( $E_e=+0,50\text{V}$ )

De los resultados observados en la Figura 31, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- (i) valores de  $DF(2)$  altos resultan en un menor número de picos encontrados y en un aumento erróneo del diámetro promedio de las AgNPs;
- (ii) el valor  $DF(2)$  que sugiere automáticamente el software (aproximadamente un 20% del total del área del pico) debe ser optimizado. En general, se encontró que un valor  $DF(2)$  de aproximadamente 0,0001nA es el valor óptimo para tamaños de nanopartículas entre 10 y 100nm.

La desviación estándar relativa de los valores medios de los diámetros no depende del diámetro de los AgNPs, siendo aproximadamente el 4-5%. Una forma conveniente de optimizar los tratamientos matemáticos debe hacerse experimentalmente, ya que no existe una regla fija que dependa del tamaño de las nanopartículas. El mejor criterio es la visualización de las gráficas de distribución de tamaños, eligiendo los valores de los factores que producen las distribuciones menos dispersas y sin sesgo hacia mayores o menores valores (sesgo cercano a cero). Con la adecuada elección de los parámetros anteriores, se obtuvieron valores de diámetros de las AgNPs sin diferencias significativas con los estándares de AgNPs de diámetro certificado ( $P=0,05$ )

El software OriginPro propone un valor automático  $DF(2)$  que es aproximadamente el 20% del área del total de cada pico. Si bien este valor pudiera ser un buen punto de partida, no lo es en la mayoría de los casos. De ahí la importancia de la optimización de los valores de cálculo que se correspondan exclusivamente con picos debidos a la colisión de las nanopartículas, evitando la contribución de otros tipos de señales capacitivas o de ruido. Con pequeñas diferencias, los valores umbral pueden variar según la composición y la matriz de las muestras estudiadas en las que se ha aplicado el mismo método, si bien estas diferencias son muy pequeñas y son fácilmente optimizadas con los criterios explicados anteriormente de ausencia de sesgo en la distribución.

Las distribuciones de tamaño obtenidas en las medidas PCC siguen un modelo de distribución gaussiana (normal) alrededor del valor medio, lo que se corresponde con el proceso estocástico en el que se basan estas medidas. Varios pueden ser las causas de la

variabilidad de los tamaños. La variabilidad intrínseca en el tamaño de partícula de los estándares, la oxidación incompleta de las nanopartículas, que conduce a picos con áreas más pequeñas, o la ocurrencia de 2 o más impactos simultáneos de las nanopartículas sobre la superficie del electrodo, lo que produce picos con áreas más grandes.

Un aspecto importante, es que durante el tiempo de las medidas (10s) no se produjeron agregaciones de las AgNPs, no midiéndose picos de áreas superiores a la de una nanopartícula individual. Salvo el solapamiento aleatorio de picos de corriente debidos a la colisión simultánea de varias nanopartículas de plata, que son detectados a través de las medidas de las anchuras de los picos (valores típicos fueron anchuras de entre 4-6ms en la base de los picos de corriente).

#### ▪ **Cuantificación por el método PCC.**

La frecuencia de los impactos produce también información sobre el número de nanopartículas de plata en la disolución, y permiten su cuantificación. De forma teórica, el número promedio de impactos estocásticos de nanopartículas en función del tiempo sobre un microelectrodos está limitado por la velocidad de difusión de estas nanopartículas, y se demuestra que está relacionado con la concentración en número de estas nanopartículas [82]. Las referencias de la bibliografía científica que hacen uso de la PCC para la cuantificación analítica de NPs son muy escasas [105]

Si bien se ha descrito la relación entre la frecuencia de los impactos y las concentraciones de AgNPs [105], , en esta parte de la memoria demostramos que existe una relación entre el número de colisiones y el número de concentración de las AgNPs (número de AgNPs L<sup>-1</sup>). Esta última relación es más apropiada, dado que el número de AgNPs L<sup>-1</sup> depende de la concentración y también del diámetro de las AgNPs.

Existen también factores experimentales que influyen en la frecuencia de impacto de las AgNPs sobre el microelectrodo. Además del número de AgNPs L<sup>-1</sup>, influye el potencial aplicado, del coeficiente de difusión de las AgNPs, de la composición del electrolito soporte, y de la superficie del microelectrodo de trabajo. Por lo que es necesario controlar todas

estas variables experimentales, al objeto de obtener resultados analíticamente reproducibles.

Para el objetivo de cuantificar las AgNPs a través de la medida de las frecuencias de colisión, se midieron el número de impactos en suspensiones de AgNPs de 10nm en un intervalo de concentraciones de 0,0025 a 25ng L<sup>-1</sup> (5·10<sup>5</sup> a 5·10<sup>8</sup> partículas L<sup>-1</sup>), usando los valores optimizados de tratamiento matemático de Iso resultados y un valor de DF(2)=0,0001nA. Se observó una dependencia lineal del número de impactos a muy bajas concentraciones de nanopartículas, mientras que el número de impactos tiende a disminuir con concentraciones más altas, perdiendo esta relación lineal. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros del ajuste lineal calculados considerando diferentes intervalos de tiempo a lo largo del cronoamperograma de 0,500-5,000s, 5,001-10,000s y 4,000-10,000. Finalmente fue seleccionado el intervalo 0,500-10,000s.

La dependencia lineal entre el número de picos y el número de AgNPs se observó en el intervalo de 4,5·10<sup>5</sup> a 4,5·10<sup>7</sup> partículas L<sup>-1</sup>, y se muestra en la Figura 32.

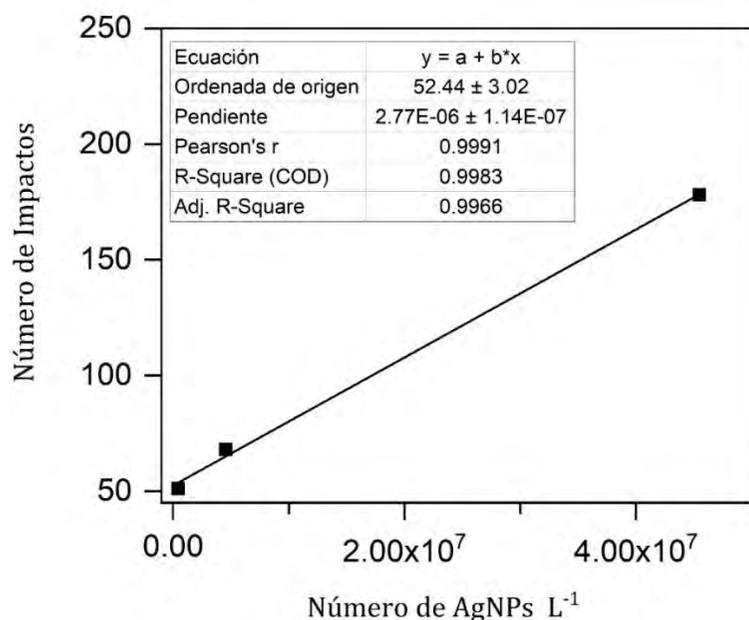


Figura 32. Ajuste lineal entre el número de impactos (de 0,5 a 10s) y el número de nanopartículas de plata L<sup>-1</sup> (10nm de diámetro). Las concentraciones numéricas de AgNPs L<sup>-1</sup> se corresponden a las concentraciones de AgNPs de 0,0025, 0,025 y 0,25ng L<sup>-1</sup>

## Parte II

Para evaluar la precisión intra-ensayo de las medidas, se determinó el número de impactos de 4 cronoamperogramas distintos ( $n=4$ ) de un estándar de AgNPs de 60nm, 50ng L<sup>-1</sup> ( $4,21 \cdot 10^7$  partículas L<sup>-1</sup>), entre 1s y 5s. Se registró una media de 270 impactos con una %RSD de 10%.

El número de impactos no depende del diámetro de las nanopartículas, sino de su número total. Para estudiar esta variable, se midieron disoluciones estándar de forma replicada ( $n=4$ ), concentraciones de AgNPs de 10 y 60nm que contenían el mismo número  $4,21 \cdot 10^7$  partículas L<sup>-1</sup>. Para un tiempo de medida entre 1 y 5s., se midieron un total de  $271 \pm 18$  y  $265 \pm 16$  impactos para diámetros de 10 y de 40nm, respectivamente. No hay diferencia significativa entre ambos valores (test t,  $P=0,05$ ). Por lo que, si bien el tamaño de las AgNPs influye en su coeficiente y velocidad de difusión, este cambio no influye significativamente en la frecuencia de los impactos sobre el electrodo de trabajo.

Con estos resultados obtenidos con los estándares de tamaño y concentración de AgNPs, en la siguiente parte se aplicó la PCC a la cuantificación de AgNPs en muestras comerciales de disoluciones de plata coloidal. El único tratamiento de las muestras consistió en su dilución con agua para obtener disoluciones muy diluidas (número de partículas entre  $4,5 \cdot 10^5$  y  $4,5 \cdot 10^7$  partículas L<sup>-1</sup>), tomando como referencia inicial las concentraciones dadas por el fabricante. Los resultados se muestran a continuación, y se comparan con los obtenidos con otras técnicas instrumentales.

### Parte III

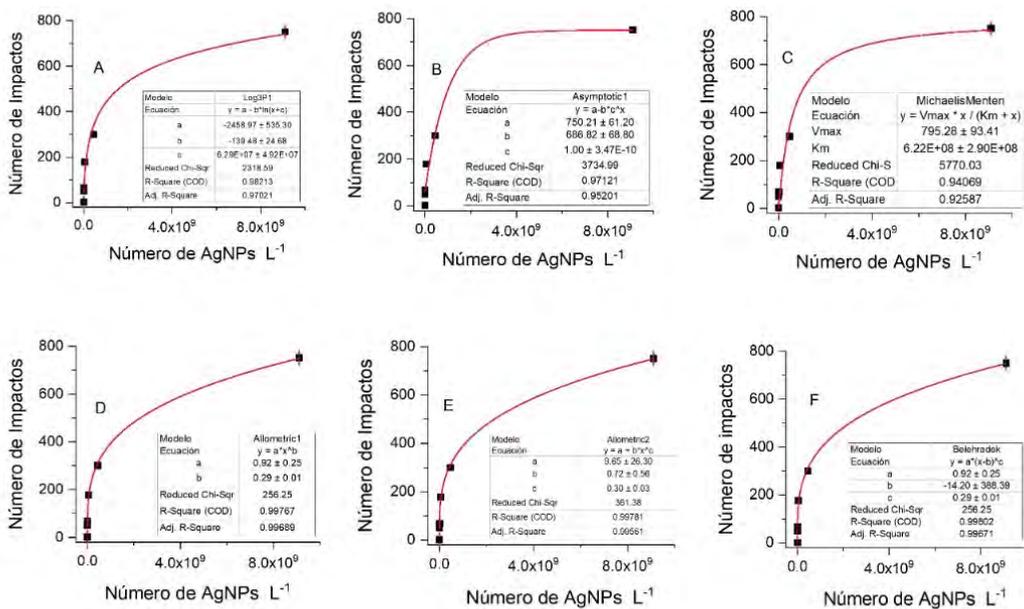


Figura 33. Ajustes no lineales de la función del número en impactos (de 0,5 a 10s) relacionadas con el número de AgNPs L<sup>-1</sup> (10nm de diámetro). Se midió un total de 5 concentraciones de AgNPs en potencias de 10 en el rango de 4,5·10<sup>5</sup> a 4,5·10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>.

Concentraciones mayores de AgNPs L<sup>-1</sup> a las del rango lineal anterior, se desvían de la linealidad tendiendo a disminuir a mayores concentraciones. Este efecto se muestra en la Figura 33. Al objeto de comprobar el motivo de este comportamiento, se midieron los impactos entre números de concentración de AgNPs 4,549·10<sup>5</sup> y 9,099·10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, y se modelizaron con funciones de distinto significado (logarítmico, exponencial, potencia y crecimiento). Los tipos de funciones se muestran en la misma figura. Los mejores ajustes no lineales se obtuvieron para una función alométrica  $F(x) = a + bx^c$  y Belehradok  $F(x) = a(x - b)^c$  (función de potencia con variación de x), tomando como elemento de comparación el ajuste del coeficiente de correlación R y el valor Chi-cuadrado. La función *Allometric2* es una extensión del modelo clásico de adsorción sobre una superficie sólida (isoterma de adsorción). Lo que sugiere que altas concentraciones de AgNPs tienden a adsorberse sobre el electrodo en el tiempo en el que se realizan las medidas cronocoulombimétricas.

## 2.4.2 Cuantificación de AgNPs en productos de consumo. Comparación de métodos

El método *PCC* optimizado se empleó para la cuantificación de AgNPs (en presencia de altas concentraciones de Ag(I) en muestras reales de disoluciones coloidales de plata, comercializadas para su uso antibactericida y como complementos alimenticios, con las denominaciones comerciales *High Stability™*, *Biovedik™* y *Wellness Colloidal Silver™*. Estas disoluciones tienen especificaciones de contenido dadas por el fabricante, y resumidas en el apartado de disoluciones y reactivos.

Los resultados de distribución de tamaños medidos por *PCC* se compararon con los medidos con microscopía electrónica (*FESEM*, *TEM*) y *SP-ICP-MS*.

Para las medidas *PCC*, el único tratamiento de muestra fue su dilución en electrolito soporte ( $\text{NaClO}_4$  0,02M). Las muestras *SP-ICP-MS* se diluyeron con agua MQ, mientras que para las determinaciones por microscopía electrónica no fue necesaria su dilución. La descripción completa de la preparación de las muestras se describe en el apartado 2.3.4.

La Figura 34 muestra los resultados de la determinación de los tamaños de AgNPs mediante análisis *TEM* (n=154) y *PCC* (n=474) y sus distribuciones de tamaño de la muestra *Wellness Colloidal Silver™*. El análisis estadístico (prueba t de dos muestras,  $P < 0,05$ ) mostró que no hay diferencias significativas en las distribuciones de tamaños obtenidas por los métodos *TEM* y *PCC* para un nivel de confianza del 95%.

Las medidas *SP-ICP-MS* de *Wellness Colloidal Silver™* no fueron precisas. El valor de corte (diámetro mínimo que puede medirse en las condiciones indicadas) para esta muestra fue de 8nm, por lo que partículas más pequeñas presentes en la muestra, que se observaron en el análisis *TEM* y *PCC*, no fueron detectadas. Esto produjo que se obtuviera una distribución de tamaños incompleta, obteniéndose un tamaño medio de AgNPs mayor que el real ( $26,50 \pm 0,05 \text{nm}$ ). La obtención de una distribución incompleta también tiene una repercusión negativa en la cuantificación las AgNPs. En este caso, las partículas con diámetros menores que 8nm no son “contadas” produciendo una subestimación de la

concentración en número [111]. La cuantificación de las AgNPs por *PCC* y por *SP-ICP-MS* se encuentran resumidas en la Tabla 11.

En las medidas *SP-ICP-MS* el valor de corte depende del medio, de la cantidad de plata disuelta y del tamaño de las nanopartículas, por lo que varía para cada muestra.

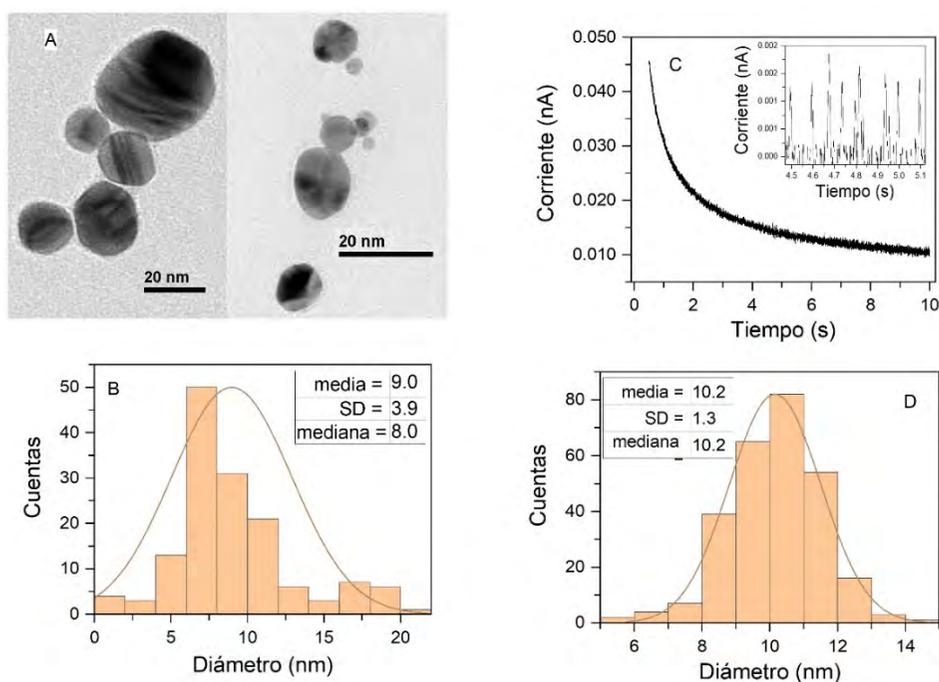


Figura 34. Muestra *Wellness Colloidal SilverTM*: (A) imagen TEM; (B) Distribución del tamaño de TEM; (C) Cronoamperograma, muestra diluida en  $\text{NaClO}_4$  0,02M. (1/108,36) (v/v), recuadro: picos de corriente transitorios; y (D) Histograma de tamaño medido por el método *PCC*.

La Figura 35 muestra los resultados del análisis de la determinación de los tamaños de AgNPs mediante el análisis *FESEM* ( $n=301$ ) y *PCC* ( $n=878$ ) y sus distribuciones de tamaño para la muestra *BiovedikTM*. El análisis estadístico (prueba t de dos muestras,  $P = 0,05$ ) mostró que no hay diferencias significativas en las distribuciones de tamaños obtenidas por los métodos *FESEM* y *PCC* para un nivel de confianza del 95%.

El valor de corte para esta misma muestra de las medidas *SP-ICP-MS* fue de 30nm, debido al alto contenido en iones  $\text{Ag(I)}$ , que influyen negativamente en las medicas de esta

técnica instrumental. Las partículas más pequeñas de la muestra, que fueron observadas en el análisis *FESEM* y *PCC*, no se detectaron por *SP-ICP-MS*. Por esta razón, la determinación de la distribución de tamaño por el método *SP-ICP-MS* para la muestra *Biovedik™* fue de  $56,0 \pm 3,9$  nm, valores significativamente más altos que los obtenidos por *FESEM* y *PCC*.

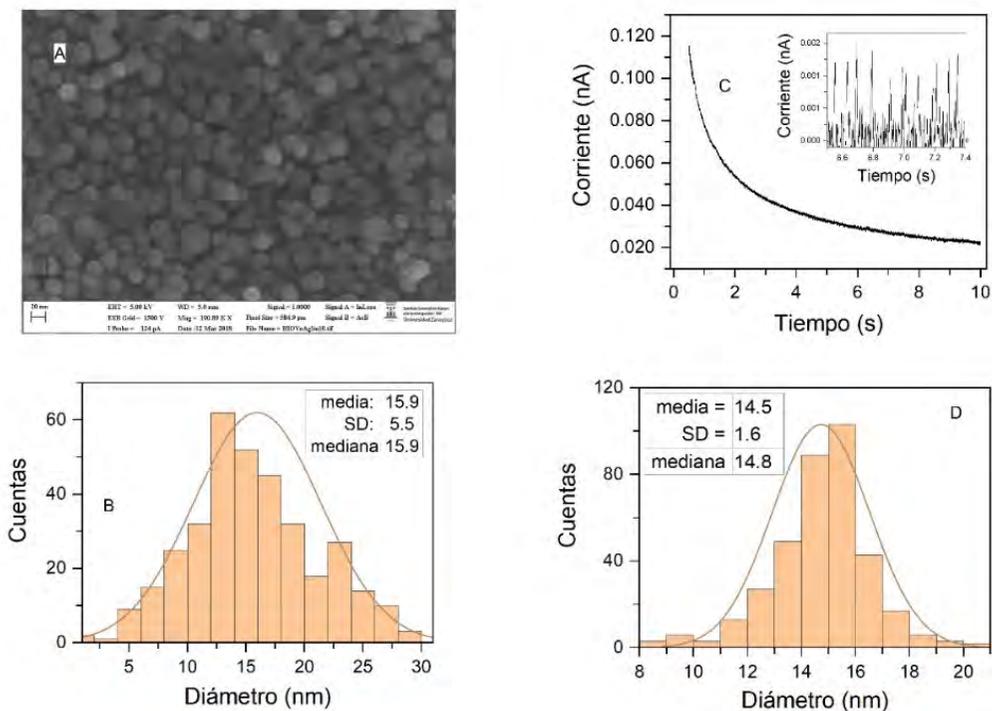


Figura 35. Caracterización de la muestra *Biovedik™*: (A) imagen TEM; (B) Distribución del tamaño de TEM; (C) Cronoamperograma, muestra diluida en  $\text{NaClO}_4$  0,02M. (1/107,27) (v/v), recuadro: picos de corriente transitorios; y (D) Distribución de tamaño PCC.

La Figura 36 muestra los resultados de la determinación de los tamaños de AgNPs mediante el análisis *FESEM* ( $n=277$ ) y *PCC* ( $n=165$ ), con sus histogramas de frecuencia, de la muestra de *High Stability™*. El análisis estadístico (prueba t de dos muestras,  $p < 0,05$ ) mostró que no hay diferencias significativas en las distribuciones de tamaños obtenidas por los métodos *FESEM* y *PCC* para un nivel de confianza del 95%.

### Parte III

La distribución de tamaño obtenida para la muestra *High Stability*<sup>TM</sup> por el método *SP-ICP-MS* no mostró diferencias significativas las distribuciones de tamaños en las medidas *FESEM* y *PCC*. En este caso, el valor de corte fue de 12nm, la media y la mediana de las distribuciones fue de  $16\pm 3$ nm.

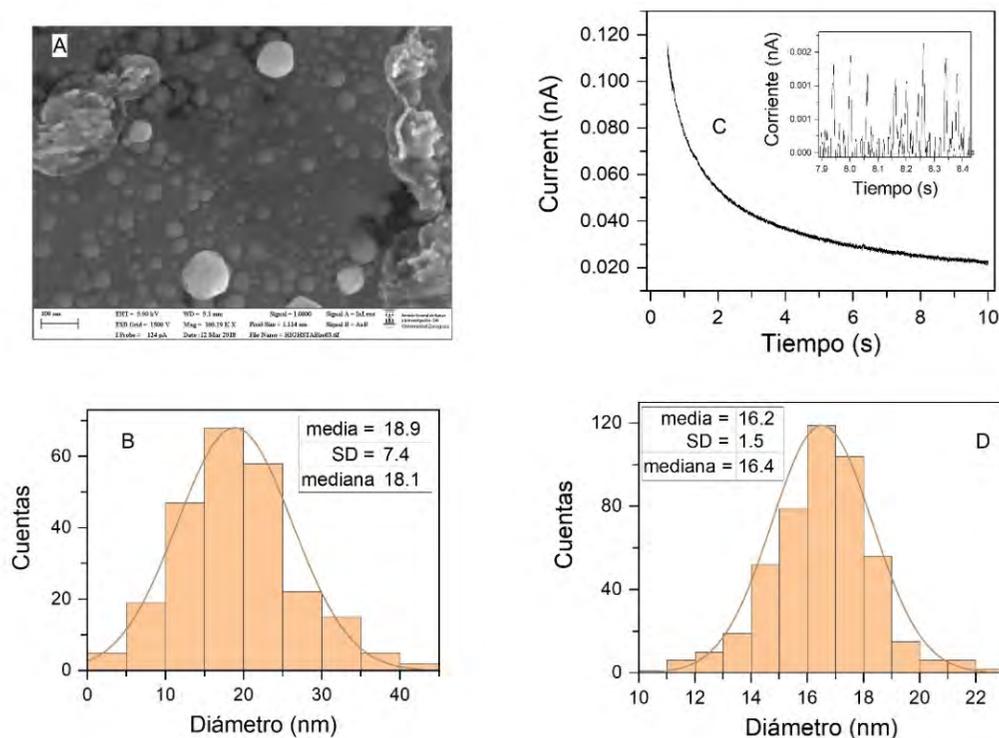


Figura 36. Caracterización de la muestra *High Stability*<sup>TM</sup>: (A) imagen TEM; (B) Distribución del tamaño TEM; (C) Cronoamperograma, muestra diluida en  $\text{NaClO}_4$  0.02M. (1/107,33) (v/v), recuadro: picos de corriente transitorios; y (D) distribución de tamaño PCC.

Los valores de concentración numérica de AgNPs  $\text{L}^{-1}$  en las tres muestras, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.4.1, se resumen en la tabla 2. El método *PCC* mostró resultados ligeramente más altos que los medidos por *SP-ICP-MS*, debido a que las partículas con diámetros menores al valor de corte en *SP-ICP-MS* no son tenidas en cuenta en la cuantificación de AgNPs, sino que se cuantifica como ruido de fondo por debajo del punto de corte (plata iónica). En la muestra *High Stability*<sup>TM</sup> la determinación de tamaños de AgNPs por las técnicas *PCC* y *SP-ICP-MS* no mostraron diferencias significativas por lo

que la cuantificación en número de partículas por ambos métodos fue muy cercana. El motivo principal se debe a la baja concentración de iones Ag(I) en esta muestra.

La Tabla 11 resume el número de AgNPs L<sup>-1</sup> medidos en las 3 muestras con las técnicas descritas (PCC y SP-ICP-MS). Para validar la coherencia de los resultados, se comparan estos datos con las concentraciones medidas por espectrometría de absorción atómica de llama (AAS). Empleando AAS, se midieron las concentraciones totales de Plata de cada una de las 3 muestras. Después de una separación con ultrafiltración (tamaño de poro 3kDa), se midieron las concentraciones de plata iónica Ag(I) en las mismas muestras. Por diferencia entre ambos valores, se calcularon las concentraciones de AgNPs. Teniendo en cuenta el diámetro de las AgNPs en cada una de las 3 muestras, y el número de concentración AgNPs L<sup>-1</sup> medidos en PCC, los resultados de concentración en PCC no difieren significativamente de los medidos con AAS (test t,  $P=0,05$ ).

Tabla 11. Diámetro medio y desviación estándar de las AgNPs en las 3 muestras medidos con las técnicas instrumentales indicadas. Valores de número de concentración AgNPs L<sup>-1</sup> medidos por PCC y SP-ICP-MS

Muestras	Diámetros AgNPs (nm) (# AgNPs L <sup>-1</sup> )			
	PCC	SP-ICP-MS	VIP	FESEM/TEM
<i>Wellness Colloidal Silver</i> <sup>TM</sup>	10,2±1,3 (2,4·10 <sup>9</sup> ±2·10 <sup>8</sup> )	26,5±0,1 (3,81·10 <sup>8</sup> ±4·10 <sup>6</sup> )	24±6	9,0±3,9
<i>Biovedik</i> <sup>TM</sup>	14,5±1,6 (1,9·10 <sup>8</sup> ±3·10 <sup>7</sup> )	56,0±3,9 (2,3·10 <sup>7</sup> ±2·10 <sup>6</sup> )	30±20	15,9±5,5
<i>High Stability</i> <sup>TM</sup>	16,2±1,5 (1·10 <sup>7</sup> ±4·10 <sup>8</sup> )	16,0±3,0 (6,4·10 <sup>6</sup> ±5·10 <sup>7</sup> )	50±20	18,1±7,4

## Conclusiones

- Se ha demostrado la cuantificación selectiva de AgNPs, en presencia de Ag<sup>+</sup>, mediante depósito y posterior redisolución empleando voltametría de partículas inmovilizadas. Si bien, se ha calculado una redisolución parcial y poco reproducible.
- El recubrimiento de las nanopartículas inmovilizadas con el polímero perfluorado nafion produce una mayor retención de las AgNPs. Esta modificación del VIP permite superar las dificultades anteriores, y mejora la reproducibilidad de la oxidación en la determinación de AgNPs.
- El método VIP mejorado con el recubrimiento con nafion permite evaluar los tamaños de las nanopartículas de plata, encontrando una relación lineal entre desplazamientos del potencial de pico y el logaritmo del diámetro de estas nanopartículas en el intervalo 20 a 100 nm.
- Se han optimizado condiciones teóricas y experimentales para la aplicación de técnicas de cronoculombimetría de impacto de partículas en muestras reales de plata coloidal. Los procedimientos PCC que se han desarrollado permiten la rápida identificación y caracterización de diámetros de las AgNPs, especialmente en presencia de otras especies de plata, en tamaños desde 20 a 100 nm.
- Otra de las aplicaciones de la PCC que se ha puesto a punto es su capacidad de cuantificación. Escogiendo las condiciones experimentales y el tratamiento matemático adecuados, la frecuencia de impactos sobre el electrodo tiene una relación lineal con el número de concentración de AgNPs L<sup>-1</sup>, trabajando con muy bajas concentraciones que aseguren el comportamiento individual de estas nanopartículas.
- Si bien las técnicas de impacto electroquímico tienen un soporte teórico muy extenso y consolidado en la bibliografía científica, el estado de su aplicabilidad en muestras reales es muy escasa. Se ha demostrado en nuestro trabajo que proporciona resultados de concentración con muy buenas propiedades analíticas (veracidad, sensibilidad y repetitibilidad).

## Parte II

- La PCC ha permitido determinar distribuciones de tamaños y número de nanopartículas de plata de muestras reales.
- Los resultados PCC en las muestras de plata coloidal estudiadas tuvieron valores medios $\pm$ SD de diámetro de las AgNPs: *Wellness* 10,2 $\pm$ 1,3nm; *Biovedik*<sup>TM</sup> 14,5 $\pm$ 1,6nm; y *High Stability*<sup>TM</sup> 16,2 $\pm$ 1,5nm. Estos valores no muestran diferencias significativas con los medidos con microscopía electrónica SEM/FESEM (test t, 95% nivel de confianza).
- El procedimiento PCC permite la cuantificación precisa del número de AgNPs L<sup>-1</sup> en muestras de plata coloidal y en presencia de altas concentraciones de plata iónica. Solamente existe una relación lineal entre el número total de impactos acumulados y el número de concentración AgNPs L<sup>-1</sup> en disoluciones muy diluídas, en las que cada partícula AgNP se comporta idealmente como una partícula individual (*Wellness* 2,4 $\pm$ 0,2x10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>); *Biovedik* 1,9 $\pm$ 0,3x10<sup>8</sup>; y *High Stability* 1,0 $\pm$ 0,4x10<sup>8</sup>.
- La información analítica de PCC es complementaria a la de otras técnicas, como SP-ICP-MS. Por ejemplo, en PCC se obtienen mejores resultados cuanto menor es el diámetro de las nanopartículas de plata, al producirse su oxidación más rápida durante los eventos de colisión (ca. 10nm). Al contrario que ocurre en SP-ICP-MS, que obtiene mejores resultados en los diámetros mayores (ca. 100nm), mientras que en PCC es preciso poner condiciones instrumentales que proporcionen mayores velocidades de transferencia de carga.
- El método PCC está menos interferido por la presencia de altas concentraciones de Ag(I). que el método SP-ICP-MS en la caracterización del tamaño y cuantificación de muestras que contienen AgNPs, sobretodo con diámetros muy pequeños (10-20nm). Lo que significa que ambas técnicas pueden dar información analítica complementaria, y dado que se basan en mecanismos físico-químicos de medida distintos.

## Parte. III

---



### III. Caracterización de las interacciones de nanopartículas de plata y plata iónica con ligandos antibióticos.

#### 3.1 Introducción y objetivos.

Es conocida la interacción que se produce entre iones metálicos y antibióticos, formando los correspondientes complejos de diferente estequiometría y estabilidad [112-114]. Estos complejos, sobre todo con los iones plata, pueden tener un efecto sinérgico en su capacidad bactericida, por lo que su estudio es importante [115]; [116]. La caracterización de estos complejos suele llevarse a cabo con técnicas analíticas instrumentales como EAM-UV-Vis [117], FT-IR [118], RMN [119] o X-Ray [120] entre otros métodos.

La amoxicilina (AMX), la enrofloxacina (ENRO) y la azitromicina (AZT) son tres antibióticos que pertenecen a las familias de los llamados  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas y macrólidos respectivamente. Estos antibióticos se caracterizan por su gran utilización tanto en humanos como en la medicina veterinaria, poseen un amplio espectro acción eliminando tanto a bacterias GRAM – positivas como GRAM – negativas [121]. Estos antimicrobianos de amplio espectro, se detectan con frecuencia en diferentes compartimentos ambientales, principalmente debido al metabolismo incompleto en el organismo objetivo, el tratamiento ineficiente de las aguas residuales y la eliminación de los mismos expirados directamente en el medio ambiente [122].

En este tipo de estudios de liberación al medio ambiente de antibióticos, biodisponibilidad, toxicidad, o sinergia de su capacidad antibactericida, la caracterización de su capacidad complejante y más específicamente con nanomateriales de plata es importante, y este trabajo de tesis pretende aportar información a este respecto.

El uso de las nanopartículas de plata (AgNPs) en diferentes industrias en la última década ha sufrido un aumento exponencial. Al introducir plata, estos productos adquieren la funcionalidad de ser 'antibacterianos', o más generalmente 'antimicrobianos' [2]. Así se reporta el uso de especies de plata en la industria textil para reducir olores indeseables en prendas de vestir. En la cosmética se han utilizado en la confección de lociones y

desodorantes [123]. También se han empleado en numerosas aplicaciones de biomedicina, en implantes médicos, y en otras aplicaciones [124].

El uso de antibióticos y su aparición en el medio ambiente ha recibido una atención significativa en los últimos años debido a la generación de bacterias resistentes a sus efectos antibactericidas. Algunos estudios describen también la actividad sinérgica antibactericida de especies de plata (sobre todo AgNPs) en combinación con antibióticos. Por esta razón es muy interesante e importante el estudio de sus interacciones y la formación de complejos entre ambas especies.

Por otro lado, el aumento del uso de las AgNPs trae consigo una mayor presencia en el medio ambiente. Dado que las AgNPs se transforman al cambiar su entorno (pH, presencia de iones o de moléculas) ya sea formando aglomerados, liberando plata iónica (Ag(I)) o asociándose con otras especies presentes en el medio, su influencia en el medio ambiente puede ser muy variable y es preciso estudiar el comportamiento de sus posibles formas físico-químicas. Por ejemplo, es muy interesante conocer las interacciones que pueden producirse entre las especies de plata Ag(I) y las AgNPs con los antibióticos los cuales también están dentro de grupo de los llamados *contaminantes emergentes*. No solo por la utilidad en la especiación sino también permitiría predecir la variación del poder antimicrobiano de la AMX, ENRO y AZT al combinarse con diferentes especies de plata. La caracterización de las AgNPs y la Ag(I) con este tipo de ligandos permitirá conocer mejor su biodisponibilidad, su toxicidad, su efecto bactericida sinérgico, o su capacidad de transporte en el medio ambiente, por ejemplo.

Estos tres antibióticos se han escogido en función de la importancia concedida en el marco del Proyecto OUTBIOTICS (EFA-183) (<http://outbiotics.unizar.es>), que coordinamos y en el que participamos. El objetivo general de este proyecto consiste en la eliminación o reducción de las concentraciones de antibióticos en las aguas naturales del territorio POCTEFA. Este Proyecto tiene como título: "*Tecnologías innovadoras para diagnóstico, prevención y eliminación de contaminantes emergentes (antibióticos) de las aguas del territorio POCTEFA*", y se desarrolla entre los años 2018 a 2021. Se desarrolla a través de tres objetivos específicos:

- 1) Diagnóstico de los niveles de contaminación por antibióticos en aguas cercanas y de influencia de explotaciones ganaderas.
- 2) Sustitución en producción ganadera de los antibióticos por nano-materiales, y validar su efecto.
- 3) Puesta en marcha de tecnologías innovadoras para la eliminación de antibióticos en las aguas del territorio.

A lo largo de sucesivas campañas semestrales, desde su comienzo en el año 2018, se han encontrado concentraciones relativamente altas y de forma generalizada del antibiótico enrofloxacin (0,35-4,4 ng mL<sup>-1</sup>), y concentraciones menores de azitromicina (del orden de 0.005 ng mL<sup>-1</sup>) y, sobre todo, de amoxicilina. De aguas tomadas en 40 puntos de muestreo (cuencas fluviales de Navarra, Aragón, Cataluña, Altos Pirineos y Pirineos Occidentales), y analizadas por el CNRS-IPREM (Pau, Francia) mediante cromatografía líquida espectrometría de masas. En el caso de la amoxicilina, uno de los antibióticos de mayor uso veterinario, sí se han detectado partes degradadas de su molécula. Si bien este antibiótico se libera al medio ambiente en cantidades importantes, se degrada fácilmente en las condiciones medioambientales, a la vez que pierde su acción antibactericida y su efecto contaminante.

La electroquímica es una herramienta muy útil en este sentido, ya que permite evaluar las interacciones entre la Ag(I) y las AgNPs con los antibióticos permitiendo el cálculo de constantes de estabilidad [125]. Sin embargo, los estudios por técnicas electroanalíticas de interacciones entre AgNPs y las moléculas de antibióticos son muy escasos. Dichos métodos suelen ser sencillos, permitiendo llevar a cabo los estudios a niveles de concentraciones de las especies de plata por debajo de las partes por millón [126]. En contraste con otras técnicas usualmente utilizadas en la caracterización de complejos como la FT-IR o el RMN donde las concentraciones de las muestras es una limitante [127]; [128].

Los objetivos de este capítulo son:

- Determinar la formación de complejos entre la AMX, ENRO y AZT con las Ag(I) y con las AgNPs por métodos voltamétricos.

- Calcular las constantes de formación de los complejos por el método de *Deford-Hume*.

## 3.2 Procedimientos experimentales.

### 3.2.1 Medidas de la absorbancia las disoluciones mezclas AMX-Ag(I) por EAM-UV-V.

Las disoluciones indicadas (m-0 a m-7; m\_10nm-0 a m\_10nm-5; m\_50nm-0 a m\_50nm-5 y disoluciones de AgNPs de 10nm, 20nm, 40nm, 60nm de 5mg L<sup>-1</sup>) se midieron en un rango de longitudes de onda específicos para cada tipo de muestra, comprendido entre 650nm y 200nm. La velocidad de barrido para todas las muestras fue de 100nm por minuto. Se realizó la correspondiente corrección de la línea base en cada grupo de muestras. Las medidas se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 3mL de capacidad y un paso óptico de 10mm.

### 3.2.2 Análisis de disoluciones de reacción por métodos electroquímicos.

#### ▪ Método DPV:

15mL de las muestras (Ag(I)-S0 a Ag(I)-S4) se transfirieron a una celda de vidrio de 20mL. Las medidas se llevaron a cabo con un sistema de 3 electrodos. Dos electrodos de platino uno de ellos de disco diámetro 1mm utilizado como electrodo de trabajo y el otro de hilo como electrodo auxiliar. Electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3M), conectado al potencióstato a través de un puente salino de KNO<sub>3</sub> 0,1M. Se realizó un barrido de potencial de 0,2V a -1,2V, con un incremento de paso ( $\Delta E$ ) de 5mV, una amplitud de modulación (impulso de potencial) ( $\Delta E_p$ ) de 0,05V, un tiempo de modulación ( $t_m$ ) de 0,05s y un tiempo de intervalo ( $t_p$ ) de 0,5s.

#### ▪ Método ASV:

15mL de las muestras (Ag(I)-A0 a Ag(I)-S4) se transfirieron a una celda de vidrio de 20mL. Las medidas se llevaron a cabo con un sistema de 3 electrodos. Un electrodo de trabajo de carbono vítreo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y como electrodo auxiliar un hilo de platino. El potencial se mantuvo por 120s a -0,2V y luego se realizó un barrido de oxidación de -0,2V a 1,0V ( $\Delta E_p=0,05V$ ,  $t_m=0,05s$ ,  $t_p=0,5s$ ).

▪ **Método de VIP:**

El electrodo de trabajo fue un electrodo de carbono vítreo al cual se le modificó su superficie con 5 $\mu$ L de las muestras (m\_10nm-0 a m\_10nm-5; m\_50nm-0 a m\_50nm-5). El disolvente de las muestras fue evaporado con corriente de N<sub>2</sub>(g) durante 5min. Las mediciones se realizaron con un sistema de tres electrodos y una celda que contenía 15mL KNO<sub>3</sub> 0,1M. El electrodo de trabajo fue el de carbono vítreo modificado, el electrodo de referencia de Ag/AgCl y el electrodo auxiliar de hilo de platino. El barrido de potencial se realizó desde -0,2V a 1,2V. ( $\Delta E_p=0,05V$   $t_m=0,05s$ ,  $t_p=0,5s$ ).

### 3.2.3 Medidas de las disoluciones de antibióticos con AgNPs por DLS.

Las muestras se midieron en cubetas de poliestireno de 10x10x45mm, a una temperatura de 25°C. El medio escogido fue acuoso y los valores de índice de refracción y viscosidad fueron 1,33 y 0,8872 respectivamente. El ángulo de medida fue de 173 con un tiempo de equilibrio de 120s, se realizaron 11 corridas de 10s de duración. Las medidas *DLS* se realizaron por triplicado sin tiempo de espera entre medidas. El estándar de tamaño utilizado fue una dispersión de poliestireno de 200nm de diámetro preparado a una concentración de 300mg L<sup>-1</sup> en H<sub>2</sub>O MQ.

### 3.2.4 Medidas de las disoluciones de antibióticos con AgNPs por HDC.

50 $\mu$ L de las muestras se inyectaron automáticamente en una columna PL-PSDA tipo 1 de longitud 80cm y diámetro interno de 7,5mm. El flujo de la fase móvil fue de 1,6mL min<sup>-1</sup>. La fase móvil estuvo compuesta por 0,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% Triton X-100, 0,013% SDS, 0,05% Formaldehído, 1mM DL-penicilamina. La duración del cromatograma fue de 11min.

La salida de la columna se conectó a un detector *UV-Vis* (Waters 996 *Photodiode Array detector*)

## Resultados y Discusión

### AMOXICILINA

#### 3.3 Caracterización de complejos de amoxicilina con plata iónica y nanopartículas de plata.

En esta sección se va a estudiar la interacción que se produce entre la amoxicilina (AMX) y diferentes especies de plata (Ag(I) y AgNPs 10nm y 50nm, empleando métodos electroquímicos (voltametría directa y voltametría de redisolución). Utilizando el método de *Deford-Hume* estimaremos las constantes de formación de dichos complejos [129]. Los resultados de las medidas electroquímicas serán complementados con los obtenidos por otras técnicas típicas de caracterización de complejos; espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible (*EAM UV-Vis*), Dispersión de luz dinámica (*DLS*) y Cromatografía hidrodinámica (*HDC*).

Se ha publicado un número reducido de trabajos que indican la interacción y formación de complejos entre la AMX con Ag(I) y con AgNPs [130]; [131]. Estos complejos se caracterizaron por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (*FTIR*), observando la desaparición de las señales de absorbancia del grupo carbonilo (-C=O) e hidroxilo (-OH) de la amoxicilina al ponerse en contacto con Ag(I) o con AgNPs [131]. La microscopía electrónica de barrido (*FESEM*) es otra de las técnicas que se han utilizado en la caracterización de AMX con AgNPs, y en este caso se observa una morfología desigual en las AgNPs que han sido sintetizadas en presencia de AMX con respecto a las que no lo fueron [132]. Además de los métodos antes mencionados, la *EAM UV-Vis* también se ha utilizado con el objetivo de caracterizar los complejos AMX con Ag(I) y AgNPs, con esta técnica se han observado cambios en las bandas de absorción de la AMX.

En esta sección se proponen nuevas herramientas para la caracterización de los complejos de AMX con Ag(I) y AgNPs, que no han sido estudiadas hasta la fecha. En *EAM UV-Vis* no solo se confirma la formación de los complejos desde el estudio de las bandas de absorción de la AMX, sino que además se analizan las variaciones en la banda de resonancia plasmónica de las AgNPs al formarse el complejo. Se calcula la estequiometría de estos complejos AMX-AgNPs con una variación del método de las relaciones molares.

Se ha determinado la constante de estabilidad del complejo AMX-Ag(I) por voltametría de redisolución anódica (*ASV*) y voltametría diferencial de pulsos (*DPV*), mientras que la voltametría de partículas inmovilizadas (*VIP*) se ha empleado para la determinación del complejo AMX-AgNPs. El método matemático utilizado para el cálculo de la constante fue el método de *Deford-Hume*. Esto constituye una contribución a la caracterización de complejos de especies de plata por vía electroquímica, el cual es un tema poco abordado.

Las técnicas Dispersión de luz dinámica (*DLS*) y Cromatografía hidrodinámica (*HDC*) mostraron que no hay agregación entre las AgNPs al ponerse en contacto con la AMX.

A continuación, se resumen los resultados encontrados en la caracterización de los complejos AMX-Ag(I) y AMX-AgNPs por las técnicas *EAM UV-Vis*, electroquímicas, *DLS* y *HDC*.

### 3.3.1 *EAM UV-Vis* en la caracterización de complejos de amoxicilina con plata iónica y nanopartículas de plata.

La *EAM UV-Vis* es una técnica ampliamente utilizada en la determinación de constantes de formación de especies que forman complejos en disolución [133]. Dando además información estequiométrica de dichos compuestos. Las mediciones de absorbancia de manera general no afectan el equilibrio del sistema, lo que refuerza la utilidad de esta técnica en la determinación de constantes de equilibrios.

La amoxicilina (AMX) es el ácido (2S,5R,6R)-6- [(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tio-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico (Figura 37) [121]. Es un derivado de la penicilina, presentando en su estructura un anillo de tiazolidina y un anillo  $\beta$ -lactámico que caracteriza a este grupo de antibióticos.

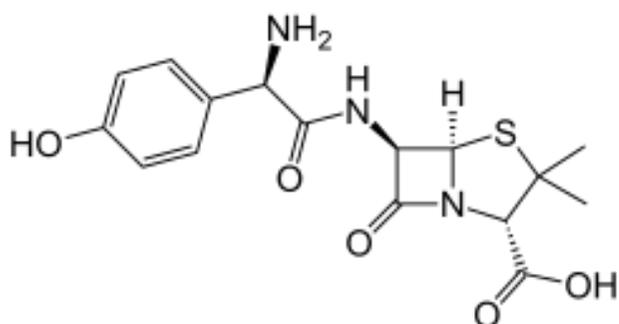


Figura 37. Estructura química de la amoxicilina.

El espectro de absorción molecular de la amoxicilina, que se muestra en la Figura 38 se caracteriza por presentar dos máximos de absorción uno a 272nm (AMX\_B2) y el otro a 228nm (AMX\_B1) [134]. El máximo de absorción a 272nm pertenece a las transiciones entre los orbitales  $n-\pi^*$  del anillo  $\beta$ -lactámico o bien a la banda secundaria de absorción ( $\alpha$ ) del benceno producida por las transiciones  $\pi-\pi^*$ . Se observa un hombro alrededor de 280nm (AMX\_B3), debido al desdoblamiento de las dos bandas, siendo la de 272nm el resultado de las transiciones  $n-\pi^*$  y la de 280nm a la banda  $\alpha$  del benceno producida por las transiciones  $\pi-\pi^*$ .

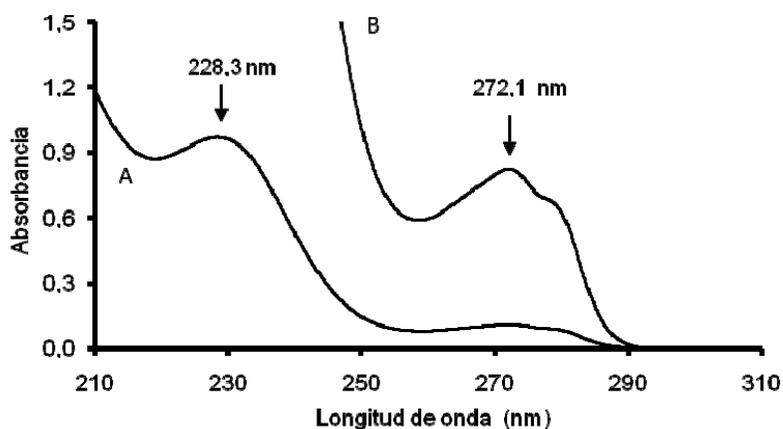


Figura 38. Espectro de absorción molecular de la amoxicilina [134]

El máximo en 228nm puede atribuirse a la primera banda primaria ( $\rho$ ) del benceno la cual, aunque tiene un valor de base de 204nm puede desplazarse batocrómicamente en bencenos sustituidos por grupos cromóforos (-OH) al presentar un acentuado carácter de transferencia de carga entre el anillo aromático y el sustituyente.

### 3.3.2 Estudio del complejo AMX-Ag(I) por EAM UV-Vis.

Se estudió la variación del espectro de absorción molecular de una disolución de AMX de concentración 0,15mM con la adición de concentraciones crecientes de Ag (I) (1,5mM, 3mM, 9mM, 12mM, 15m, 30mM). Las diferentes disoluciones se identificaron como: **m-0**; **m-1** **m-2**; **m-3** **m-4**; **m-5**; **m-6**; **m-7**. La Tabla 1 muestra las composiciones de estas disoluciones.

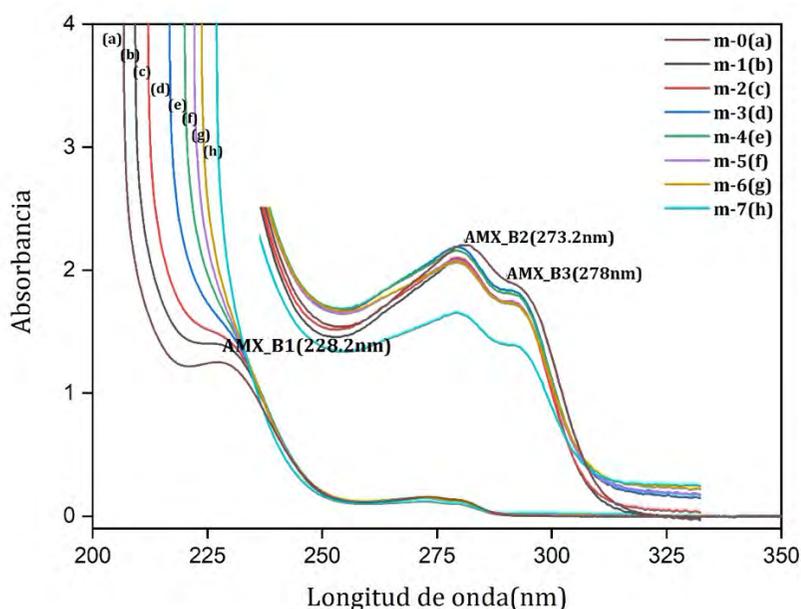


Figura 39. Espectro de absorción molecular de las disoluciones de AMX con Ag(I): (a) 0mM(marrón); (b) 1,5mM(negro); (c) 3mM(rojo); (d) 6mM(azul); (e) 9mM(verde); (f) 12mM(azul); (g) 15mM(amarillo) y (g) 30mM (amarillo).Velocidad de barrido 100nm min<sup>-1</sup>.

El espectro obtenido, muestra en todos los casos las bandas de absorción detalladas anteriormente: máximos de absorbancia AMX\_B1, AMX\_B2 y AMX\_B3 (228,2nm; 273,2nm; 278nm (hombro)) (Figura 39).

El espectro de absorción de la AMX se modifica notablemente al añadir concentraciones crecientes de iones plata, debido a los cambios estructurales que se producen en la molécula al complejarse con grupos funcionales que forman parte de los grupos cromóforos de la AMX. Se observa un aumento de la absorbancia a 228nm o desplazamiento hipsocrómico con la adición de Ag(I). Los máximos de absorbancia a 273,2nm y a 278nm no muestran variación marcada en las áreas ni en las longitudes de onda, pero sí se observa un ligero desplazamiento hipsocrómico de estas bandas. Estos desplazamientos se producen por la formación del complejo AMX-Ag(I) a través de los grupos carbonilos. La Ag(I) interacciona con los grupos carbonilos limitando la deslocalización electrónica de los electrones no enlazantes presentes en estos grupos, lo que explica el desplazamiento hipsocrómico.

### 3.3.3 Estudio del complejo AMX-AgNPs por EAM UV-Vis

Partimos de la hipótesis de que moléculas de AMX pueden interactuar con la superficie de las AgNPs de 10nm y 50nm, llegando a formar complejos o aductos estables, de igual forma a como se ha demostrado con iones metálicos o de otros antibióticos con otros tipos de nanopartículas [71], estudiamos las variaciones en la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR) de las AgNPs después de estar en contacto con diferentes concentraciones de AMX.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) de las nanopartículas de plata se produce por las oscilaciones colectivas de los electrones, restringidos en un pequeño volumen metálico. Esta banda solo es perceptible cuando la partícula es mucho menor que la longitud de onda incidente y su posición varía con el tamaño de la misma. Experimentalmente se ha observado un desplazamiento batocrómico con el aumento del tamaño de la partícula. Algunos autores sugieren que esto se debe a que en cuanto la partícula deja de ser mucho más pequeña que la longitud de onda incidente, además de los efectos electrostáticos hay que tener en cuenta efectos electrodinámicos. Además, al aumentar el diámetro de la partícula aparecen efectos importantes de distorsión en la amplitud y la fase del campo electromagnético al atravesar la radiación la NP, lo que

conlleva a que la longitud de onda de la *SPR* sea mayor. En partículas relativamente grandes no se puede asumir que el campo eléctrico en el interior de la partícula sea constante, lo que se traduce en ensanchamiento de la banda de absorción [135].

La figura muestra los espectros de absorción molecular de dispersiones de 10nm (negro), 20nm (rojo), 40nm (azul) y 60nm (verde) de AgNPs a una concentración de  $5\text{mg L}^{-1}$  en agua MQ. En esta figura se puede observar el desplazamiento batocrómico y el ensanchamiento de la banda *SPR* con el aumento del diámetro de las AgNPs. La longitud de onda del máximo de absorbancia permite también de forma rápida evaluar mediante *EAM UV-Vis* el tamaño de las AgNPs empleadas, su concentración o su estado de agregación [136]

La densidad de portadores de carga (electrones móviles) también tienen mucha influencia sobre la posición de la banda *SPR*. Este factor puede verse afectado por especies absorbidas sobre las nanopartículas ya sean donadores o aceptores de electrones, así como por el medio (naturaleza, polaridad del disolvente, pH y fuerza iónica). La sensibilidad de la banda *SPR* con el entorno proporciona, por lo tanto, información para el estudio de las interacciones entre las nanopartículas de plata y las moléculas de AMX. Para ello, se dejaron reaccionar concentraciones constantes de AgNPs con concentraciones variables de AMX y se evaluaron los cambios ocurridos en la banda *SPR*.

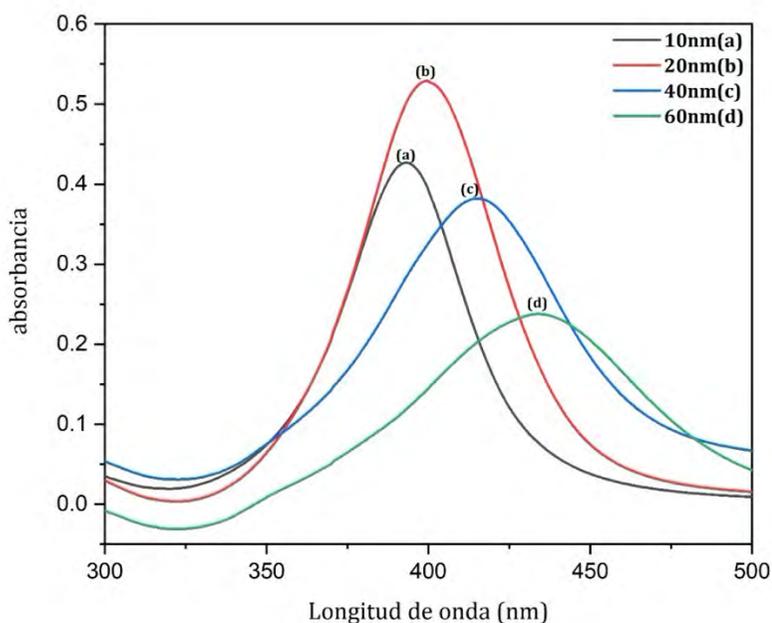


Figura 40. Espectros de absorción molecular de dispersiones de AgNPs de diámetros: (a) 10nm (negro); (b) 20nm (rojo); (c) 40nm (azul); y (d) 60nm (verde) de AgNPs. La concentración de AgNPs fueron de  $5\text{mg L}^{-1}$  en agua MQ. Velocidad de barrido de  $100\text{nm min}^{-1}$ .

Se prepararon dispersiones de AgNPs de 10nm cubiertas de aniones citratos y AgNPs 50nm cubiertas por polivinilpirrolidona (PVP) de  $0,05\text{mM}$  a partir de patrones de  $0,02\text{mgm L}^{-1}$  y  $50\text{mgm L}^{-1}$ , respectivamente. Los patrones de AgNPs se sometieron durante 120s a ultrasonidos antes de hacer las diluciones necesarias para obtener dispersiones de  $0,05\text{mM}$ . La disolución patrón inicial de AMX de  $0,01\text{M}$  se preparó disolviendo  $91,35\text{mg}$  en  $0,1\text{mL}$  de KOH  $0,1\text{M}$  y enrasando con agua MQ hasta  $25\text{mL}$ .

Las mezclas (**m\_10nm-0** hasta **m\_10nm-5**) de  $0,05\text{mM}$  de AgNPs 10nm y AMX se prepararon en un volumen final de  $3\text{mL}$  de tampón *Britton-Robinson*  $0,01\text{M}$  pH 7. Las concentraciones de AMX variaron de  $0\text{mM}$  a  $5\text{mM}$  siendo la composición de las mezclas: **m\_10nm-0**; **m\_10nm-1**; **m\_10nm-2**; **m\_10nm-3**; **m\_10nm-4**; **m\_10nm-5** las que se muestran en la Tabla 3. Las mezclas se dejaron interaccionar durante 18h. a temperatura

ambiente sin agitación. Al terminar la incubación se observó un cambio de coloración de las muestras, como muestra la Figura 41.

El máximo de absorción de la banda *SPR* de **m\_10nm-0** se encontró en los 395,3nm en concordancia con Figura 40, y con una absorbancia (A) de 0,746. Para esta muestra se registró un ancho de banda (W) de 323,8nm a 500nm. Definimos el ancho de banda como el rango de longitudes de onda donde la banda *SPR* presenta valores de absorbancia (A) por encima de cero. La mezcla **m\_10nm-1** no mostró cambios significativos con la muestra **m\_10nm-0**. El máximo de absorción de la banda *SPR* se encontró en los 393,8nm con una intensidad de 0,736; no se observó ningún cambio en el ancho de la señal de la muestra **m\_10nm-1** con respecto a **m\_10nm-0**. En los espectros de las mezcla **m\_10nm-1** a la **m\_10nm-4** se pudieron observar las bandas pertenecientes a la amoxicilina AMX\_B2 y AMX\_B3 a 271,4nm y 280,0nm respectivamente (Figura 42).

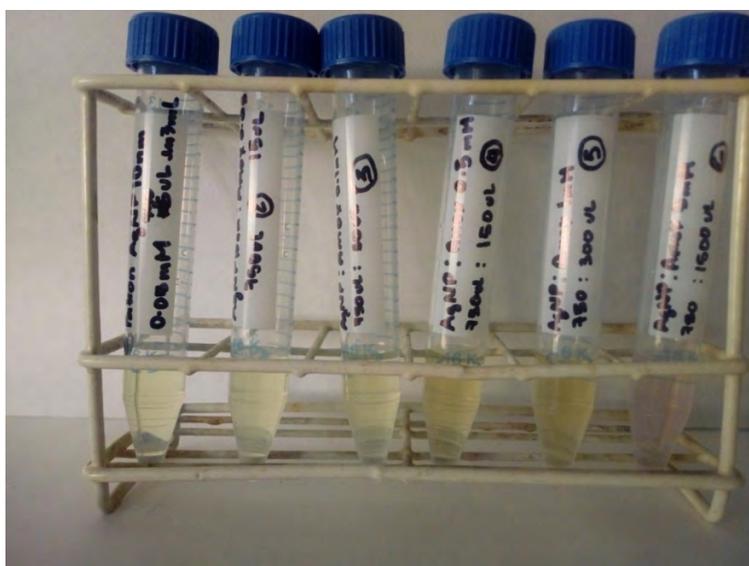


Figura 41. Cambio de coloración en las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**. Este cambio se muestra en orden creciente de izquierda a derecha.

Las absorbancias de las bandas de la AMX están de acuerdo con las observadas en las de la Figura 38. La banda AMX\_B1 no se observa porque ha saturado la señal al ser muy intensa y encontrarse la AMX a una concentración de 0,05mM.

En general, se puede decir que a partir de la mezcla **m\_10nm-2** (a partir de una relación molar 1:2 AgNPs:AMX) se observó un ensanchamiento de la banda *SPR* de las AgNPs de 10nm seguido de un desplazamiento batocrómico de dicha señal (Figura 42). Este resultado es consistente con el aumento del tamaño de la nanopartícula, que es debido a la unión de las moléculas de AMX sobre la superficie de las AgNPs. El campo magnético de la partícula deja de ser constante, produciéndose una distorsión de la amplitud y la fase del campo magnético al atravesar la nanopartícula, produciendo tanto el desplazamiento a mayores longitudes de ondas como el ensanchamiento de las bandas *SPR*. Por otra parte, la perdida de la relación de intensidades de absorbancia entre las señales AMX\_B2 y AMX\_B3 puede deberse a la interacción del carbonilo del grupo  $\beta$ -lactámico con la superficie de la AgNPs de 10nm.

La Tabla 12 muestra un resumen de los datos espectroscópicos de las medidas anteriores.

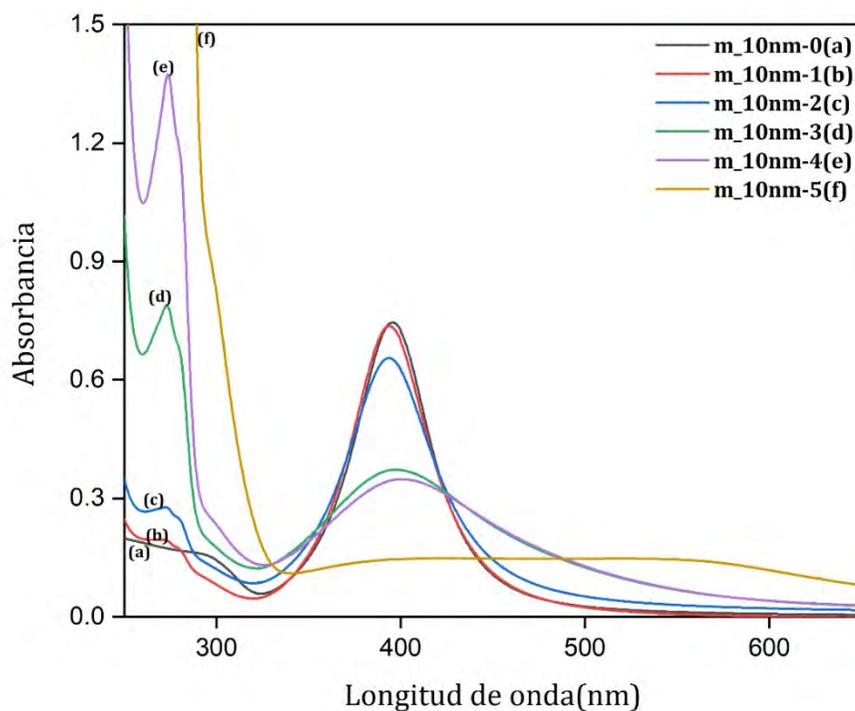


Figura 42. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 10nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta); (f) 5mM(amarillo). Velocidad de barrido de 200nm min<sup>-1</sup>.

El recubrimiento de las AgNPs-10nm con moléculas de AMX formando el complejo AMX-AgNP-10nm, provoca un aumento en el tamaño de estas nanopartículas. En el patrón comercial de AgNPs-10nm estas se encuentran recubiertas de aniones citratos [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub>]<sup>3-</sup>] cuya masa molecular (189g/mol) es menor que la de la AMX (365,4g/mol<sup>-1</sup>) por lo que un cambio de recubrimientos aumentaría el tamaño de la misma. Nuestros resultados son concordantes con los encontrados por otros autores.

En los estudios de recubrimientos de las NP se ha observado una variación de la longitud de onda de la banda *SPR* y del ancho de las mismas con la variación del recubrimiento en NP de igual tamaño. Los iones citratos se enlazan débilmente sobre la superficie de las NPs y pueden ser remplazados por ligandos de mayor afinidad [137]. En nanopartículas de oro (AuNPs) recubiertas por aniones citratos se observó un desplazamiento de la banda *SPR* hacia mayores longitudes de onda y un ensanchamiento de la banda cuando se pusieron a reaccionar con albumina de suero bobino (*BSA*). El análisis *TEM* mostró que el desplazamiento se debía a un aumento de tamaño de alrededor de 4nm consistente con el tamaño de la *BSA*. En este mismo estudio se observó un desplazamiento y un ensanchamiento de la banda *SPR*, aun mayor cuando se enlazó a la molécula *BSA* el anticuerpo *HER2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). En este caso el desplazamiento fue de 10nm al formarse el conjugado *AuNP-BSA-HER2* [138]. Otros estudios donde se evaluó la influencia del tamaño y el recubrimiento de las AuNPs sobre las propiedades fotoluminiscentes, también muestran un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda de la banda *SPR* con el aumento del tamaño del ligando (cuando se desplazó el citrato por el glutatión, cisteína o glucosa) [139]; [140]. Resultados similares se han obtenido con las AgNPs cuando se mezclaron con *BSA*. Las bandas *SPR* de las AgNPs recubiertas por iones citratos o *PVP* se desplazaron y ensancharon al combinar las AgNPs con *BSA* [141].

Tabla 12. Resumen de los parámetros espectrofotométricos encontrados en las mezclas m\_10nm-0 a m\_10nm-5.

Mezcla	m_10nm-0	m_10nm-1	m_10nm-2	m_10nm-3	m_10nm-4	m_10nm-5
$\lambda$ (SPR) <sup>a</sup> nm	395,6	393,8	393,4	397,2	401,0	494,2
A(SPR) <sup>b</sup> nm	0,746	0,736	0,656	0,373	0,348	0,147
W (SPR) <sup>c</sup> nm	323,8-500	323,8-500	319,8-572,2	320,8-650	325,8-650	340,4-650
$\lambda$ (AMX_B3) <sup>d</sup> nm	-	280	279,4	280	-	-
A (AMX_B3) <sup>e</sup>		0,172	0,251	0,676	-	-
$\lambda$ (AMX_B2) <sup>f</sup> nm		271,4	271,2	273	273	saturada
A(AMX_B2) <sup>g</sup>		0,195	0,277	0,789	1,372	saturada

<sup>a</sup> $\lambda$ (SPR), longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>b</sup>A(SPR), Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 10nm;

<sup>c</sup>W(SPR), Ancho de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>d</sup> $\lambda$ (AMX\_B3), longitud de onda del máximo de absorción de la banda AMX\_B3 de la AMX; <sup>e</sup>A(AMX\_B3),

Absorbancia de la banda AMX\_B3 de la AMX; <sup>f</sup> $\lambda$ (AMX\_B2), longitud de onda del máximo de absorción de la banda AMX\_B2 de la AMX; <sup>g</sup>A (AMX\_B2),

Absorbancia de la banda AMX\_B2 de la AMX

La EAM-UV-Vis, además de ser una herramienta valiosa en el cálculo de constantes de formación de complejos en disolución, también es útil en la determinación de la estequiometría de dichos complejos.

El método de relaciones molares permite determinar la estequiometría de los complejos. En este método se representa la absorbancia frente a la variación de la relación molar de los reactantes metal y ligando [142]. Para esto se preparan disoluciones en las cuales la concentración analítica de un reactivo, casi siempre el catión, se mantiene constante mientras la del otro varía para obtener relaciones molares del complejo. Para constantes de formación elevadas se obtiene un gráfico con dos rectas de diferentes pendientes que se cortan en una relación molar que corresponde a la relación estequiométrica del complejo. Para complejos menos estables, se observa desviación de la linealidad de las rectas debido a la disociación de los complejos durante la medida de la absorbancia. En estos casos, se puede hacer una extrapolación de método para obtener resultados, trazando líneas tangenciales a la curva, y siendo la estequiometría del complejo la correspondiente a la relación molar de la intercepción de estas tangentes. Esta desviación de la linealidad depende también del grado de disociación del complejo.

Las disoluciones **m<sub>10nm-0</sub>** a **m<sub>10nm-5</sub>** permiten la estimación de la estequiometría del complejo AMX-AgNP<sub>10nm</sub>. En estas mezclas se mantiene una concentración de AgNP<sub>10nm</sub> constante (0,05mM) y concentraciones variables de AMX (0mM-5mM), como requiere el método [142]. En nuestro caso, aplicamos una variación al método consistente en representar la A frente a la relación del número de moléculas de AMX dividido entre el número de AgNP<sub>10nm</sub>, en lugar de la relación molar. Entendemos que el número de partículas describe mejor un sistema nanoparticulado que la concentración molar. Esta variación del método ya se ha utilizado previamente por otros autores [143]; [144]. El número de AgNP<sub>10nm</sub> fue calculado a partir de la concentración molar asumiendo forma esférica, densidad 10,49 g cm<sup>-3</sup>, masa moléculas 107,87 g/mol y diámetro de 10nm [145]. El número de moléculas AMX se calculó multiplicando la concentración molar de AMX con el número de Avogadro (6,022·10<sup>23</sup> moléculas).

En la Figura 43 se puede observar que el punto de unión de las dos rectas sitúa la relación estequiométrica en  $3,34 \cdot 10^7$  moléculas de AMX por cada AgNP de 10nm de diámetro.

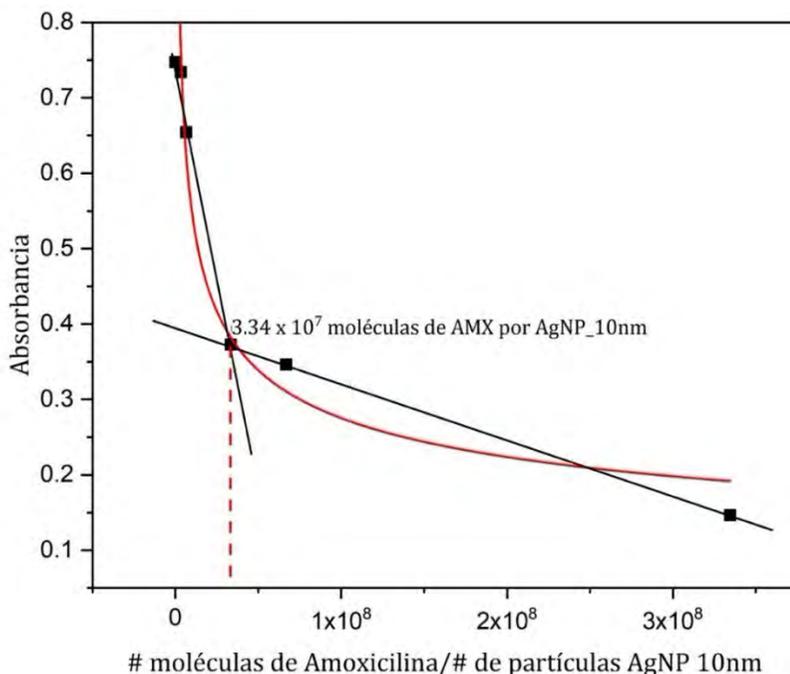


Figura 43. Variación del método de las relaciones molares para la determinación de la estequiometría del complejo de AMX con AgNPs de 10nm. La línea discontinua roja representa la estequiometría del complejo

En el caso de las AgNPs de 50nm se prepararon mezclas (**m\_50nm-0** hasta **m\_50nm-5**) de 0,05mM de AgNPs 50nm y AMX (0mM a 5mM) se prepararon en un volumen final de 10mL de tampón *Britton-Robinson* 0,01M pH 7. La composición de las mezclas son las mismas que las utilizadas en las AgNPs 10nm (**m\_10nm-0** - **m\_10nm-5**). Las mezclas se dejaron interaccionar durante 18h. a temperatura ambiente sin agitación, y no se observaron cambios de coloración en las muestras. El máximo de absorción de la banda *SPR* de **m\_50nm-0** se encontró en los 428,2nm longitud de onda que se encuentra entre los observados para las AgNPs de 40nm y 60nm en la Figura 40. La A fue de 0,574. Para esta muestra se registró un ancho de banda desde 314,4nm hasta 650nm donde todavía la señal

no alcanza la línea base. En la mezcla **m\_50nm-1** no se observaron diferencias significativas en la  $\lambda_{max}$  de la banda *SPR* de la AgNP-50nm con respecto a la **m\_50nm-0**, pero sí una disminución de la A. El W de la banda *SPR* disminuyó con respecto al patrón de AgNPs 50nm (**m\_50nm-0**), encontrándose la banda entre 324,4nm y 650nm.

A partir de la mezcla **m\_50nm-1** se empiezan a observar las bandas de la AMX según lo esperado, la AMX\_B3 en 280nm y la AMX\_B2 en 272nm mostrando la relación de A de  $\sim 1:1$ . Las absorbancias de la AMX en la muestra **m\_50nm-5** saturan el espectro de absorción debido a la alta concentración del antibiótico en estas condiciones (Figura 44).

En general se puede decir que a partir de la mezcla **m\_50nm-2** se observó un estrechamiento de la banda *SPR* de las AgNPs de 50nm seguido de un desplazamiento hipsocrómico de dicha señal. Este resultado es consistente con la disminución del tamaño de la nanopartícula. En partículas más pequeñas se cumple mejor la condición de que la partícula debe ser mucho menor que la longitud de onda incidente, obteniéndose bandas de absorción más intensas y estrechas (Tabla 13).

Por otra parte, la variación en la relación de la A ( $\sim 1:1$ ) entre las señales AMX\_B2 y AMX\_B3 puede deberse a la interacción del carbonilo del grupo  $\beta$  – lactámico con la superficie de la AgNP de 50nm. Este resultado es consistente al obtenido en los espectros de AMX-AgNP-10nm lo que indica que las interacciones entre la AMX y las AgNPs son las mismas, aunque el tamaño y el recubrimiento de las nanopartículas sea distinto.

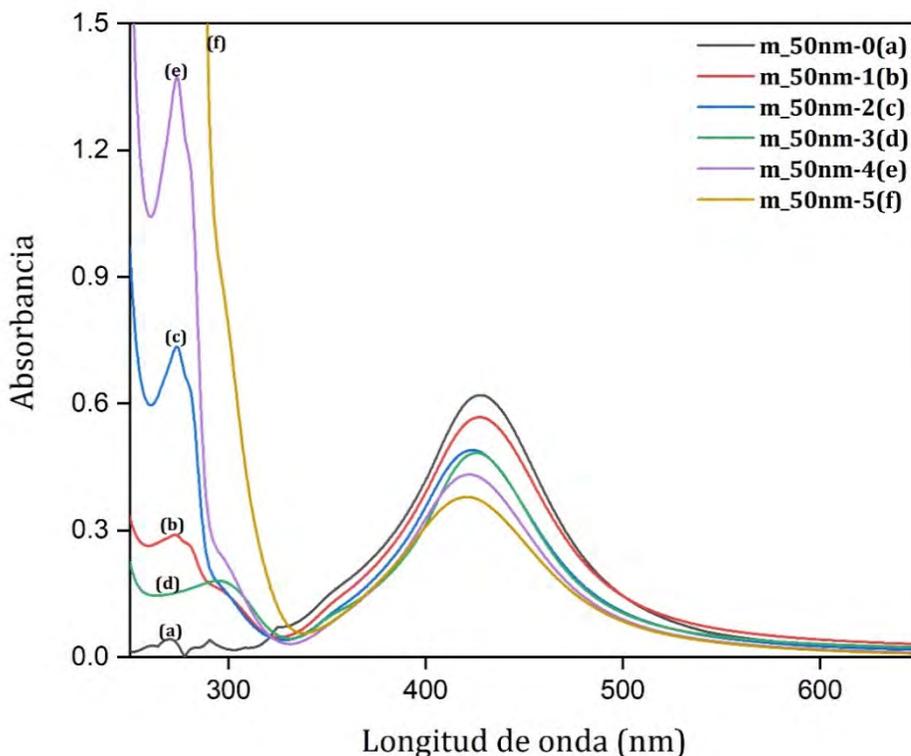


Figura 44. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 50nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta); (f) 5mM(amarillo). Velocidad de barrido de 200nm min<sup>-1</sup>.

En este caso un recubrimiento de la AgNP-50nm con AMX (AMX-AgNP-50nm) disminuye el tamaño de la misma debido a que estas se encuentran ya recubiertas por PVP [(C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>], polímero de tamaños entre 2,500 – 2,500,000 gmol<sup>-1</sup> en cualquier caso mayor que la masa molar de la AMX. En contraste con el complejo AMX-AgNP-10nm, donde las AgNP-10nm se encuentran recubiertas de aniones citratos los cuales tienen un menor tamaño que la AMX. La dependencia de la banda SPR con el tamaño de la molécula que recubre la NP ya se ha explicado con anterioridad en esta sección.

Tabla 13. Resumen de los parámetros espectrofotométricos encontrados en las mezclas m\_50nm-0 a m\_50nm-5.

Mezcla	m_50nm-0	m_50nm-1	m_50nm-2	m_50nm-3	m_50nm-4	m_50nm-5
$\lambda(\text{SPR})^a$ nm	427,8	427,6	423,6	424,6	422	420,2
A (SPR) <sup>b</sup>	0,620	0,568	0,490	0,483	0,432	0,379
W (SPR) <sup>c</sup> nm	314,4-650	324,6-650	329,8-650	334,6-650	333,4-650	339-650
$\lambda(\text{AMX\_B3})^d$ nm	-	280	-	293,8	-	-
A(AMX_B3) <sup>e</sup>	-	0,266	-	0,180	-	-
$\lambda(\text{AMX\_B2})^f$ nm	-	272	273,2	-	273,4	saturado
A(AMX_B2) <sup>g</sup>	-	0,289	0,733	-	1,369	saturado

<sup>a</sup> $\lambda(\text{SPR})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 50nm; <sup>b</sup>A(SPR), Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 50nm;

<sup>c</sup>W(SPR), Ancho de la banda SPR de AgNPs de 50nm; <sup>d</sup> $\lambda(\text{AMX\_B3})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda AMX\_B3 de la AMX; <sup>e</sup>A(AMX\_B3),

Absorbancia de la banda AMX\_B3 de la AMX; <sup>f</sup> $\lambda(\text{AMX\_B2})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda AMX\_B2 de la AMX; <sup>g</sup>A(AMX\_B2),

Absorbancia de la banda AMX\_B2 de la AMX

En la Figura 45 se muestra dependencia de la absorbancia con la relación entre el número de moléculas de AMX y el número de partículas de AgNPs de 50nm. Aplicando esta variación al método de las relaciones molares, se puede decir que cada AgNP de 50nm se encuentra rodeada de  $8,30 \cdot 10^8$  moléculas de AMX.

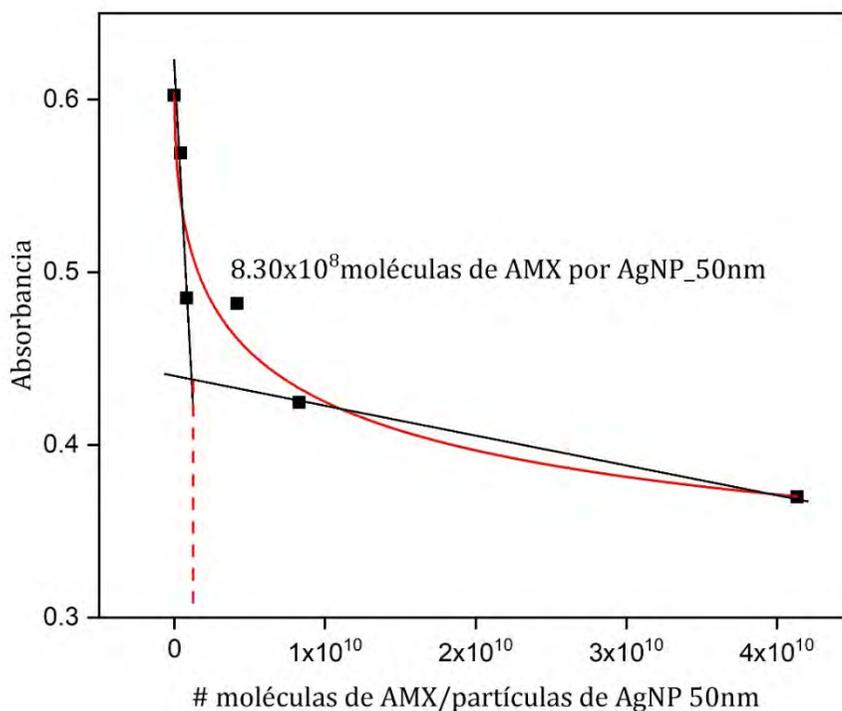


Figura 45. Variación del método de las relaciones molares para la determinación de la estequiometría del complejo de AMX con AgNPs de 50nm. La línea discontinua roja representa la estequiometría del complejo.

Los complejos AMX-AgNP-10nm mostraron una estequiometría de  $3,34 \cdot 10^7$  moléculas de AMX por cada AgNP mientras que los complejos AMX-AgNP-50nm  $8,30 \cdot 10^8$  moléculas. Este resultado tiene una explicación simplemente geométrica: cuanto mayor es el área de la nanopartículas mas moléculas de AMX pueden unirse sobre su superficie. El área de una AgNP, asumiendo forma esférica, se puede calcular mediante la ecuación 1:

$$A = 4\pi r^2 \quad (1)$$

Siendo  $314\text{nm}^2$  el área de una AgNP de  $10\text{nm}$  y  $7850\text{nm}^2$  el área de una AgNP de  $50\text{nm}$ . Si calculamos cuantas moléculas de AMX hay en  $1\text{nm}^2$  obtendremos que tanto para la estequiometría del complejo AMX-AgNP- $10\text{nm}$  como para la del AMX-AgNP- $50\text{nm}$  se acomodan aproximadamente  $1,06 \cdot 10^5$  moléculas de AMX por nanómetro cuadrado. Esto demuestra el hecho de que las diferencias entre las estequiometrias de los complejos AMX-AgNP se debe a razones estéricas y de tamaño, es decir, que se produce la unión de las moléculas de antibiótico sobre la superficie de las AgNPs, y es mayor el número de moléculas de antibiótico que interaccionan sobre la superficie de las AgNPs cuanto mayor es su tamaño y su área.

### 3.4 Técnicas electroquímicas en la caracterización de complejos de amoxicilina con plata iónica y nanopartículas de plata.

Los métodos electroquímicos han sido ampliamente utilizados en la determinación de constantes de formación de complejos entre iones metálicos y especies orgánicas [146-148]. La variación de los potenciales de oxidación o reducción en dependencia de la especie química (ión o complejos) es una herramienta muy útil en la especiación [149]. La voltametría, por ejemplo, se ha utilizado en el estudio de la formación de complejos entre metales como Cu(II), Ni(II) y Co(II) con diferentes familias de antibióticos entre los que se destacan los  $\beta$ -Lactámicos [150]. Diversos métodos voltamétricos han sido utilizados con este fin, la voltametría cíclica (CV), voltametría de onda cuadrada (SWV), voltametría diferencial de pulsos (DPV) y la voltametría de redisolución anódica (ASV) se encuentran entre algunos de ellos [126]; [151]; [152].

No se ha encontrado en la bibliografía científica publicaciones que hayan descrito el uso de técnicas voltamétricas para estudiar las interacciones entre el antibiótico AMX (u otros antibióticos) y la Ag(I) o las AgNPs.

En este apartado se resumen los resultados encontrados en la caracterización de los complejos de AMX-Ag(I) y AMX-AgNPs. Los métodos DPV, ASV se utilizaron en la caracterización de los complejos AMX-Ag(I) mientras que los complejos AMX-AgNPs se estudiaron por voltametría de partículas inmovilizadas (VIP). Además, se calculan las constantes de formación de dichos complejos por el método *Deford-Hume*.

### 3.4.1 Caracterización de complejos de AMX-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos).

La *DPV* se ha utilizado tanto con fines cuantitativos como para el estudio de mecanismos, cinética y termodinámica de reacciones electroquímicas. El uso de esta técnica ofrece ventajas frente a otras, ya que es muy sensible, se eliminan las corrientes capacitativas, y permite determinar concentraciones muy pequeñas, incluso por debajo de partes por millón ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en mediciones directas. Cuando la técnica se combina con métodos de separación y concentración se pueden alcanzar límites de detección del orden de las partes por billón ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) [153].

El barrido diferencial de pulsos compensa y elimina la corriente capacitativa de fondo, mejorando así los límites de detección, además de una mayor sensibilidad, con un aumento de la relación señal/ruido. Las medidas en *DPV* se pueden hacer sobre electrodos sólidos estacionarios, de mercurio, o rotatorios. Se han reportado el uso de electrodos de carbono vítreo (GCE) y electrodos metálicos tanto de platino (PtE) como de oro (AuE) [18]; [154]; [155].

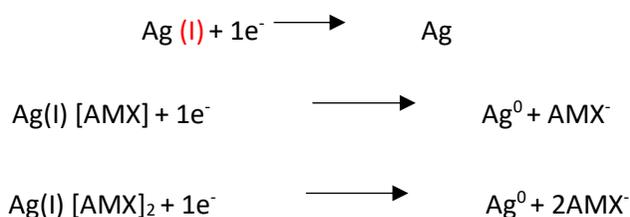
Se utilizó el método *DPV* para la determinación de constante de formación de complejos AMX-Ag(I), por su mayor sensibilidad. La implementación y validación se encuentra descrita en el apartado 1.5.1.

Se midieron 5 disoluciones, en las cuales se mantuvo la concentración de Ag(I) en 0,01mM y la concentración de AMX varió de 0mM a 0,5mM. La disolución de Ag(I) se preparó a partir de un patrón 1mM haciendo las diluciones necesarias, siendo la disolución patrón inicial de AMX de 0,1M.

Las disoluciones se identificaron como **Ag(I)-S0**, **Ag(I)-S1**, **Ag(I)-S2**, **Ag(I)-S3** y **Ag(I)-S4**. Estas se prepararon en un volumen final de 20mL de  $\text{KNO}_3$  0,1M. Después de preparadas las mezclas se mantuvieron en contacto por 2h agitando en orbital. Las composiciones de las mezclas de la **Ag(I)-S0** a la **Ag(I)-S4** se muestran en la Tabla 5.

La muestra **Ag(I)-S0** (negro) que es un patón de Ag(I) a 0,01mM mostró un aumento de la corriente con un máximo de reducción a un potencial ( $E_p$ )  $E_p = -0,349 \pm 0,009$  V, con una

intensidad de máximo de pico ( $i_p$ ) de  $i_p = -3,33 \cdot 10^{-5}$  A, correspondiente a la reducción de la Ag(I) a Ag(0). En contraste con disoluciones blanco de electrolito soporte ( $\text{KNO}_3$  0,1M) que no mostró picos de reducción en el rango de potenciales medidos (0,2V a -1,2V) en ausencia de Ag(I). En la muestra **Ag(I)-S1** se observó un desplazamiento del potencial de reducción hasta  $-0,394 \pm 0,000$  V y una disminución de la señal hasta  $-1,86 \cdot 10^{-5}$  A. Este desplazamiento se debe a la formación de una nueva especie de plata formada en presencia de AMX, la cual se reduce directamente (complejo inerte no lábil que se reduce directamente), necesitando un mayor potencial (energía) para su ruptura y reducción. Esta especie se identificó como un complejo Ag(I) [AMX].



A partir de la muestra **Ag(I)-S2** donde la relación molar de Ag(I):AMX es 1:5, se observó además del pico perteneciente a complejo Ag(I) [AMX] ( $-0,398 \pm 0,005$ V de intensidad  $-3,27 \cdot 10^{-6}$  A) otro pico a  $-0,595 \pm 0,008$ V de baja intensidad  $-1,80 \cdot 10^{-6}$  A. Con este resultado podemos deducir que este nuevo pico a potenciales más negativos pertenece a un complejo Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> más estable que Ag(I) [AMX]. La muestra **Ag(I)-S3** se comporta como la muestra anterior, se observan dos picos de reducción uno a  $-0,34 \pm 0,03$ V que puede atribuirse a la reducción de Ag(I) [AMX] y otro a  $-0,58 \pm 0,02$ V que puede pertenecer a la especie Ag(I) [AMX]<sub>2</sub>. La desaparición en la muestra **Ag(I)-S3** de la especie Ag(I) [AMX] puede deberse a el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la especie Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> con el aumento de la concentración de AMX. La muestra **Ag(I)-S4** también presenta dos picos de reducción, uno de ellos a  $-0,37 \pm 0,05$ V y el otro a  $0,59 \pm 0,02$ V consecuentes con la reducción de las especies Ag(I) [AMX] y Ag(I) [AMX]<sub>2</sub>. La intensidad del pico perteneciente a la especie Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> se vio disminuida ( $i_p = -1,15 \cdot 10^{-6}$  A) en comparación con la muestra **Ag(I)-S2**. En la **Ag(I)-S4** también se observó un pico muy ancho a  $E_p = -1,04$ V también presente en una disolución de AMX de 0,5mM ( $-1,01$ V). Este pico  $E_p = -1,04$ V es consistente con la reducción del grupo carboxilato de la AMX que está en exceso ya que la señal

también se encuentra presente en el patrón de AMX. La disminución de la intensidad del pico de reducción de la especie  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]_2$  en **Ag(I)-S4** puede explicarse por la reducción del grupo carboxilato del antibiótico AMX (Figura 46).

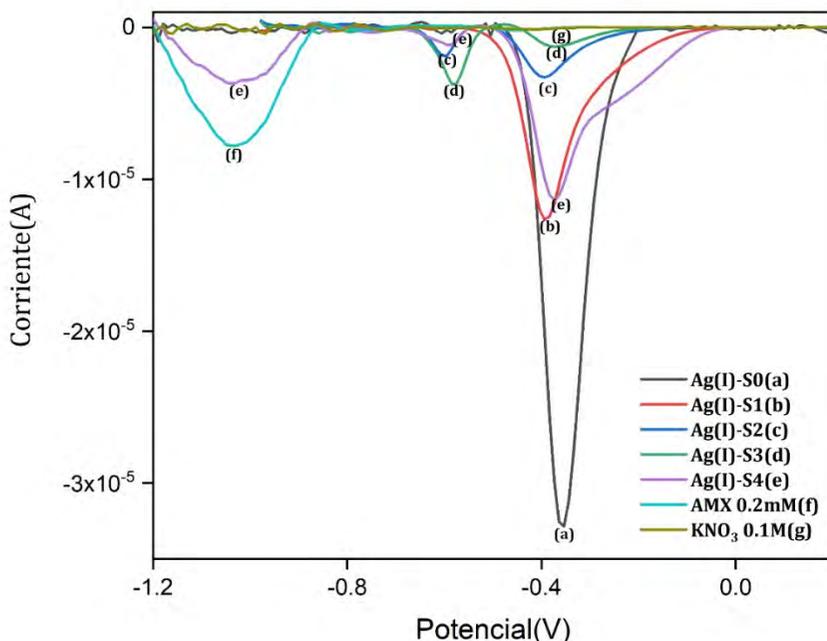


Figura 46. Voltagramas de disoluciones mezcla de  $\text{Ag(I)}$  1mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 1mM(rojo);(c) 5mM(azul); (d) 10mM(verde); (e) 20mM(violeta); (f) AMX 0,2mM(azul marino) y (g)  $\text{KNO}_3$  0,1M(verde claro). Las medidas se realizaron con dos electrodos de platino (trabajo y auxiliar) y un electrodo  $\text{Ag/AgCl}$  (referencia). El  $\Delta E=0,01\text{V}$ ,  $\Delta E_p=0,05\text{V}$ ,  $t_m=0,05\text{s}$  y  $t_p=0,5\text{s}$

### 3.4.2 Cálculo de la contante de formación de los complejos $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]_n$ por el desplazamiento del potencial de pico (ecuación de Nernst).

Teniendo en cuenta las variaciones encontradas en el potencial de reducción de las mezclas **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4** se estimaron las constantes de formación de las especies definidas como  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]$  y  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]_2$ .

Las medidas *DPV* permiten la aplicación del método de variación del potencial cuya fórmula parte de la ecuación de Nernst. (ecuación 3 y 4) donde E es el potencial de

reducción de las especies Ag(I) [AMX] o Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> encontrados en las mezclas **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4** y E<sup>0</sup> es el potencial de reducción de la especie Ag(I) encontrado en la mezcla **Ag(I)-S0**. Los demás parámetros de la ecuación son constante *n* es 1, la temperatura de trabajo fue de 298K, la constante de los gases (*R*) 8.3145JK<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup> y la constante de Faraday (*F*) 96500 Cmol<sup>-1</sup>.

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \log k \quad (\text{ecuación 2})$$

$$(E - E^{\circ}) \frac{nF}{RT} = \log k \quad (\text{ecuación 3}).$$

Para la especie Ag(I) [AMX] se encontró un valor de constante de 2,0±1,0CJ<sup>-1</sup> mientras que para la especie Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> 9,5±0,5CJ<sup>-1</sup>. La formación de dos complejos están de acuerdo con lo que han descrito algunos autores [130]. En este estudio, las constantes complexométricas se calcularon mediante una valoración potenciométrica, y se obtuvieron valores de estas constantes de  $\log k_1 = 3,26 \pm 0,04$  y  $\log k_2 = 6,0 \pm 0,1$  a 20 °C para complejos de estequiometría ML y ML<sub>2</sub>. Las constantes se calcularon en disoluciones ácidas en las que la Ag(I) y la AMX estuvieron en una relación molar 1:3 en una disolución de KNO<sub>3</sub> 0,1 M. Estas disoluciones se valoraron con NaOH de 0,049M. Durante la valoración se midió el pH y el potencial de un electrodo selectivo a iones Ag(I).

La constante de formación que hemos calculado (método descrito en esta sección) para la especie Ag(I) [AMX], tiene valores similares a los calculados en potenciometría [130]. Mientras que la contante calculada para la especie Ag(I) [AMX]<sub>2</sub> resulto ligeramente superior empleando voltametría. Esta diferencia se debe a la forma de medida de ambas técnicas. En el caso de las contantes reportadas en esta referencia se calcularon por un método potenciométrico. No se ha encontrado ningún otro estudio en la bibliografía que calcule electroquímicamente las constantes de formación de complejos AMX con Ag(I). Sin embargo, la formación de los complejos AMX con Ag(I) han sido confirmados por técnicas como EAM-Vis y FTIR [131] .

### 3.4.3 Caracterización de complejos de Ag(I) [AMX]<sub>n</sub> por ASV.

La voltametría de redisolución es una técnica electroquímica muy utilizada para la determinación sensible de metales y la caracterización de complejos de metales con compuestos orgánicos [20]; [151]. Esta técnica permite la determinación diferenciada de metal libre en presencia de otras especies. El procedimiento de medida en ASV consta de dos etapas en la primera de ellas se concentran las especies en las superficies del electrodo a un potencial fijo. La segunda etapa es la de redisolución selectiva de las especies, ya sea a potencial constante o por un barrido de potencial. La señal de corriente producida en la segunda etapa es proporcional a la concentración permitiendo la cuantificación de las especies [20]; [89]. Y dada la preconcentración en la primera etapa, la sensibilidad de este grupo de técnicas voltamétricas de redisolución es muy elevada (la ASV es la técnica electroquímica más sensible).

Entre los electrodos de trabajo más utilizados en la ASV se encuentra el electrodo de mercurio, ya sea de gota o de película de mercurio sobre carbono vítreo [156]. Para analitos no amalgamables o con potenciales de oxidación cercanos al del mercurio se han utilizados electrodos sólidos inertes como de PtE, AuE, GCE entre otros [157]. También pueden emplearse electrodos serigrafiados con este fin [22]; [158]. Con la técnica ASV se han obtenido límites de detección incluso del orden de partes por trillón ( $\text{pg mL}^{-1}$ ) [159].

Para el estudio de los complejos de Ag(I) con el antibiótico se empleó un procedimiento ASV que previamente hemos optimizado y validado, descrito en el apartado 1.5.1 (determinación de las constantes de formación de complejos AMX-Ag(I)). En este procedimiento, se realiza la preconcentración de la Ag(I) a un potencial selectivo en el que únicamente se reduce la Ag(I) no complejada (o la que se encuentra dentro de la labilidad del complejo). Mientras que el potencial catódico no es suficiente para la reducción de los complejos Ag(I) [AMX]<sub>n</sub>, discriminando de esta manera en el voltagrama de redisolución la parte de plata que se encuentra complejada, que no contribuye a la corriente medida en esta etapa de redisolución. Se empleó la voltametría impulsional diferencial (DPV) por su alta sensibilidad y capacidad de eliminación de la corriente capacitativa. Previamente, es muy importante conocer el potencial correcto dependiente del tipo de electrodo empleado

y de la composición del electrolito soporte, sobre todo teniendo en cuenta que, si los complejos tienen constantes pequeñas de formación, los potenciales pueden ser muy próximos a los de reducción de la Ag(I) libre.

El estudio previo *DPV* indica que el potencial de reducción de la Ag(I) es -0,349V en las condiciones de medida. Por lo que la etapa de preconcentración se llevó a cabo a -0,2V potencial más bajo para asegurar la reducción selectiva de la especie Ag(I), y no de los complejos de la Ag(I) con el antibiótico, que de ser no lábiles se reducirían a potenciales catódicos mayores. Por lo tanto, de esta forma conseguimos la preconcentración selectiva para el cálculo posterior de especiación (diferenciación entre la Ag(I) libre y la complejada).

El estudio se llevó a cabo con 5 disoluciones en las cuales se mantuvo la concentración de Ag(I) constante (2 $\mu$ M) y la concentración de AMX varió de 0mM a 1,5mM. La disolución de Ag(I) se preparó a partir de un patrón 1mM haciendo las diluciones necesarias. La disolución patrón inicial de AMX 0,01M se preparó disolviendo 91,35mg en 0,1mL de KOH 0,1M y enrasando con agua MQ hasta 25mL.

Las disoluciones se identificaron como **Ag(I)-A0**; **Ag(I)-A1**; **Ag(I)-A2**; **Ag(I)-A3**; y **Ag(I)-A4**. Estas se prepararon en un volumen final de 20mL de tampón *Britton-Robinson* 0,1M pH 7. Después de preparadas las mezclas se mantuvieron reaccionando durante 2h con agitación orbital a 40rev min<sup>-1</sup>.

Los voltagramas de redisolución de las disoluciones de la **Ag(I)-A0** a la **Ag(I)-A4** se muestran en la Figura 47. Definimos el área del pico de oxidación ( $A_p$ ) como la integral del pico de oxidación de plata depositada, la altura del pico ( $I_p$ ) como la corriente máxima medida en el proceso de oxidación, y el potencial de pico ( $E_p$ ) como el potencial al que se alcanza la corriente máxima.

Se observó desde la muestra **Ag(I)-A0** hasta **Ag(I)-A4** un pico de redisolución perteneciente a la re-oxidación de la Ag (I). Se observó una disminución de  $i_p$  con el aumento de la concentración de AMX y un desplazamiento hacia menores potenciales de oxidación. Esto es debido a la disminución de la plata libre (Ag(I)) por la formación de complejos estables y no lábiles con la AMX.

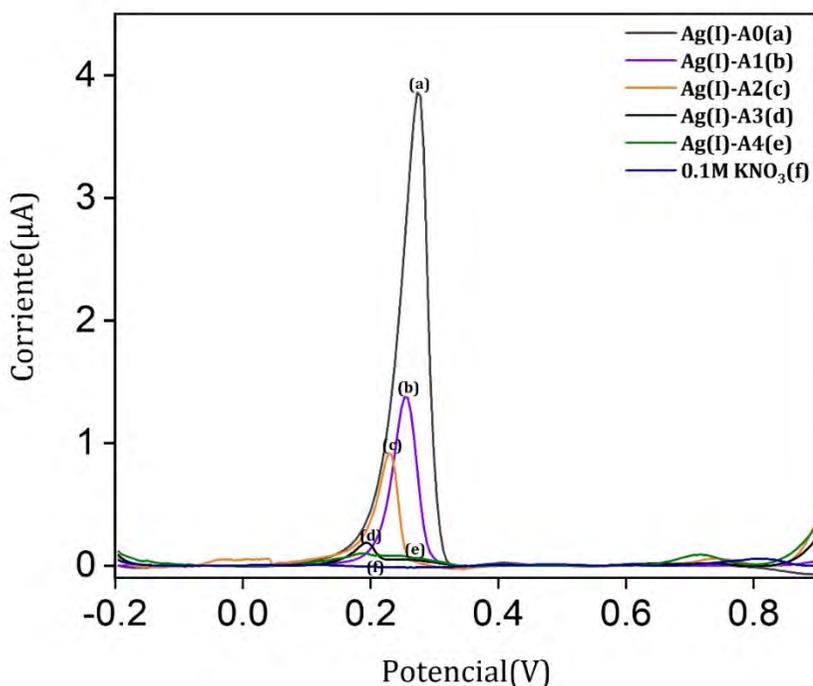
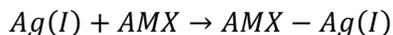


Figura 47. (a) 0mM(negro); (b) 0,2mM(violeta); (c) 0,8mM(amarillo); (d) 1mM(negro oscuro); (e) 1,5mM(verde) y (f) KNO<sub>3</sub> 0,1M(azul oscuro). Electrodo de trabajo (GC) de referencia (Ag/AgCl) y trabajo (platino). Preconcentración:  $E_e = -0,2V$  durante  $t_e = 120s$ . Barrido de potenciales: de  $-0,2V$  a  $1,0V$ ;  $\Delta E = 0,05V$ ,  $\Delta E_p = 0,05V$ ,  $t_m = 0,05s$  y  $t_p = 0,5s$ .

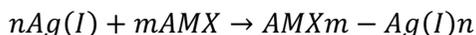
### 3.4.4 Cálculo de la contante de formación de los complejos Ag(I) [AMX]<sub>n</sub> por el método *Deford-Hume*.

El método de *Deford-Hume* es una de las metodologías más utilizadas en la determinación de constantes de formación de complejos metálicos empleando técnicas tanto electroquímicas [129]. El método permite el cálculo de constantes sucesivas mediante expresiones que provienen de transformaciones de la ecuación del potencial de onda media. Conociendo la variación de  $E_p$  y de  $I_p$  se calcula una función que al ser relacionada con la concentración libre de ligando permiten conocer las constantes de estabilidad de los complejos.

Este procedimiento lo hemos llevado a cabo a pH y concentración del metal ( $Ag(I)$ ) constante, aumentando las concentraciones del ligando ( $AMX$ ), y asumiendo la formación de complejos lábiles de forma  $ML_{1-n}$  ante un exceso significativo del ligando (ecuación 5; 6).



$$\beta_1 = [AMX - Ag(I)]/[AMX][Ag(I)] \text{ (ecuación 4)}$$



$$\beta_n = [AMX_m - Ag(I)_n]/[AMX^m][Ag(I)^n] \text{ (ecuación 5)}$$

La constante de estabilidad se determina mediante la Ecuación 7 donde  $F_0(X)$  es una función polinomial que representa la suma de  $\beta_n(X^n)$  de todos los complejos.  $\beta_n$  es la constante de estabilidad del enésimo complejo y  $[X]$  representa la concentración de especie añadida ( $AMX$ ).

$$F_0(X) = \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n(X^n) = \beta_0 + \beta_1(X^1) + \beta_2(X^2) + \dots + \beta_n(X^n) \text{ (ecuación 6)}$$

$F_0(X)$  se relaciona con la intensidad de la corriente y con la diferencia de potencial a través de la ecuación 8 donde  $\Delta E_p$  representa la diferencia de potencial de oxidación del entre el metal libre y el metal complejado. Los valores de  $I_l$  e  $I_c$  son las corrientes de pico de oxidación del metal libre y complejado respectivamente.

$$F_0(X) = \text{antilog} \{ [0,434nF/RT][\Delta E_p] + [\log(I_l)/I_c] \} \text{ (ecuación 7)}$$

La pendiente de la gráfica de  $F_0(X)$  frente a la concentración libre del ligando representa la constante de estabilidad de los diferentes complejos. Si la regresión se ajusta a una ecuación lineal significaría que se forma un solo complejo estable, si se ajusta a una ecuación cuadrática entonces se forman dos complejos estables, y así sucesivamente. Dada la incertidumbre de cada medida de constante de formación del complejo, se produce una propagación de estos valores de incertidumbre a medida que aumenta la estequiometría de los complejos. La incertidumbre total hace que, al ir sumando estos valores, las constantes calculadas a partir de  $\beta_3$  sean poco precisas. Por otro lado, se requieren medidas

de potencial con una precisión de al menos 0,1mV para obtener valores de constantes reproducibles y con poco sesgo [129].

Los datos recogidos en la Tabla 14 de las muestras **Ag(I)-A0** a **Ag(I)-A4** permiten el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos AMX-Ag(I) con el método *Deford-Hume*.

El gráfico de  $F0(AgI)$  frente a  $[AMX]L$  se ajustó a una función polinómica de segundo grado con un coeficiente de determinación de 0,9925 (Figura 48. Donde  $y = 2,1 \cdot 10^9 X^2 - 1,7 \cdot 10^6 X + 108$ . Los ajustes de la función se realizaron con el software OriginPro 2020.

Tabla 14. Medidas voltamétricas DP-ASV de las disoluciones **Ag(I)-A0** a **Ag(I)-A4** estudiadas.

Mezclas	Área	Altura (A)	$\Delta E(V)$
<b>Ag(I)-A0</b>	$2,81 \cdot 10^{-7}$	$4,10 \cdot 10^{-6}$	$0,273 \pm 0,002$
<b>Ag(I)-A1</b>	$8,75 \cdot 10^{-8}$	$1,45 \cdot 10^{-6}$	$0,253 \pm 0,001$
<b>Ag(I)-A2</b>	$6,27 \cdot 10^{-8}$	$1,24 \cdot 10^{-6}$	$0,228 \pm 0,002$
<b>Ag(I)-A3</b>	$1,00 \cdot 10^{-8}$	$1,88 \cdot 10^{-7}$	$1,049 \pm 0,005$
<b>Ag(I)-A4</b>	$3,81 \cdot 10^{-8}$	$6,69 \cdot 10^{-8}$	$0,188 \pm 0,007$

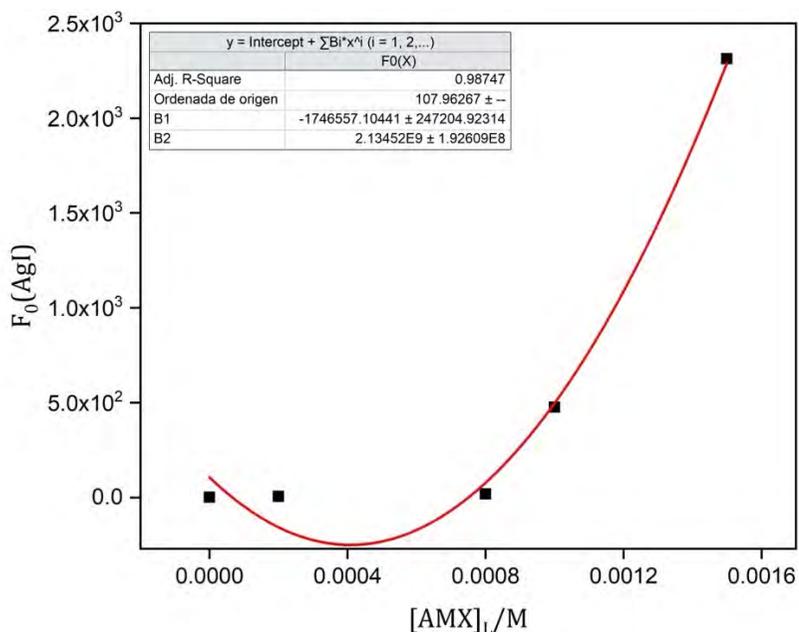


Figura 48. Representación gráfica (cuadrática) de la función  $F_0(AgI)$  frente a  $[AMX]_L$  siguiendo el método de Deford-Hume.

Obtener una función de segundo grado significa que se forman dos complejos sucesivos y como se muestra en la ecuación 6 estamos en presencia de dos constantes de estabilidad ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ). Este resultado es consistente con el resultado obtenido con el método de la ecuación de la variación del potencial (ecuación de Nerst) descrito en el apartado 3.4.2, lo que confirma la formación de los complejos de estequiometría 1:2.

Mediante el cálculo del logaritmo de las pendientes del gráfico  $F_0(AgI)$  frente a  $[AMX]_L$ , se calcularon los valores de las constantes de estabilidad de las especies  $Ag(I)$   $[AMX]$  y  $Ag(I)$   $[AMX]_2$  las cuales son  $\log \beta_1 = 6,23 \pm 0,04$  y  $\log \beta_2 = 9,32 \pm 0,04$ , respectivamente. Estos resultados son mayores que los obtenidos empleando una valoración potenciométrica ( $\log k_1 = 3,26 \pm 0,04$  y  $\log k_2 = 6,0 \pm 0,1$  a 20 °C) [130]. Las constantes que hemos calculado por el método *Deford Hume* se encuentran dentro de valores similares a los reportados en estudios de complejamiento de otros metales con la AMX, y de la  $Ag(I)$  con otros compuestos carboxilados con propiedades antimicrobianas [115].

### 3.4.5 Caracterización de complejos de [AMX]<sub>n</sub>-AgNPs por VIP.

Las mezclas (**m\_10nm-0** hasta **m\_10nm-5**) de 0,05mM de AgNPs 10nm y AMX se prepararon en un volumen final de 3mL de tampón *Britton-Robinson* 0,01M pH 7. Las concentraciones de AMX variaron de 0mM a 5mM siendo la composición de las mezclas las que se muestran en la Tabla 3: **m\_10nm-0**; **m\_10nm-1**; **m\_10nm-2**; **m\_10nm-3**; **m\_10nm-4**; **m\_10nm-5**. Las mezclas se dejaron interaccionar durante 18 h. a temperatura ambiente sin agitación.

En el caso de las AgNPs de 50nm se prepararon mezclas (**m\_50nm-0** hasta **m\_50nm-5**) de 0,05mM de AgNPs 50nm y AMX (0mM a 5mM) se prepararon en un volumen final de 10mL de tampón *Britton-Robinson* 0,01M pH 7. Las composiciones de las mezclas se muestran en la Tabla 4, y se dejaron reaccionar durante 18 h. a temperatura ambiente sin agitación.

La técnica voltamétrica utilizada para la evaluación electroquímica de las interacciones de las nanopartículas de plata (diámetro nominal 10nm, 50nm) con el antibiótico AMX fue la *VIP*. El procedimiento que empleamos se basa en el depósito de las AgNPs libres o complejadas sobre la superficie del electrodo de trabajo, para llevar a cabo su oxidación directa a partir de su inmovilización. Este método permite la determinación voltamétrica directa de las AgNPs con un barrido anódico, discriminando la corriente medida por ejemplo de otras especies de plata como la Ag(I) libre o complejada. Esta técnica también proporciona información sobre tamaños de las nanopartículas de plata, al producirse su oxidación a mayores potenciales ( $E_p$ ) a medida que aumenta su diámetro (si bien estos desplazamientos son pequeños, del orden de mV). Potencialmente, la *VPI* puede discriminar entre diferentes recubrimientos, aunque este aspecto se ha estudiado poco en la bibliografía. El procedimiento optimizado *VIP* que hemos empleado se describe en el apartado 2.3.1 de esta memoria.

En las mezclas de la **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5** se observó una disminución de los valores de las  $I_p$  y un aumento muy ligero en el  $E_p$  (Figura 49). El voltograma de **m\_10nm-0** muestra un pico en 0,248V perteneciente a la oxidación de las AgNPs de 10nm, con una

intensidad de  $3,42 \cdot 10^{-6}$  A. En la primera mezcla AMX (**m\_10nm-1**) el pico de oxidación se desplaza hasta  $E_p=0,263$  V con una intensidad ligeramente inferior de  $1,66 \cdot 10^{-6}$  A. A partir de esta muestra los picos de oxidación en **m\_10nm-4** y **m\_10nm-5** se mantuvieron en un valor  $E_p=0,263$  V. Aunque en **m\_10nm-3** el potencial de oxidación  $0,276$  V en este caso el pico obtenido era poco simétrico por lo que no se puede determinar el  $E_p$  con exactitud. Las intensidades de las señales en las mezclas **m\_10nm-2**, **m\_10nm-3**, **m\_10nm-4** fueron  $4,03 \cdot 10^{-7}$  A;  $3,22 \cdot 10^{-7}$  A y  $2,95 \cdot 10^{-7}$  A respectivamente. Este resultado indica que se ha producido un aumento en el diámetro de las AgNPs.

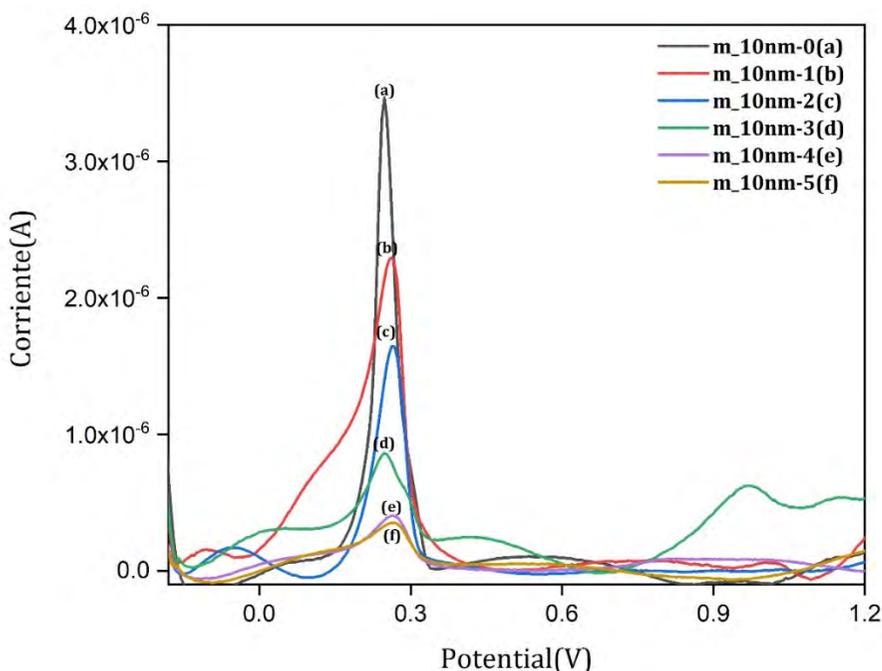


Figura 49. Voltagramas de las disoluciones mezcla de AgNPs de 10nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta) y (f) 5mM(amarillo). Electrodo de trabajo (GC modificado con 5 $\mu$ L de disolución) de referencia (Ag/AgCl) y trabajo (platino) [6]. Barrido de potenciales: de -0,2V a 1,0V;  $\Delta E=0,05$  V,  $\Delta E_p=0,05$  V,  $t_m=0,05$  s y  $t_p=0,5$  s

En las disoluciones **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5** se observó una disminución de las corrientes y un pequeño desplazamiento hacia valores menores de  $E_p$ . El voltograma de **m\_50nm-0** muestra un pico en 0,293 V debido a la oxidación de las AgNPs de 50nm, con

una  $I_p$  de  $8,11 \cdot 10^{-7} A$ . Este potencial de oxidación es mayor que el encontrado en la disolución **m\_10nm-0**, debiéndose al mayor diámetro de las AgNPs la muestra **m\_50nm-0**. Hasta la muestra **m\_50nm-4** se observó una disminución de  $E_p$  con el aumento de la concentración de AMX, pero en la muestra **m\_50nm-3** las AgNPs se oxidaron a  $0,265V$  un  $E_p$  superior que el de la mezcla **m\_50nm-2** pero inferior a **m\_50nm-0**. La  $I_p$  en **m\_50nm-3** disminuyó hasta  $4,03 \cdot 10^{-7} A$  cumpliendo con la tendencia. Las muestras **m\_50nm-4** y **m\_50nm-5** no mostraron picos de oxidación (Figura 50).

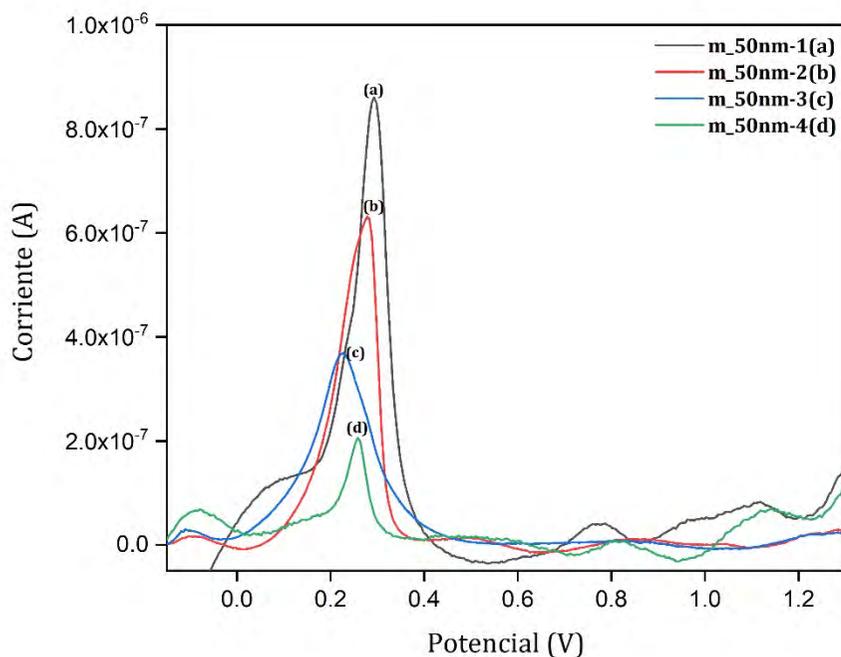


Figura 50. Voltagramas de las disoluciones mezcla de AgNPs de 50nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde). Condiciones de medida como en la figura anterior.

Con el procedimiento *VIP* se observaron cambios en el comportamiento electroquímico de las AgNPs al ponerse en contacto con la AMX. En el caso de las mezclas de la **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5** se observó una tendencia al aumento de  $E_p$  de la oxidación de las AgNPs al aumentar la concentración de AMX, puede explicarse con el aumento del tamaño de las nanopartículas cuando estas son recubiertas por la AMX y/o una mayor energía para su

oxidación. En el caso de las muestras de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-3** la variación de  $E_p$  de oxidación fue en sentido contrario hacia la disminución del potencial de pico. En este caso al estar las AgNPs de 50nm recubiertas con *PVP*, un polímero de mayor tamaño que la AMX se hace más difícil la transferencia de carga entre las AgNPs y la superficie del electrodo. Esto provoca que sea necesaria mayor energía para la oxidación de las AgNPs recubiertas con *PVP* que para la oxidación de los complejos [AMX]-AgNPs.

Los máximos de corriente ( $i_p$ ) disminuyeron al aumentar la concentración de AMX tanto para las muestras de AgNPs de 10nm (**m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**) como para las de 50nm (**m\_50nm-0** a **m\_50nm-3**). Es de destacar que el procedimiento *VIP* empleado mostró mayor sensibilidad para las AgNPs de 10nm que en las de 50nm. Mientras que en el análisis de las AgNPs de 10nm se obtuvieron valores de  $i_p$  del orden de lo microamperios, para las de 50nm las señales estuvieron por debajo, impidiendo observar corrientes de oxidación de AgNPs en las muestras **m\_50nm-4** y **m\_50nm-5**. La disminución de la sensibilidad de la *VIP* con el aumento del tamaño de las NPs se encuentra explicado en el apartado 2.3.1. La variación en  $E_p$  en  $i_p$  indican que se forman complejos estables de la AMX tanto con las AgNPs de 10nm recubiertas de iones citratos como con las AgNPs de 50nm recubiertas de *PVP*. Las constantes de estabilidad de estos complejos serán calculadas en la sección siguiente.

#### 3.4.6 Cálculo electroquímico de las constantes de formación de los complejos AMX-AgNP y AMX-AgNP por el método *Deford-Hume*.

Empleando las medidas de *VIP* y por el método *Deford-Hume* ya explicado, se determinaron los valores de intensidades  $I_l$  e  $I_c$  y las  $\Delta E_p$  de las mezclas **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5** y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5**, para calcular las constantes de estabilidad de los complejos *AMX-AgNP-10nm* y *AMX-AgNP-50nm* respectivamente.

El gráfico de  $F0(AgNP_{10nm})$  frente a  $[AMX]L$  se ajustó a una línea recta, obteniéndose un coeficiente de correlación  $R=0,9853$  (Figura 51), y la ecuación lineal  $y = 5,1 \cdot 10^3 X + 0,7$ .

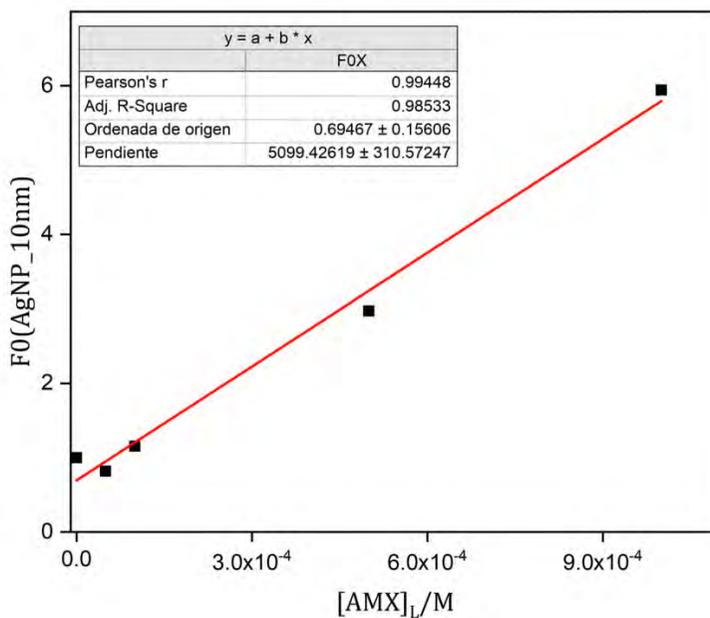


Figura 51. Representación gráfica (lineal) de la función de  $F_0(\text{AgNP}_{10\text{nm}})$  frente a la concentración de  $[\text{AMX}]_L$  siguiendo el método de *Deford-Hume*.

El gráfico  $F_0(\text{AgNP}_{50\text{nm}})$  frente a  $[\text{AMX}]_L$  también se ajustó a una línea recta de ecuación  $y = 1,6 \cdot 10^4 X + 1,4$ , con un valor del coeficiente de correlación  $R=0,9764$  (Figura 52). El ajuste fue llevado a cabo con el software OriginPro 2020.

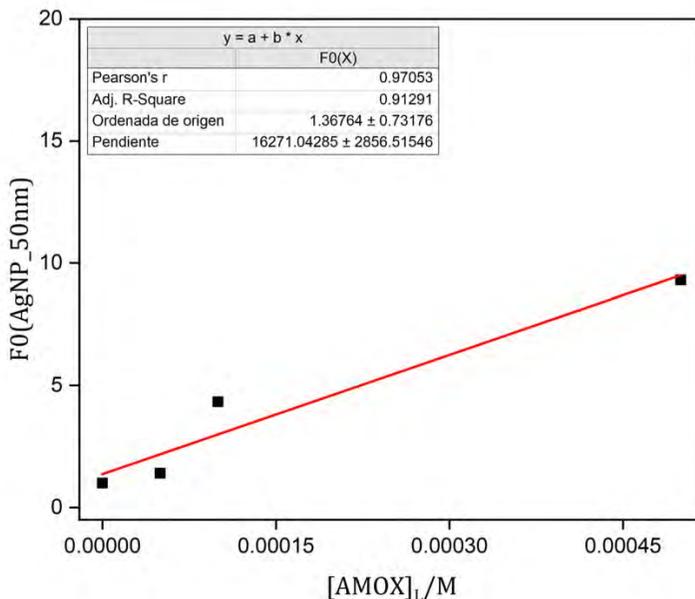


Figura 52. Representación gráfica (lineal) de la función de  $F_0(\text{AgNP}_{50\text{nm}})$  frente a la concentración de  $[\text{AMX}]_L$  siguiendo el procedimiento *Deford-Hume*.

Las constantes de estabilidad de los complejos de AMX-AgNP-10nm y AMX-AgNP-50nm que se calcularon tuvieron los valores:  $\log \beta_1=3,70\pm 0,03$  y  $\log \beta_1=4,21\pm 0,05$ , respectivamente. Estas constantes se encuentran por debajo de la calculada para los complejos  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]$  y  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]_2$ , deduciéndose que las interacciones entre la AMX y las AgNPs son más débiles que entre la AMX y la Ag(I). Algunos autores han estudiado las interacciones entre NP metálicas y algunas moléculas orgánicas, encontrando que además de la formación de los complejos se producen interacciones no específicas de tipo superficial, electroestáticas e hidrofóbicas entre otras [160]. Esto justificaría los valores de constantes más bajos para las AgNPs en comparación con la Ag(I). Es importante resaltar que hay evidencias por otras técnicas como la FTIR que hay interacciones entre la AMX y las AgNPs donde se involucran los grupos  $-\text{C}=\text{O}$  e  $-\text{OH}$ . La ausencia de la señal del  $-\text{C}=\text{O}$  y ensanchamiento de la banda de vibración de  $-\text{OH}$  en el análisis FTIR indican la formación de un enlace a través del carbonilo y una posible interacción electroestática con el grupo hidroxilo ; [161].

### 3.5 Otras técnicas instrumentales para la caracterización de los complejos de amoxicilina con nanopartículas de plata.

En la caracterización electroquímica de los complejos de amoxicilina con AgNPs de 10nm y de 50nm, descritos en el apartado 3.2.2UV-Vis de este capítulo, se han observado cambios en las energías de oxidación de las AgNPs al mezclarse con la AMX. Estos cambios se deben recubrimiento de las AgNPs con las moléculas de AMX. Es importante e interesante complementar y ampliar la información electroquímica con el estudio de las mezclas de AMX y AgNPs por técnicas instrumentales muy utilizadas en la determinación de tamaños de NPs.

Como complemento a la información de las técnicas electroquímicas, empleadas en los apartados anteriores, hemos estudiado otras técnicas instrumentales que proporcionan información analítica complementaria sobre la caracterización de complejos de las AgNPs con ligandos antibióticos, o que detectan cambios en el tamaño de nanopartículas, como las basadas en la dispersión dinámica de la luz (*dynamic light scattering, DLS*) y la cromatografía hidrodinámica (*hydrodynamic chromatography, HDC*). La caracterización estequiométrica de los complejos de la plata disuelta  $\text{Ag(I)} [\text{AMX}]_n$  no puede ser estudiada con estas técnicas instrumentales, debido a que sólomente son aplicables a nanopartículas sólidas o a moléculas de gran tamaño [6].

La técnica DLS permite la medición del tamaño hidrodinámico de partículas en dispersión, cuantificando el movimiento por difusión. En esta técnica un láser es enfocado en un pequeño volumen de disolución que contiene las nanopartículas la luz dispersada es colectada sobre un pequeño ángulo sólido. El movimiento *Browniano* de los dispersores (nanopartículas) y la dispersión del haz incidente permiten determinar un coeficiente de difusión, y a partir de éste, mediante la ecuación de Stokes, se puede determinar el diámetro hidrodinámico (Figura 53). El tamaño hidrodinámico se define como “*el tamaño de una esfera rígida hipotética*”. Sin embargo, en la práctica, las nanopartículas en disolución no son esferas rígidas, son entes dinámicos, y además se encuentran solvatadas con el disolvente. Debido a este motivo, el diámetro calculado por DLS indica el tamaño

real de la partícula dinámica hidratada y solvatada, de ahí que se le llame diámetro o tamaño dinámico. Este diámetro suele ser mayor que el real [162]. En la figura 17 se muestra esquemáticamente los componentes instrumentales empleados en DLS.

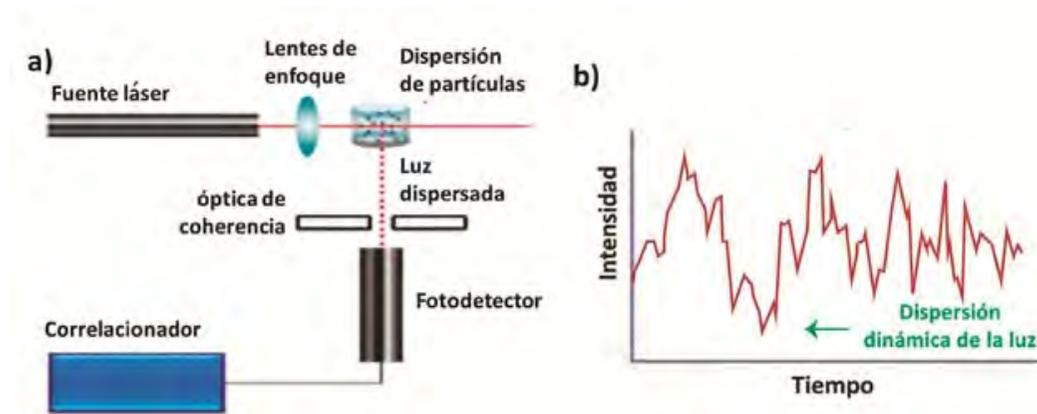


Figura 53. Esquema de un instrumento DLS y medida de una muestra: (a) Componentes instrumentales de un equipo de DLS; (b) registro de intensidad de luz dispersada por una muestra en función del tiempo [163]

El uso de *DLS* tiene entre sus ventajas la rapidez del análisis, además de no necesitar calibrado para la determinación del tamaño de las nanopartículas. En contraste, esta técnica no suele dar resultados exactos en muestras con matrices complejas, a bajas concentraciones de nanopartículas, o en muestras polidispersas (una distribución de gran variabilidad o varias distribuciones de tamaño). La polidispersión (*Pdi*) se define como la anchura ( $\sigma$ ) de la distribución de tamaños ( $Pdi = \left(\sigma/d\right)^2$ ). Valores de *Pdi* < 0,02 corresponden a muestras monodispersas (una sola distribución de tamaños), valores  $0,02 < Pdi < 0,08$  pertenecen a muestras denominadas distribuciones estrechas, y muestras con valores de *Pdi* > 0,08 son considerada muestras polidispersas [162]. A pesar de estas limitaciones, *DLS* es una de las técnicas más utilizadas en la caracterización por tamaños de nanopartículas sintéticas. En la Figura 54. se representa el fundamento de la separación por *DLS*.

La *HDC* es una técnica de separación de partículas muy similar a la cromatografía de exclusión por tamaño y técnicas de fraccionamiento en flujo. Se basa en la separación de

las partículas entre dos fases, una de las cuales es un líquido (fase móvil) y la otra en un sólido poroso (fase estacionaria). Las partículas de mayor tamaño pasan con mayor facilidad a través de la fase estacionaria, mientras que las partículas de menor tamaño tardan más en terminar su camino a través de la misma (Figura 54). La principal diferencia de la *HDC* con otras técnicas cromatográficas es que en esta técnica la fase estacionaria es totalmente inerte, y las partículas que se separan no tienen ninguna interacción con esta fase. Por lo tanto, cualquier separación que tenga lugar se produce por fenómenos que operan exclusivamente dentro del volumen vacío del lecho empaquetado. Esto garantiza que la separación solo ocurre por la diferencia de tamaño entre estas partículas [164].

El uso de la *HDC* tiene muchas ventajas, como por ejemplo la amplia variedad de detectores que pueden acoplarse: absorción molecular con baterías de diodos, fluorescencia molecular, electroquímicos, ó *DLS*, entre otros. Se caracteriza también por sus cortos tiempos para el análisis. Sin embargo, tiene como desventajas que la resolución de la técnica se ve afectada por la selección de algunas variables como la composición de la fase móvil, dimensiones de la columna que contiene la fase estacionaria, o tamaño de la fase estacionaria, entre otras.

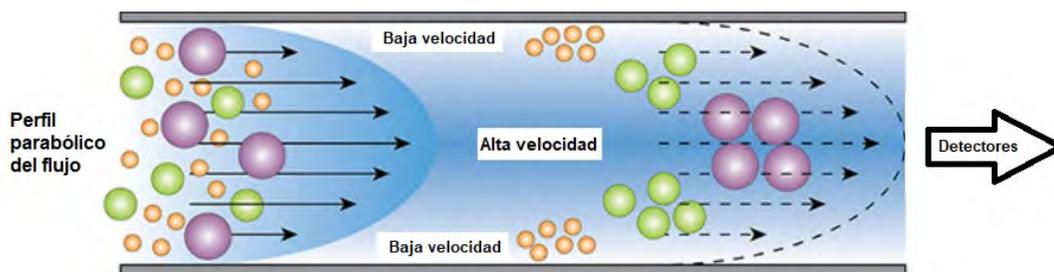


Figura 54. Esquema de separación de partículas en una columna HDC.

### 3.5.1 Caracterización de complejos de AMX con AgNPs con DLS.

Las disoluciones utilizadas en la caracterización de los complejos AMX con AgNPs de 50nm y 10nm por DLS, tienen las mismas composiciones que las muestras que hemos denominado **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5** y **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5**, respectivamente.

El diámetro hidrodinámico de las AgNPs en la muestra **m\_10nm-0** fue de  $29,0\text{nm} \pm 3,0\text{nm}$  ( $n=3$ ), un valor superior al valor real, como se ha descrito anteriormente. La polidispersidad en la muestra fue de 0,4. Este valor es considerado elevado teniendo en cuenta que la muestra **m\_10nm-0** es un patrón comercial de AgNPs de 10nm. La inexactitud en la determinación de tamaño en esta muestra no se debe a que sea una muestra polidispersa, sino a que la concentración de las AgNPs de 10nm no es la adecuada para el análisis (0,05mM). Se necesitan mayores concentraciones de muestras en esta técnica, para las nanopartículas de este tamaño tan pequeño.

En la Tabla 15 se muestran los resultados de las medidas con DLS para las muestras de **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**.

Las medidas de cada una de las muestras se midieron por triplicado, calculando la media y la desviación estándar de estas réplicas. También se muestran en la tabla los índices de *Pdi* de cada una de las medidas, con valores superiores a 0,08 en todos los casos, lo que indica que las estimaciones de los diámetros no son exactas ni precisas. Los valores de los diámetros resaltados en rojo se eliminaron de los cálculos de la media de diámetro y la *SD* al tratarse de resultados anómalos (criterio Dixon para un 95% de nivel de confianza). Aun eliminando estos valores anómalos, no se encontraron diferencias significativas entre los diámetros medios de las muestras **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5**, teniendo en cuenta la dispersión de tamaños (desviación estándar) de los resultados de las muestras. Por lo que los resultados DLS no permiten concluir que haya un aumento de tamaño de las AgNPs después de ponerlas en contacto y dejarlas reaccionar con el antibiótico AMX.

Tabla 15. Diámetro, polidispersidad (Pdi), media y desviación estándar (SD) del diámetro medidas por DLS de las mezclas de la m\_10nm-0 a la m\_10nm-5.

<b>Mezcla</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>media (nm)</b>	<b>SD (nm)</b>
m_10nm-0 replica 1	26,6	0,5	29,0	3,0
m_10nm-0 replica 2	26,0	0,4		
m_10nm-0 replica 3	31,0	0,4		
m_10nm-1 replica 1	81,6	0,1	30,0	10,0
m_10nm-1 replica 2	39,1	0,2		
m_10nm-1 replica 3	25,2	0,5		
m_10nm-2 replica 1	65,5	0,1	25,8	0,3
m_10nm-2 replica 2	26,0	0,4		
m_10nm-2 replica 3	25,6	0,4		
m_10nm-3 replica 1	81,7	0,1	30,0	11,0
m_10nm-3 replica 2	39,8	0,2		
m_10nm-3 replica 3	23,7	0,5		
m_10nm-4 replica 1	153,8	0,2	23,0	1,0
m_10nm-4 replica 2	22,7	0,4		
m_10nm-4 replica 3	24,1	0,4		
m_10nm-5 replica 1	188,0	0,2	46,0	16,0
m_10nm-5 replica 2	58,4	0,2		
m_10nm-5 replica 3	34,0	0,6		

En la Tabla 16UV-Vis se muestran los resultados medidos con DLS de las muestras **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5**. La medida de cada una de las muestras se realizó también, por triplicado. Los índices *Pdi* de cada una de las medidas son ligeramente superiores a 0,08 en todos los casos, pero inferiores a las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**. Lo que nos indica que las estimaciones de los diámetros en las muestras de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5** tienen menos sesgo que las **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5**. El diámetro medio de la muestra **m\_50nm-0** fue de  $73,3 \pm 0,2 \text{ nm}$ , superior al diámetro real, dado que lo medido es el diámetro hidrodinámico.

Se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico en las muestras **m\_50nm-1**, **m\_50nm-2** y **m\_50nm-3**, con valores:  $75,8 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$ ;  $76,6 \text{ nm} \pm 0,4 \text{ nm}$  y  $96,0 \text{ nm} \pm 1,1 \text{ nm}$ , respectivamente. En la muestra **m\_50nm-4** se observó una disminución del diámetro hidrodinámico hasta  $67,8 \text{ nm} \pm 0,1 \text{ nm}$ , valor que es incluso menor que el encontrado en **m\_10nm-0**, **tratándose posiblemente de un resultado anómalo**. Un aumento del diámetro hidrodinámico hasta  $89,0 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  se encontró en la **m\_50nm-5**. Aunque no se observa un aumento del diámetro hidrodinámico con el aumento de la concentración de AMX sí se observan diferencias significativas entre la muestra que no ha estado en contacto con el antibiótico (**m\_50nm-0**) y tres de las muestras que si lo han estado (**m\_50nm-1**, **m\_50nm-2**, **m\_50nm-3** y **m\_50nm-5**).

Tabla 16. Diámetro, *Pdi*, media y *SD* del diámetro medidas por *DLS* de las mezclas de la *m\_50nm-0* a la *m\_50nm-5*.

<b>Mezcla</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>Pdi</b>	<b>media (nm)</b>	<b>SD (nm)</b>
m_50nm-0 replica 1	73,1	0,2	73,3	0,2
m_50nm-0 replica 2	73,5	0,2		
m_50nm-0 replica 3	73,4	0,2		
m_50nm-1 replica 1	76,2	0,1	75,8	0,7
m_50nm-1 replica 2	76,3	0,1		
m_50nm-1 replica 3	75,0	0,2		
m_50nm-2 replica 1	76,6	0,1	76,6	0,4
m_50nm-2 replica 2	77,1	0,1		
m_50nm-2 replica 3	76,3	0,1		
m_50nm-3 replica 1	95,6	0,2	96,0	1,0
m_50nm-3 replica 2	94,9	0,2		
m_50nm-3 replica 3	96,9	0,2		
m_50nm-4 replica 1	67,9	0,1	67,8	0,1
m_50nm-4 replica 2	67,6	0,1		
m_50nm-4 replica 3	67,8	0,1		
m_50nm-5 replica 1	87,3	0,3	89,0	2,0
m_50nm-5 replica 2	88,3	0,3		
m_50nm-5 replica 3	90,7	0,3		

En conclusión, la técnica DLS muestra limitaciones para estudiar diferencias de tamaño de las nanopartículas de plata conjugadas o unidas a moléculas de antibiótico en el tipo de muestras descritas. Por otro lado, la concentración de 0,05mM de las AgNPs de 10nm no es la óptima obtener resultados precisos y exactos, por las limitaciones inherentes propias de la técnica. La relación que existe entre tamaño de la nanopartícula y la radiación dispersada (sexta potencia) hace que las partículas más pequeñas dispersen muy poca radiación, lo que produce señales imprecisas. Los valores de polidispersidad por encima de 0,08, incluso en las muestras **m\_10nm-0** y **m\_50nm-0**, refuerzan la afirmación anterior.

### 3.5.2 Caracterización de complejos de AMX con AgNPs con HDC.

Las muestras de **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5** y de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5** se midieron por *HDC* con las condiciones descritas en el apartado 3.2.4. Cada una de las muestras se midieron por triplicado.

En la Figura 55 se observa los cromatogramas de las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**. La señal de las AgNPs de 10nm en la muestra **m\_10nm-0** se observó a un tiempo de  $8,20 \pm 0,01$ min. En las muestras de la **m\_10nm-1** a la **m\_10nm-5** la señal se encontró a los  $8,188 \pm 0,004$ min. Se observa una ligera disminución del tiempo de retención ( $t_r$ ), lo que significa un ligero aumento en el tamaño de las AgNPs. Los resultados de las medidas realizadas descartan la formación de agregados en las muestras al observarse un solo pico. Los valores de las señales no son concluyentes, y se complementaron con medidas de absorción con EAM-UV-Vis, tal como se explica en el apartado 3.3.

Los cromatogramas de las muestras de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5** se muestran en la Figura 56. La señal de las AgNPs de 50nm en la muestra **m\_50nm-0** se observó en  $7,940 \pm 0,006$ min. Mientras que en las muestras que estuvieron en contacto con la AMX (**m\_50nm-1** a la **m\_50nm-5**) mostraron valores de tiempo de  $7,930 \pm 0,001$ min. La ligera disminución del  $t_r$  en las muestras de la **m\_50nm-1** a la **m\_50nm-5** indican un ligero aumento del tamaño de las AgNPs. En estas muestras también se descarta la formación de agregados de las nanopartículas de plata o de sus complejos, ya que se observa un solo pico.

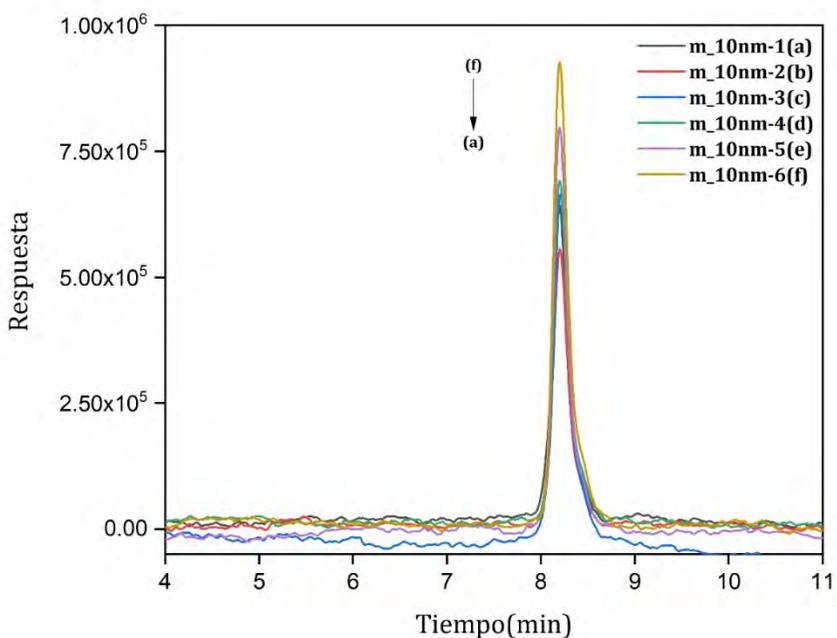


Figura 55. Cromatogramas HDC de las mezclas de AgNPs de 10nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta) y (f) 5mM(amarillo), Las medidas se llevaron a cabo en una columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de 1,6mL, después de inyectar 20 $\mu$ L de las muestras.

El estudio de las interacciones de las nanopartículas con macromoléculas de gran tamaño (por ejemplo, proteínas) sí muestra cambios importantes en los tiempos de retención medidos con *HDC*, como hemos comprobado en nuestro laboratorio [6]. Sin embargo, como hemos visto en los cromatogramas anteriores, las interacciones de las AgNPs con antibióticos no producen cambios importantes en los tiempos de retención.

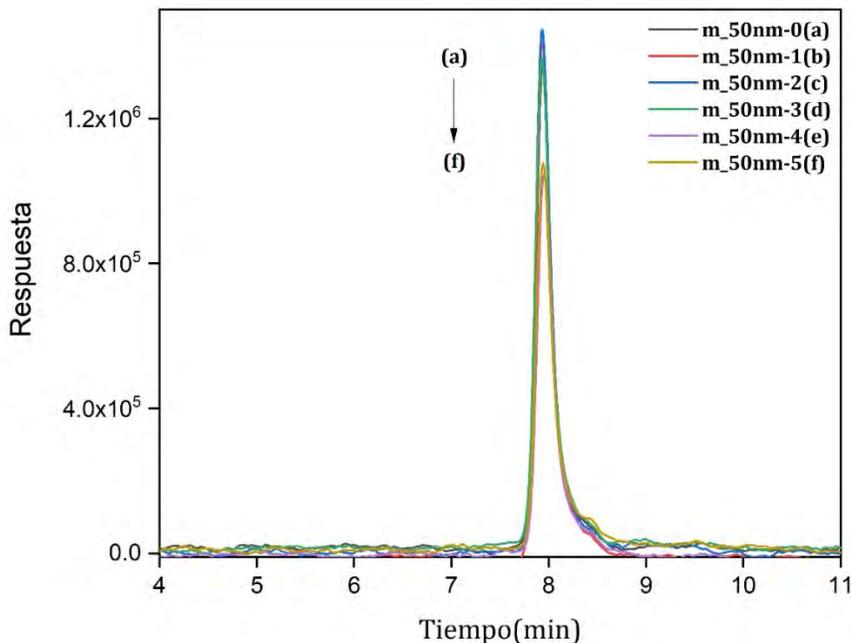


Figura 56. Cromatogramas HDC de las mezclas de AgNPs de 50nm a 0,05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta) y (f) 5mM(amarillo). Las medidas se llevaron a cabo en una columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de 1,6mL, inyectando 20 $\mu$ L de las muestras.

La conclusión más importante que nos da la *HDC* en este estudio es que no se produce aglomeración de las AgNPs sólo o en presencia del AMX. Lo que nos permite afirmar que los cambios en los espectros de absorción de los espectros EAM-UV-Vis se deben a cambios en los grupos cromóforos del antibiótico y no a cambios en el plasmón superficial de las AgNPs debidos a estas agregaciones o aglomeraciones. Al igual que no se producen en las medidas electroquímicas, que se han realizado en las mismas condiciones químicas y físicas y con las mismas concentraciones.

## ENROFLOXACINA

### 3.6 Caracterización de complejos de enrofloxacin con plata iónica y nanopartículas de plata.

La interacción de los metales de transición Ti(IV), Y(III), Zr(IV), Pd(II) y Ce(IV) con el antibiótico enrofloxacin (ENRO) conduce a la formación de complejos mononucleares catiónicos o neutros [119]. Mientras que los complejos formados con los metales de tipo lantánidos como La(III) y Sm(III) conduce a la formación de complejos dinucleares [112]; [165]. En todos los casos, la forma desprotonada de la enrofloxacin actúa como un ligando bidentado coordinando a los iones metálicos a través del oxígeno de la cetona y un oxígeno del carboxilato. Los complejos se han caracterizado con análisis fisico-químicos (punto de fusión, conductancia molar, propiedades magnéticas y análisis elemental), espectroscópicos (FT-IR, EAM UV-Vis,  $^1\text{H-NMR}$ ) y termogravimétricos [165]. El análisis FT-IR evidencia la formación de quelatos por el desplazamiento de las señales de los grupos carbonilo (C=O) y carboxilato (COO<sup>-</sup>). La ausencia de la señal del protón del grupo -COO<sup>-</sup> en el análisis por  $^1\text{H-NMR}$  también evidencia la acción de este grupo carboxilato en la complejación [120].

Se han preparado y caracterizado estructuralmente en la bibliografía complejos de Ag(I) con enrofloxacin [ $\text{Ag}(\text{ENRO})_2\text{NO}_3$ ]. En estos complejos, la enrofloxacin se comportó como un ligando monodentado con un enlace coordinado único a través del oxígeno del grupo -COO<sup>-</sup>; [131].

Las interacciones de la enrofloxacin con algunas nanopartículas metálicas como las de  $\text{Fe}_3\text{O}_4(s)$  han sido utilizados para disminuir los límites de detección de métodos electroquímicos en la determinación del antibiótico [154]; [166].

Sin embargo, no se han encontrado referencias bibliográficas que muestren la caracterización de los complejos de enrofloxacin con las especies de plata, ni con Ag(I) ni con AgNPs.

En este apartado se estudian las interacciones que se producen entre la enrofloxacin, la Ag(I) y las AgNPs de 10nm y 50nm, empleando métodos electroquímicos (voltametría directa y voltametría de redisolución). El método de *Deford-Hume* fue utilizado en el cálculo de la constante de estabilidad de los complejos de la ENRO con las diferentes especies de plata. Las técnicas *EAM UV-Vis* y *HDC* complementaron la interpretación de los resultados electroquímicos en el estudio de dichos complejos.

A continuación, se discuten los resultados encontrados en la caracterización de los complejos ENRO-Ag(I) y ENR-AgNPs por las técnicas *EAM UV-Vis*, electroquímicas y *HDC*.

### 3.6.1 EAM UV-Vis en la caracterización de complejos de enrofloxacin con plata iónica y nanopartículas de plata.

La enrofloxacin (ENRO) [ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(4-etil-1-piperazinil)-3-quinolin carboxílico] (Figura 57) es una fluoroquinolona de tercera generación. Debido a su excelente acción bactericida contra los patógenos Gram-negativos y Gram-positivos, se ha utilizado ampliamente en medicina veterinaria y humana [117]; [122]. Es una molécula anfótera que presenta en su estructura un biciclo heteroatómico constituido por un núcleo de ácido  $\beta$ -piridónico y un anillo aromático orto disustituido por un anillo piridinico y un fluor [112].

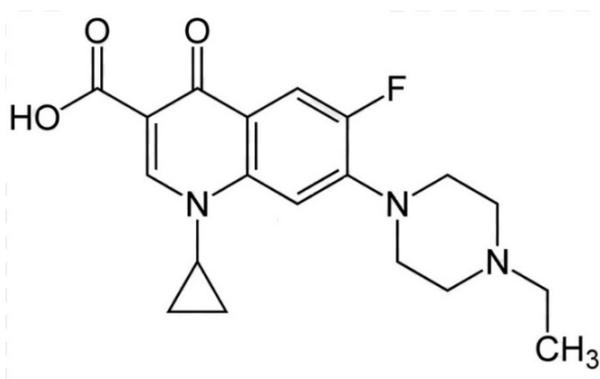


Figura 57. Estructura de la enrofloxacin.

En el espectro de absorción molecular de la enrofloxacin se pueden observar tres zonas de máximos de absorción: las bandas 271nm (ENRO\_B1), 327nm (ENRO\_B2), y 338nm (ENRO\_B3). Las bandas en 327nm y 338nm corresponden a las transiciones  $\pi - \pi^*$  y  $n - \pi^*$ . El máximo en 271nm puede atribuirse a la primera banda primaria ( $\rho$ ) del benceno la cual, aunque tiene un valor de base de 204nm puede desplazarse batocromicamente en bencenos disustituídos por grupos cromóforos (piperacina y fluor) al presentar un acentuado carácter de transferencia de carga entre el anillo aromático y el sustituyente.

### 3.6.2 Estudio del complejo ENRO-Ag(I) por EAM UV-Vis.

Se estudió la variación del espectro de absorción molecular de una disolución de ENRO de concentración 0.015mM con la adición de concentraciones crecientes de Ag (I) (0,05mM; 0,5mM; 2,5mM; 5mM). Las diferentes disoluciones se identificaron como: **E-0**; **E-1** **E-2**; **E-3**; **E-4**. La Tabla 2 muestra las composiciones de estas disoluciones.

El espectro de la ENRO en disolución amortiguadora de *Britton-Robinson* 0,1M pH 7 mostró las bandas de absorción detalladas anteriormente: máximos de absorbancia ENRO\_B1, ENRO\_B2 y ENRO\_B3 (271nm; 323nm; 334,8nm) (Figura 58). Cuando la ENRO fue mezclada con la Ag(I) no se observaron cambios significativos por debajo de relaciones molares de 1:30 (**E-1**; **E-2**). En las muestras **E-3** y **E-4** donde las relaciones molares fueron 1:160 y 1:320 se observaron cambios tanto en la intensidad como en la posición de las bandas ENRO\_B1, ENRO\_B2 y ENRO\_B3. Las bandas ENRO\_B2 y ENRO\_B3 se desplazaron *hipsocrómicamente* hasta 314nm; 329nm(**E-3**) y 303; 329nm (**E-4**) respectivamente. La banda ENRO\_B1 tuvo un comportamiento diferente al desplazarse *batocrómicamente* hasta 278nm tanto en la muestra **E-3** y **E-4**. Las intensidades en las bandas de la ENRO tampoco mostraron diferencias significativas con respecto a las mezclas con Ag(I) hasta que la relación 1:30. En el patrón de ENRO (E-0) y en las mezclas E-1 y E-2 se observaron intensidades medias de 0,907±0,009(ENRO\_B1); 0,361±0,009(ENRO\_B2) y 0,34±0,02(ENRO\_B3). Mientras que se observó un aumento en los valores de absorbancia en las mezclas **E-3** y **E-4** de las bandas ENRO\_B1 y ENRO\_B2. Los valores de absorbancia en la muestra E-3 aumentaron hasta 1,127(ENRO\_B1); 0,413(ENRO\_B2), mientras que en la

mezcla E-4 hasta 1,179(ENRO\_B1); 0,543(ENRO\_B2). En contraste la absorbancia de la banda ENRO\_B2 sufrió ligera disminución en las muestras E-3 y E-4 hasta  $0,32 \pm 0,01$ .

En general se puede decir que se han observado cambios en el espectro de absorción molecular de la ENRO que reafirman la formación de un complejo entre la ENRO y la Ag(I). Los desplazamientos *hipsocromicos* en la banda ENRO\_B2 perteneciente a la transición  $n-\pi^*$  de grupo carboxilato confirman que este grupo se encuentra involucrado en la formación del complejo. Lo que está de acuerdo por lo publicado en la caracterización de este tipo de complejos [168].

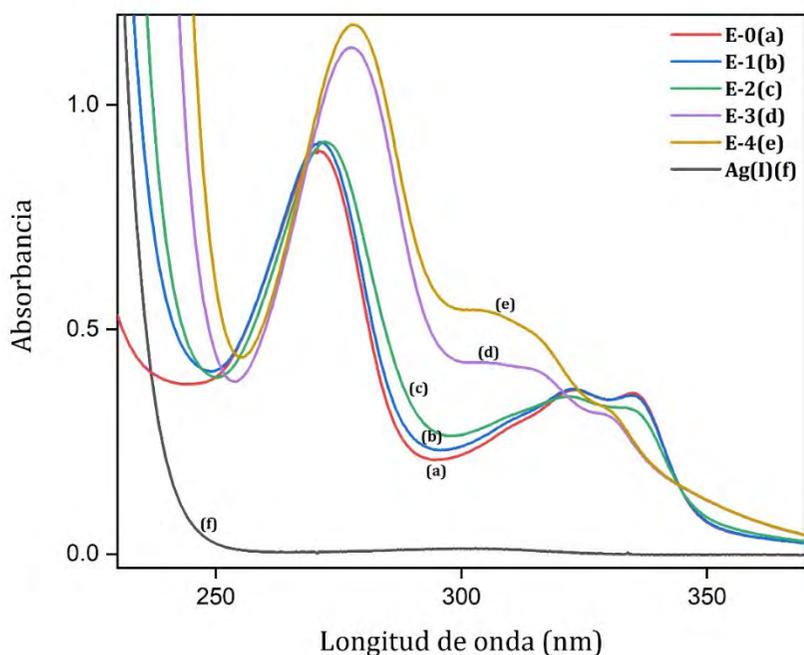


Figura 58. Espectro de absorción molecular de las disoluciones de ENRO 0,015mM con Ag(I): (a) 0mM(rojo); (b) 0,05mM(azul); (c) 0,5mM(verde); (d) 2,5mM(violeta); (e) 5mM(amarillo); (f) Ag(I) 5mM(negro). Las medidas se llevaron a cabo en un rango de longitudes de onda de 400nm a 200nm, con una velocidad de barrido de longitudes de onda de  $100\text{nm min}^{-1}$ .

### 3.6.3 Estudio del complejo ENRO-AgNPs por EAM UV-Vis.

Se ha demostrado que las *AgNPs* interaccionan con antibióticos que contienen grupos funcionales aminos y carbonilos, como ocurre con la AMX [169]. Por lo que es de esperar

que existan interacciones entre la ENRO y las AgNPs, ya que este antibiótico presenta en su estructura tanto, grupos carbonílicos (anillo piridónico) como aminos (piperazina) [170]. Sin embargo, estas interacciones no se han estudiado con anterioridad.

En este apartado se caracterizan las interacciones de ENRO con las AgNPs por EAM UV-Vis. Y se estima la estequiometría de dichos complejos con una variación del método de las relaciones molares. La banda *SPR* es sensible a las modificaciones superficiales de las AgNPs. En el estudio se utilizaron AgNPs de 10nm recubiertas de iones citratos y de 50nm recubiertas de *PVP*, para ver sus diferencias.

Las mezclas de **m\_10nm-0** hasta **m\_10nm-5** y de **m\_50nm-0** hasta **m\_50nm-5** se prepararon como se describe en la sección 1.3.1, las composiciones de las misma se encuentran en las tablas 3 y 4. Las mezclas se dejaron reaccionar durante 2h temperatura ambiente sin agitación.

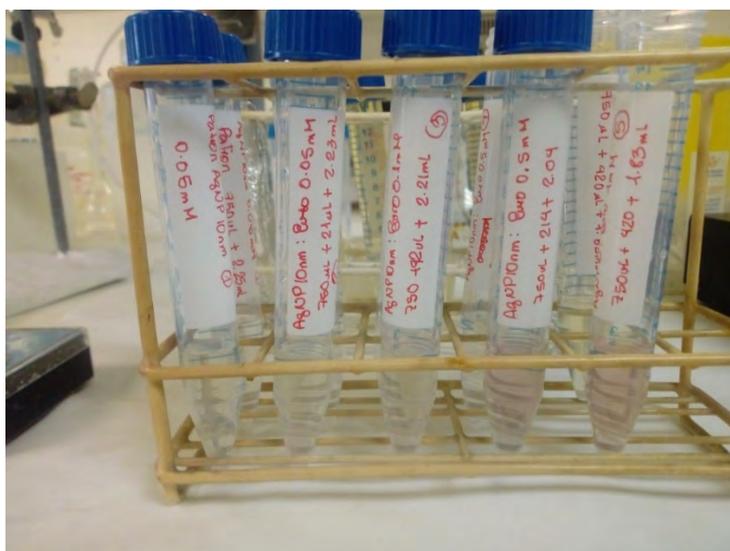


Figura 59. Cambio de coloración en las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-4** estando estas muestras colocada de modo creciente de izquierda a derecha.

Al mezclar las dispersiones de las AgNPs con las disoluciones de ENRO (Figura 59, se observó un cambio de coloración que es debida a la formación de un complejo entre ambas especies.

El máximo de absorbancia de la banda *SPR* del patrón de AgNPs de 10nm a 0,05mM (**m\_10nm-0**) (negro), se situó en los 395,8nm en concordancia con la Figura 40 y con la misma muestra en el estudio de la sección 3.3.2. Mientras que como se expuso anteriormente en este la sección 3.6.1 las bandas ENRO\_B2 y ENRO\_B3 se encuentran en los 323nm; 334,8nm respectivamente. La proximidad de estas señales y la mayor absorptividad molar en las bandas de la ENRO han originado el solapamiento de las señales de la ENRO y las AgNPs de 10nm. Lo que imposibilitó las medidas espectrofotométricas de las idisoluciones donde las relaciones molares entre la AgNPs de 10nm y ENRO fueron superiores a 1:10 (M/M): **m\_10nm-3**; **m\_10nm-4**; **m\_10nm-5**. En la Figura 60 se ha ampliado la región donde se encuentra la banda *SPR* de las AgNPs de 10nm y se puede observar las absorbancias en las mezclas **m\_10nm-0**; **m\_10nm-1**; **m\_10nm-2**. Las muestras **m\_10nm-4** y **m\_10nm-5** no se representaron en la Figura 60 debido al total solapamiento de la señal *SPR* de las AgNPs de 10nm, que impide las medidas de absorbancia por debajo de aproximadamente 350 nm.

En la Tabla 17 se pueden observar las absorbancias y longitudes de onda de las bandas de las AgNPs y ENRO, para las muestras **m\_10nm-0**; **m\_10nm-1** y **m\_10nm-2**. Se demuestra una ligera disminución de las intensidades de la banda *SPR* de las AgNPs de 10nm con el aumento de la concentración de la ENRO, además de un ligero ensanchamiento de las mismas. Este resultado es consistente con el aumento de tamaño de las AgNPs por recubrimiento con las moléculas de ENRO. No se observaron variaciones en las posiciones de las bandas ENRO\_B2 ni ENRO\_B3. Lo que indica que las hay interacciones entre ENRO con las AgNPs no son por el grupo carbonilo como se demuestra en el complejo con Ag(I).

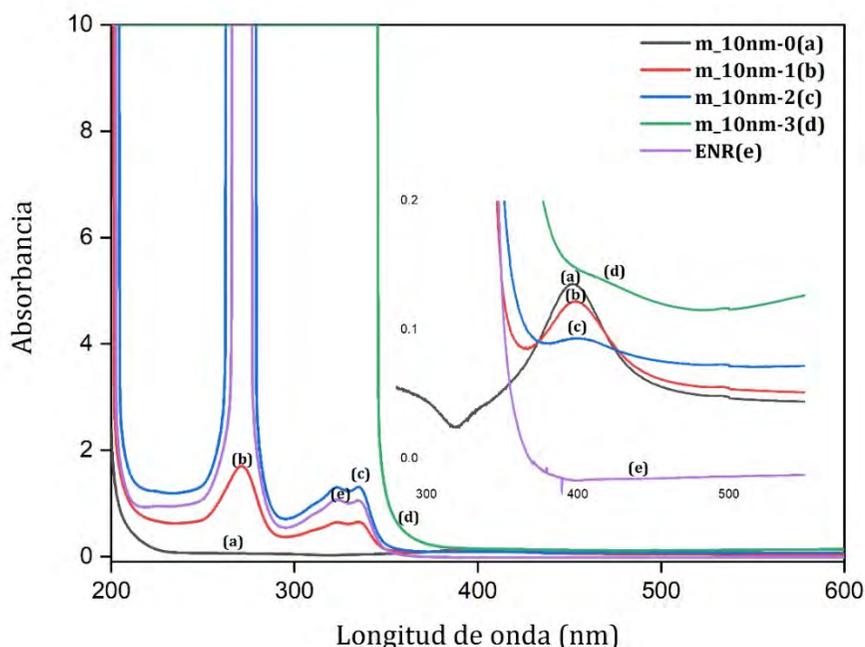


Figura 60. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 10nm a 0,05mM con ENRO: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) ENRO(violeta). Velocidad de barrido de 200nm min<sup>-1</sup>.

El análisis por EAM UV-Vis de las dispersiones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5** no permitieron la estimación de la estequiometría del complejo ENRO-AgNP<sub>10nm</sub>, ya que solo se observaron señales a relaciones molares 1:1 y 1:2. Lo que imposibilita la representación gráfica de la Absorbancia frente al número de moléculas de ENRO por cada AgNP de 10nm.

Tabla 17. Resumen de los parámetros espectrofotométricos encontrados en las disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-3**.

Mezcla	<b>m_10nm-0</b>	<b>m_10nm-1</b>	<b>m_10nm-2</b>	<b>m_10nm-3</b>
<b><math>\lambda(SPR)^a</math>nm</b>	393,8	398,6	402,2	-
<b><math>A(SPR)^b</math></b>	0,134	0,122	0,093	-

<b>W (SPR)<sup>c</sup>nm</b>	373-544	363-475	375-545	-
<b><math>\lambda</math>(ENRO_B3)<sup>d</sup> nm</b>	-	334,6	334,8	-
<b>A(ENRO_B3)<sup>e</sup></b>	-	0,649	1,308	saturado
<b><math>\lambda</math>(ENRO_B2)<sup>f</sup> nm</b>	-	323,2	322,6	-
<b>A(ENRO_B2)<sup>g</sup></b>	-	0,645	1.30	saturado

<sup>a</sup> $\lambda$ (SPR), longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>b</sup>A(SPR), Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>c</sup>W(SPR), Ancho de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>d</sup> $\lambda$ (ENRO\_B3), longitud de onda del máximo de absorción de la banda ENRO\_B3 de la ENRO; <sup>e</sup>A(ENRO\_B3), Absorbancia de la banda ENRO\_B3 de la ENRO; <sup>f</sup> $\lambda$ (ENRO\_B2), longitud de onda del máximo de absorción de la banda ENRO\_B2 de la ENRO; <sup>g</sup>A(ENRO\_B2), Absorbancia de la banda ENRO\_B2 de la ENRO.

En el estudio de las interacciones entre las AgNPs de 50nm y la ENRO se prepararon las disoluciones denominadas **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5**, cuyas composiciones se reflejan en la UV-Vis Tabla 4 dejaron interactuar durante 2h temperatura ambiente, sin agitación.

El máximo de absorción de la banda SPR del patrón de AgNPs de 50nm a 0.05mM (**m\_50nm-0**) (negro), se situó en 424nm (A=0,635), valor que se encuentra entre los observados para las AgNPs de 40nm y 60nm (Figura 60). Mientras que las bandas ENRO\_B2 y ENRO\_B3 se encuentran en los 323nm y 334,8nm, respectivamente. En este caso, hay una mayor separación entre la banda SPR de las AgNPs de 50nm y las bandas de la ENRO, lo que permitió la medida de un mayor rango de relaciones molares AgNPs/ENRO para el estudio de las interacciones entre estas especies.

La Figura 61 muestra los espectros de absorción molecular de las disoluciones **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4**. La muestra **m\_50nm-5** no se pudo medir, ya que las bandas de absorción del antibiótico ENRO saturaron el espectro. En la Figura 61 también se observa la ampliación de la zona donde se encuentra la banda SPR de las AgNPs de 50nm.

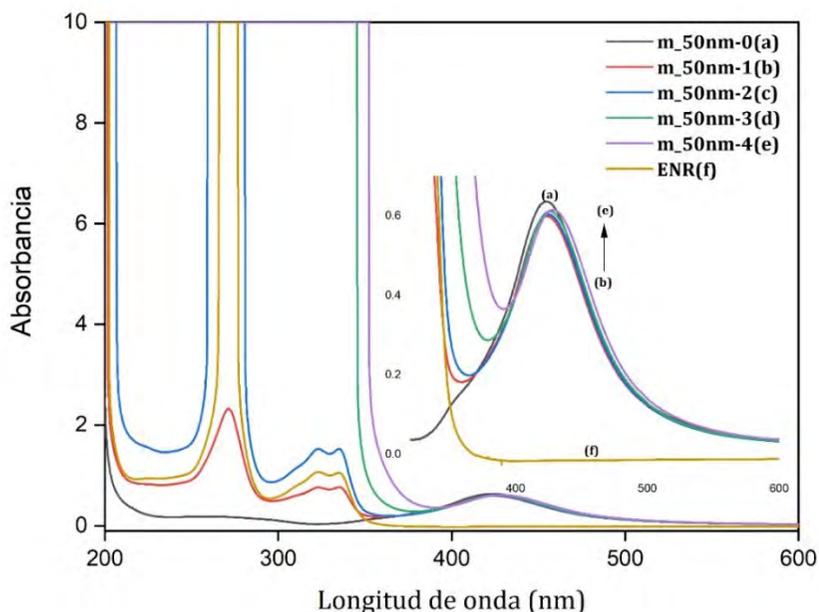


Figura 61. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 50nm a 0,05mM con ENRO: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta); (f) ENRO 0,05mM(amarillo). Velocidad de barrido de 200nm min<sup>-1</sup>.

En la Tabla 18 se observan algunos parámetros del espectro de las disoluciones de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-4**. No se observaron cambios significativos de estos parámetros en las mezclas con el aumento de la concentración de ENRO. La banda *SPR* se desplazó desde 424nm (**m\_50nm-0**) hasta 427nm (**m\_50nm-4**), este desplazamiento no se consideró significativo, ya que se encuentra en el rango de variación de la banda. Se observó una ligera disminución en la absorbancia a partir de la relación molar 1:1 en **m\_50nm-1** ( $A=0,599$ ), y se mantuvo con poca variación hasta la relación 1:20 **m\_50nm-4** ( $A=0,614$ ). La variación más interesante se observó en el estrechamiento de la banda *SPR* de las AgNPs con el aumento de la concentración de ENRO desde la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-4**. El estrechamiento de la banda *SPR* sugiere una disminución del tamaño de las AgNPs con el aumento de la concentración de ENRO. No se observaron variaciones en las posiciones de las bandas ENRO\_B2 ni ENRO\_B3, lo que indica que no se producen interacciones entre el grupo carbonilo de la ENRO y las AgNPs.

Tabla 18. Resumen de los parámetros espectrofotométricos encontrados en las mezclas m\_50nm-0 a m\_50nm-4.

Mezcla	m_50nm-0	m_50nm-1	m_50nm-2	m_50nm-3	m_50nm-4
$\lambda(\text{SPR})^a$ nm	424	424,2	424,6	425,6	427
$A(\text{SPR})^b$	0,635	0,599	0,603	0,611	0,614
$W(\text{SPR})^c$	356-598	359-598	363-598	377-598	391-598
$\lambda(\text{ENRO\_B3})^d$ nm	-	334,8	334,6	-	-
$A(\text{ENRO\_B3})^e$	-	0,769	1,525	saturada	saturada
$\lambda(\text{ENRO\_B2})^f$ nm	-	322,6	322,6	-	-
$A(\text{ENRO\_B2})^g$	-	0,764	1,524	saturada	saturada

<sup>a</sup> $\lambda(\text{SPR})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 50nm; <sup>b</sup> $A(\text{SPR})$ , Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 50nm;

<sup>c</sup> $W(\text{SPR})$ , Ancho de la banda SPR de AgNPs de 50nm; <sup>d</sup> $\lambda(\text{ENRO\_B3})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda ENRO\_B3 de la ENRO;

<sup>e</sup> $A(\text{ENRO\_B3})$ , Absorbancia de la banda ENRO\_B3 de la AMX; <sup>f</sup> $\lambda(\text{ENRO\_B2})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda ENRO\_B2 de la ENRO;

<sup>g</sup> $A(\text{ENRO\_B2})$ , Absorbancia de la banda ENRO\_B2 de la ENRO.

En la Figura 62 se muestra la variación de la absorbancia en función de la relación entre el número de moléculas de ENRO y el número de partículas de AgNPs de 50nm. Aplicando esta variación al método de las relaciones molares, se puede decir que cada AgNP de 50nm se encuentra rodeada de  $4,13 \cdot 10^8$  moléculas de ENRO. Este valor es equivalente a aproximadamente  $5,26 \cdot 10^5$  moléculas de ENRO por nanómetro cuadrado. En este caso se encontraron menor cantidad moléculas de antibióticos por nanómetro cuadrado que en el caso de la AMX. Este resultado es consistente con el menor desplazamiento en las bandas *SPR* de las AgNPs cuando se dejan reaccionar con el antibiótico ENRO.

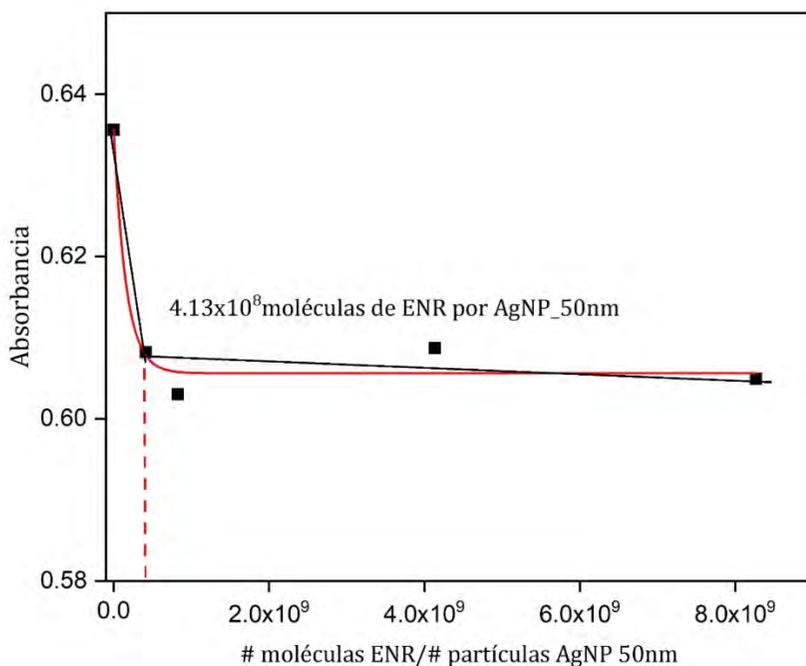


Figura 62. Variación del método de las relaciones molares para la determinación de la estequiometría del complejo de ENRO con AgNPs de 50nm. La línea discontinua roja representa la estequiometría del complejo.

En resumen, el estudio espectrofotométrico de las interacciones entre la ENRO con las AgNPs no mostró cambios importantes en los espectros de absorción de las AgNPs de 10 o 50nm. Las AgNPs de 10nm recubiertas de iones citratos mostraron un ligero desplazamiento *batocrómico* con aumento de la anchura de la banda que indica un ligero

aumento del tamaño de la nanopartícula. Mientras que la disminución del ancho en la banda *SPR* de las AgNPs de 50nm recubiertas con *PVP* indican una disminución del tamaño de estas nanopartículas. Este resultado se puede explicar análogamente al estudió con la AMX, ya que se observa la misma tendencia con la variación del recubrimiento de las AgNPs. Aunque la poca variación de los espectros sugiere que las interacciones entre la ENRO y las AgNPs son más débiles que las encontradas entre la AMX y las AgNPs. Y se demuestra que las interacciones no tienen la misma naturaleza (a través de grupo carboxilo) ya que las bandas características de la ENRO no variaron al ponerse en contacto con las AgNPs.

#### 3.6.4 Técnicas electroquímicas en la caracterización de complejos de enrofloxacin con plata iónica y nanopartículas de plata.

La bibliografía científica menciona el estudio y cálculo de constantes de formación de complejos entre la ENRO y especies metálicas por diferentes métodos electroquímicos. La caracterización potenciométrica de complejos entre antibióticos del grupo fluoroquinolonas y diferentes metales muestra, por ejemplo, que la ENRO forma complejos muy estables con metales trivalentes como Fe(III) y Al(III). Mientras que con metales divalentes como Ca(II) y Mg(II) tienen constantes de formación mucho menores y son menos estables. En esta referencia no se estudian los posibles complejos de la ENRO con metales monovalentes [171].

También se han empleado métodos voltametricos en el estudio de interacciones entre especies orgánicas y metálicas. La voltametría de onda cuadrada y la diferencial de pulso han sido utilizadas para calcular constantes de estabilidad entre metales divalentes y ligandos que tienen en su estructura grupos ácidos y aminos, similares a los que presenta la ENRO en su estructura química [151]. De todas las técnicas voltamétricas destaca la voltametría cíclica (*CV*) como la más utilizada para el estudio de este tipo de interacciones. La *CV* se ha utilizado en diversos trabajos de estudio de la interacción del ADN con los complejos metálicos [172]. La variación de  $E_p$  y la  $I_p$  del complejo metálico en presencia de ADN indica una interacción entre ambas especies y permite determinar el modo de interacción. La disminución de  $I_p$  del complejo por la adición de cantidades crecientes de

ADN permiten la determinación de la constante de estabilidad y el tamaño del sitio de unión entre el ADN y el complejo metálico [173].

La caracterización de complejos metálicos por métodos voltamétricos tiene un gran número de publicaciones científicas. Sin embargo, no se ha encontrado en la bibliografía científica publicaciones sobre el uso de técnicas voltamétricas para estudiar las interacciones entre el antibiótico ENRO y la Ag(I) y/o AgNPs.

En este apartado se resumen los resultados que hemos encontrado en la caracterización voltamétrica de complejos ENRO-Ag(I) y ENRO-AgNPs. Se empleó *DPV* y *ASV* en la caracterización de los complejos ENRO-Ag(I), y *VIP* para los complejos ENRO-AgNPs. Se han calculado las constantes de formación de estos complejos por el método *Deford-Hume*.

### 3.6.5 Caracterización de complejos de ENRO-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos).

Las muestras identificadas como **Ag(I)-S0** a la **Ag(I)-S4** se prepararon en un volumen final de 20mL de KNO<sub>3</sub> 0,1M y se dejaron reaccionar durante 2h en agitación orbital. Las composiciones de las disoluciones son las descritas en el apartado 1.3.1. Se midieron por *DPV* en la misma forma descrita en el apartado 1.6.1, por triplicado.

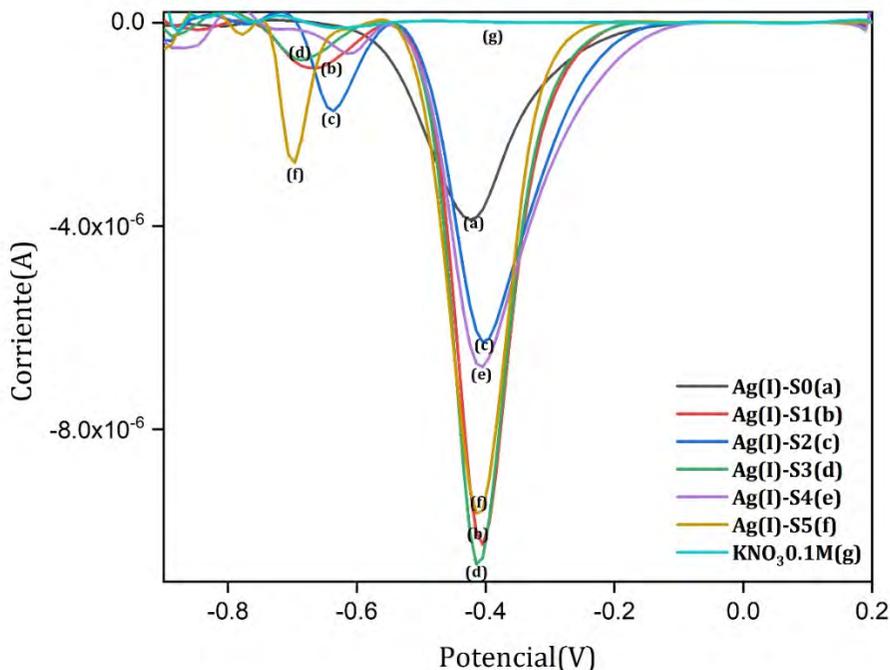
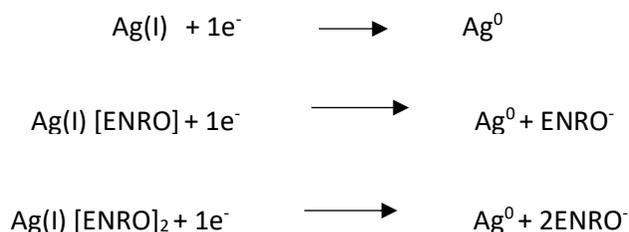


Figura 63. Voltagramas DPV de disoluciones mezcla de Ag(I) 1mM con ENRO: (a) 0mM(negro); (b) 2mM(rojo); (c) 4mM(azul); (d) 8mM(verde); (e) 10mM(violeta); (f) 20mM(amarillo) y (g) KNO<sub>3</sub> 0,1M(verde claro). Condiciones de medida como la figura anterior.

El voltagrama sobre la disolución de electrolito soporte (KNO<sub>3</sub> 0,1M) no mostró corrientes en el intervalo de potenciales estudiado, según lo esperado (Figura 63). Mientras que en la muestra **Ag(I)-S0** se observó una única señal a  $E_{p1} = -0,43 \pm 0,05$  perteneciente a la reducción de la Ag(I) a Ag(0). Cuando se mezclaron las disoluciones de Ag(I) y ENRO (mezclas de **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4**) ocurrieron cambios significativos en los voltagramas. Se observó un desplazamiento de  $E_{p1}$  a potenciales menos negativos y la aparición de un nuevo pico de reducción a potenciales más negativos ( $E_{p2}$ ). El desplazamiento de  $E_{p1}$  a menores potenciales de reducción indica la formación de una nueva especie de plata que se forma en presencia de ENRO. Dicha especie se reduce directamente (complejo inerte, no lábil, que se reduce directamente sin disociación previa), necesitando un menor potencial (energía) para su ruptura y reducción. Esta especie se identificó como un complejo Ag(I) [ENRO]. La aparición de un nuevo pico de reducción a potenciales de

reducción más negativos se explica por la formación de la especie  $\text{Ag(I)} [\text{ENRO}]_2$  la cual necesita más energía para su ruptura y reducción.



También se observaron diferencias entre la  $I_p$  en la disolución **Ag(I)-S0**, donde no hay presencia de ENRO y las demás disoluciones (**Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4**). En la medida de **Ag(I)-S0** se observó un pico de reducción ensanchado cuyo valor de  $I_p$  fue de  $-8,3 \cdot 10^{-4}$ , mientras que las disoluciones siguientes se observó un aumento de las intensidades de pico con un estrechamiento de los mismos. Esto puede deberse a la presencia de un exceso de ENRO desde la muestra **Ag(I)-S1**, este exceso permite que se pueda establecer un equilibrio con la especie  $\text{Ag(I)} [\text{ENRO}]$  que favorece su reducción. El estrechamiento del pico es consistente con la tesis de que el coeficiente de difusión de la especie intermedia  $\text{Ag(I)} [\text{ENRO}]$  es mayor que la de  $\text{Ag(I)}$ . Las intensidades y los potenciales de pico de las muestras de la **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4** no mostraron diferencias significativas como puede observarse en la Tabla 19.

El resultado obtenido concuerda con la formación de las especies  $\text{Ag(I)} [\text{ENRO}]$  y  $\text{Ag(I)} [\text{ENRO}]_2$  encontrada por medidas espectrofotométricas, que también describen la formación de estos complejos [131].

Tabla 19. Medidas por voltimetría directa de las disoluciones mezclas Ag(I)-S0 a Ag(I)-S4.

Mezclas	Área1	E1	Área2	E1
<b>Ag(I)-S0</b>	$-8 \cdot 10^{-4}$ $\pm 3 \cdot 10^{-4}$	-0,43 $\pm 0,05$	-	-
<b>Ag(I)-S1</b>	$-1,16 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3 \cdot 10^{-5}$	-0,404 $\pm 0,000$	$-1,1 \cdot 10^{-4}$ $\pm 1 \cdot 10^{-5}$	-0,66 $\pm 0,01$
<b>Ag(I)-S2</b>	$-2 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1 \cdot 10^{-3}$	$-0,390 \pm 0,010$	$-1 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5}$	-0,67 $\pm 0,03$
<b>Ag(I)-S3</b>	$-1,2 \cdot 10^{-3} \pm 8 \cdot 10^{-4}$	$-0,410 \pm 0,000$	$-4 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	-0,62 $\pm 0,09$
<b>Ag(I)-S4</b>	$-1,9 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$	$-0,380 \pm 0,030$	$-3 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-4}$	-0,70 $\pm 0,05$

### 3.6.6 Cálculo de las constantes de formación de los complejos Ag(I) [ENRO]<sub>n</sub> por el desplazamiento de los potenciales de pico (ecuación de Nernst).

Con los valores mostrados en la Tabla 19 y la ecuación 4 se calcularon las constantes de formación de las especies Ag(I) [ENRO] y Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub>. Para la especie Ag(I) [ENRO] se encontró un valor de constante de  $1,5 \pm 0,3 \text{CJ}^{-1}$  mientras que para la especie Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub>  $8 \pm 0,5 \text{CJ}^{-1}$ . No hay referencias del cálculo de las constantes del antibiótico ENRO y especies de plata partir de medidas voltamétricas.

Empleando valoraciones potenciométricas, se han publicado constantes de formación de complejos con diversos metales en disolución utilizando electrodos selectivos de estos metales, en intervalos de pH entre 2 y 11, y en un medio de fuerza iónica 0.1M. Los resultados obtenidos muestran una disminución de las constantes de estabilidad con la disminución de la valencia de los metales, con valores alrededor de  $\log k_2 \sim 44$  y  $\log k_1 \sim 25$  para complejos M(III) [ENRO]<sub>x</sub> de Al(III) y Fe(III) [170]. Mientras que para los iones Ca(II), Mg(II) y Cu(II) se obtuvieron valores alrededor de  $\log k_2 \sim 24$  y  $\log k_1 \sim 10$  para las especies

M(II) [ENRO]<sub>x</sub> [119]. Los valores que hemos calculado en el procedimiento anterior para la Ag(I) son inferiores a los calculados para los metales divalentes, cumpliendo de forma prevista esta tendencia.

### 3.6.7 Caracterización de complejos de Ag(I) [ENRO]<sub>n</sub> por ASV.

La ASV fue utilizada para estudiar la variación de la concentración de plata libre con el aumento de la concentración del antibiótico ENRO. La etapa de depósito se realizó con un  $E_e = -0.4V$  durante  $t_e = 120s$ , ajustado al potencial de reducción medido por voltametría directa (apartado 3.6.4). Bajo estas condiciones se depositaron en la superficie del electrodo tanto la especie Ag(I) como la Ag(I) [ENRO], ya que esta última se reduce a menores potenciales. Solo se podrá distinguir entre estas especies y la Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub> la cual es una especie más estable y en voltametría directa mostró un potencial de reducción de  $0,65 \pm 0,05V$ .

El estudio se llevó a cabo con 5 muestras de disoluciones en las cuales se mantuvo la concentración de Ag(I) constante ( $2\mu M$ ) y la concentración de ENRO varió de  $0mM$  a  $0,5mM$ . Las mezclas se identificaron como **Ag(I)-A0**; **Ag(I)-A1**; **Ag(I)-A2**; **Ag(I)-A3**; **Ag(I)-A4** y **Ag(I)-A4**. La composición y las condiciones de reacción de estas muestras se describen en la sección de preparación de disoluciones (apartado 1.3.1).

En la disolución **Ag(I)-A0** se obtuvo un pico de oxidación de Ag(I) total  $I_p = 7,66 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-9}A$ . La muestra posteriormente medida fue la **Ag(I)-A1**, en esta muestra no se observó una disminución significativa en la  $I_p$  alcanzándose un valor de  $I_p = 7,4 \cdot 10^{-7} \pm 3 \cdot 10^{-8}A$ . Esto se debe a que la relación molar entre la Ag(I) y la ENRO en la muestra **Ag(I)-A1** (1:1) no es suficiente para la formación de la especie Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub>. A partir de la muestra **Ag(I)-A2** y hasta la **Ag(I)-A4** se observaron disminuciones sucesivas y significativas que indican la formación de la especie Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub>. Los valores de  $I_p$  de las muestras **Ag(I)-A2**; **Ag(I)-A3** y **Ag(I)-A4** fueron  $6,45 \cdot 10^{-7} \pm 5 \cdot 10^{-9}A$ ;  $4,9 \cdot 10^{-7} \pm 5 \cdot 10^{-8}A$  y  $4,1 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-8}A$  respectivamente. Este comportamiento se encuentre en concordancia con el resultado obtenido en la voltametría directa DPV donde se observó una corriente debida a la especie Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub> a partir de una relación molar 1:3 [Ag(I):ENRO]. En la muestra **Ag(I)-A5** no se observó la tendencia de

la disminución de  $I_p=4,20 \cdot 10^7 \pm 8 \cdot 10^{-9} \text{A}$ ) el cual no presenta diferencias significativas con respecto a la disolución **Ag(I)-A4**. En ambos casos las relaciones molares entre Ag(I) y ENRO son  $\geq 1:100$ , con un exceso de ENRO, y solo queda libre la Ag(I) en equilibrio con la Ag(I) [ENRO]<sub>2</sub> la cual es constante en las mismas condiciones de medida.

Las variaciones de  $E_p$  en las muestras de estudio no siguieron una misma tendencia. Mientras que en las muestras **Ag(I)-A1** y **Ag(I)-A2** se observó un desplazamiento a menores potenciales (0,022V) con respecto a **Ag(I)-A0** (0,032V) en las muestras **Ag(I)-A3** a la **Ag(I)-A5** los potenciales de oxidación fue de 0,037V; 0,055V y 0,049V, respectivamente. En la Figura 64 se pueden observar los voltagramas mencionados.

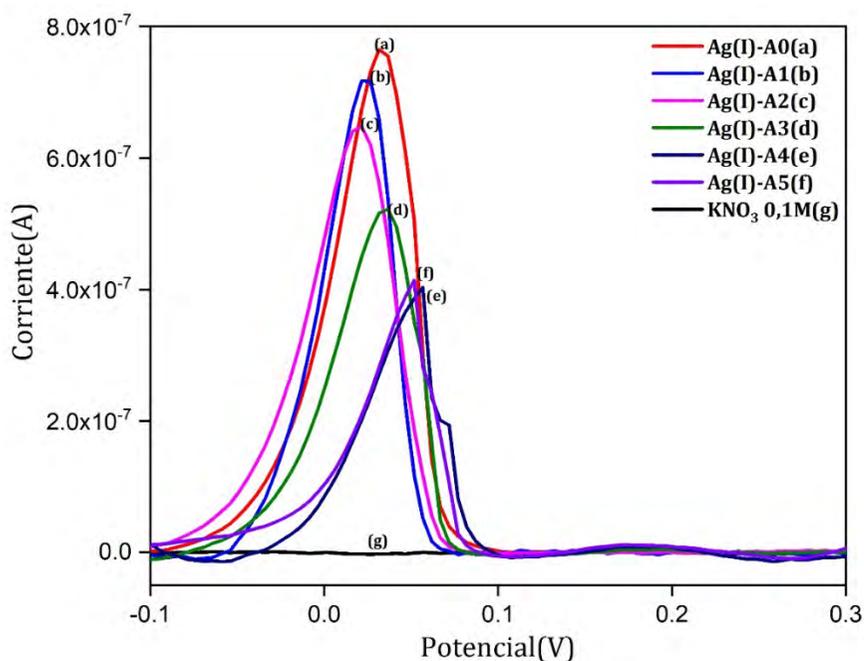


Figura 64. Voltagramas de las disoluciones mezcla de Ag(I) 2 $\mu$ M con AMX: (a) 0mM(rojo); (b) 2 $\mu$ M(azul claro); (c) 20 $\mu$ M(violeta); (d) 100 $\mu$ M(verde); (e) 200 $\mu$ M(azul oscuro); 500 $\mu$ M(lila) y (f) KNO<sub>3</sub> 0,1M(negro). Condiciones de medida como en la Figura 47.

### 3.6.8 Cálculo de la contante de formación de los complejos $Ag(I) [ENRO]_n$ por el método *Deford-Hume*.

Los valores de  $I_p$  y  $E_p$  obtenidos del análisis por ASV permiten la determinación de las contantes de estabilidad de los complejos  $Ag(I) [ENRO]$  y  $Ag(I) [ENRO]_2$  por el método de *Deford-Hume*. El fundamento y los tipos de cálculos de este método se detallan en el apartado 3.4.4.

Se calculó la función  $F_0(AgI)$  según la ecuación UV-Vis 6 y se representó frente a la variación de la concentración de ENRO libre (Figura 65). Dicha representación mostró una tendencia ajustada en un 99.9 % por una ecuación polinómica de segundo grado:  $F(x) = 1,2 \cdot 10^7 X^2 - 7,9 \cdot 10^3 X + 1,9$ . El ajuste no lineal a esta ecuación y la obtención de sus parámetros se realizó con el software OriginPro 2020 v.9.7.0.188.

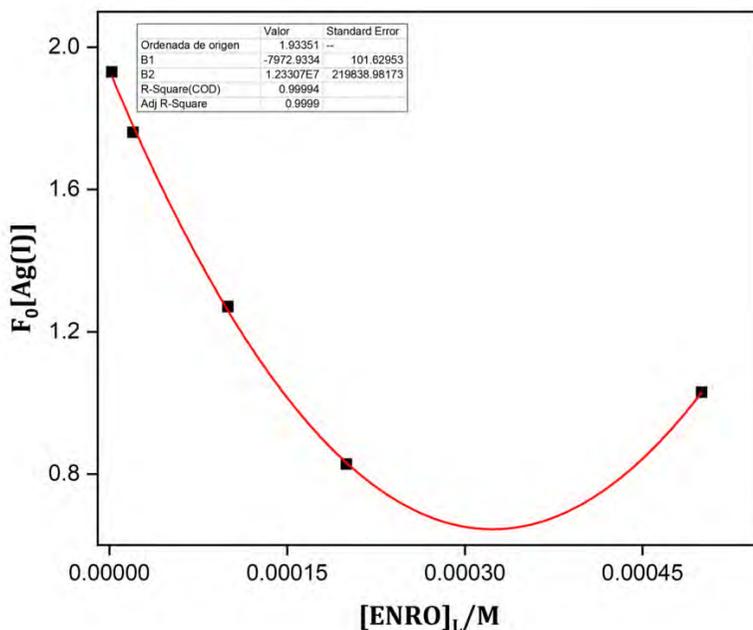


Figura 65. Representación gráfica de la función cuadrática  $F_0(AgI)$  frente a  $[ENR]L$  siguiendo el método de *Deford-Hume*.

Con el valor del logaritmo de las pendientes del gráfico  $F0(AgI)$  frente a  $[ENR]L$ , se calcularon las constantes de estabilidad de las especies  $Ag(I)$   $[AMX]$  y  $Ag(I)$   $[AMX]_2$ , obteniéndose  $\log \beta_1=3,90\pm 0,01$  y  $\log \beta_2=7,09\pm 0,01$ , respectivamente. Estos valores son cercanos a los calculados por el método del incremento de los potenciales de pico (empleando la *ecuación de Nerst*). Ambos métodos dieron como resultado valores de constantes de estabilidad menores que las encontradas para los complejos de  $Ag(I)$  con  $AMX$ . Este hecho es consistente con la menor variación de la  $I_p$  entre las muestras que solo contenían  $Ag(I)$  y que se les añadieron distintas concentraciones de antibiótico.

### 3.6.9 Caracterización de complejos de ENRO-AgNPs por VIP.

Para el estudio electroquímico de las interacciones entre las AgNPs y la ENRO se utilizó el método *VIP*, *no siendo posible en disolución por las grandes cantidades de AgNPs que serían necesarias*. Se dejaron reaccionar AgNPs de diámetros nominales 10nm y 50nm con concentraciones variables de ENRO. Las AgNPs se distinguieron además de por el diámetro por su recubrimiento para evitar agregaciones. El patrón de AgNPs de 10nm se encontraba recubierto de iones citrato, mientras que las AgNPs de 50nm con el polímero *PVP*.

Las interacciones entre la ENRO y las AgNPs de menor tamaño se midieron en las muestras de la **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**, y las de mayor tamaño con las denominadas **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5**. La preparación de estas muestras se describe en el apartado 1.3.1, y las condiciones instrumentales para las medidas en el apartado 3.2.2.

En la muestra **m\_10nm-0** se observó un pico de oxidación ( $E_p=0,168V$  de  $I_p=1,22\cdot 10^{-7}A$ ). De la muestra **m\_10nm-2** a **m\_10nm-4** se observó un desplazamiento de este pico hasta potenciales  $E_p$  de 0,188V, 0,222V, y 0,253V, respectivamente. La  $I_p$  se vio disminuida en las muestras **m\_10nm-1** ( $1,15\cdot 10^{-7}A$ ); **m\_10nm-3** ( $6,78\cdot 10^{-8}A$ ) y **m\_10nm-4** ( $2,85\cdot 10^{-8}A$ ) describiendo una tendencia con el aumento de ENRO. Las muestras **m\_10nm-1** a **m\_10nm-5** no mostraron picos de oxidación de las AgNPs, por lo que se tomaron en cuenta. La falta de picos de corriente en **m\_10nm-1** es un resultado anómalo, probablemente por el tipo de electrodo empleado. Mientras que la falta de señal en la muestra **m\_10nm-5** se debe a que la concentración se encuentra por debajo de límite de detección de la técnica (Figura 66).

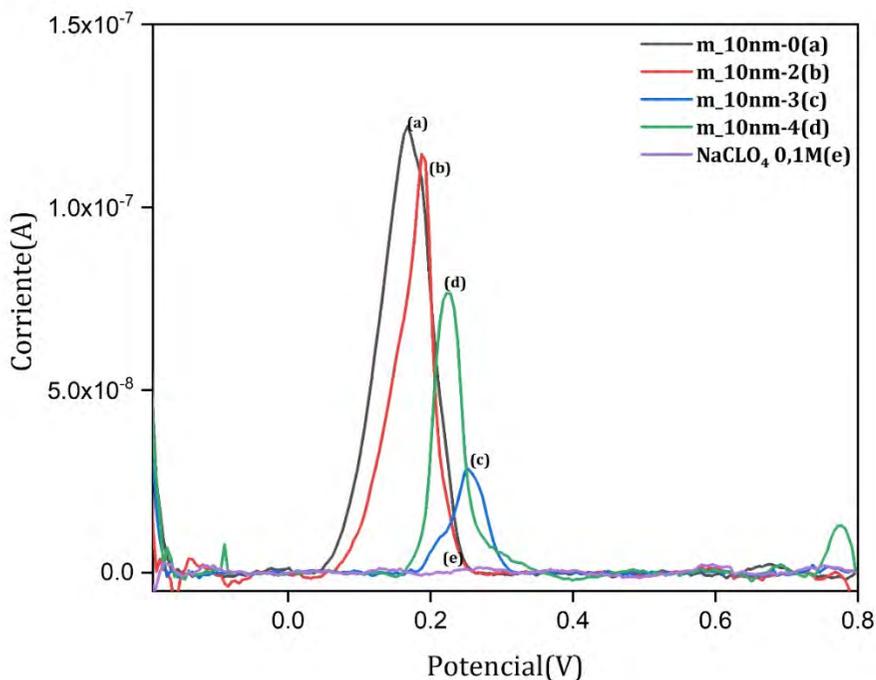


Figura 66. Voltagramas de las disoluciones mezcla de AgNPs de 10nm a 0,05mM con ENRO: (a) 0mM(negro); (b) 0,1mM(rojo); (c) 0,5mM(azul); (d) 1mM(verde); (e) NaClO<sub>4</sub> 0,1M (violeta). Condiciones de medida como en la figura anterior.

El voltamperograma de la muestra **m\_50nm-0** mostró un pico de oxidación de las AgNPs de 50nm a 0,203V valor superior que el encontrado en la muestra **m\_10nm-0**, debiéndose al mayor diámetro de las AgNPs. Al mezclar las AgNPs de 50nm con concentraciones creciente de ENRO se observó un desplazamiento del  $E_p$  hacia menores potenciales de oxidación. En las muestras **m\_50nm-1** y **m\_50nm-2** el  $E_p$  se situó en los 0,183V mientras que en las muestras **m\_50nm-3** y **m\_50nm-4** el  $E_p$  se desplazó hasta 0,173 y 0,179V respectivamente. La  $I_p$  disminuyó con el aumento de la concentración de ENRO desde  $1,91 \cdot 10^{-6}A$  en **m\_50nm-0** hasta  $5,08 \cdot 10^{-7}A$  en **m\_50nm-4**. La tendencia a la disminución también se observó en las muestras intermedias **m\_50nm-1**; **m\_50nm-2** y **m\_50nm-3** donde la  $I_p$  fue  $1,05 \cdot 10^{-6}A$ ;  $5,59 \cdot 10^{-7}A$  y  $5,08 \cdot 10^{-7}A$ , respectivamente (Figura 67).

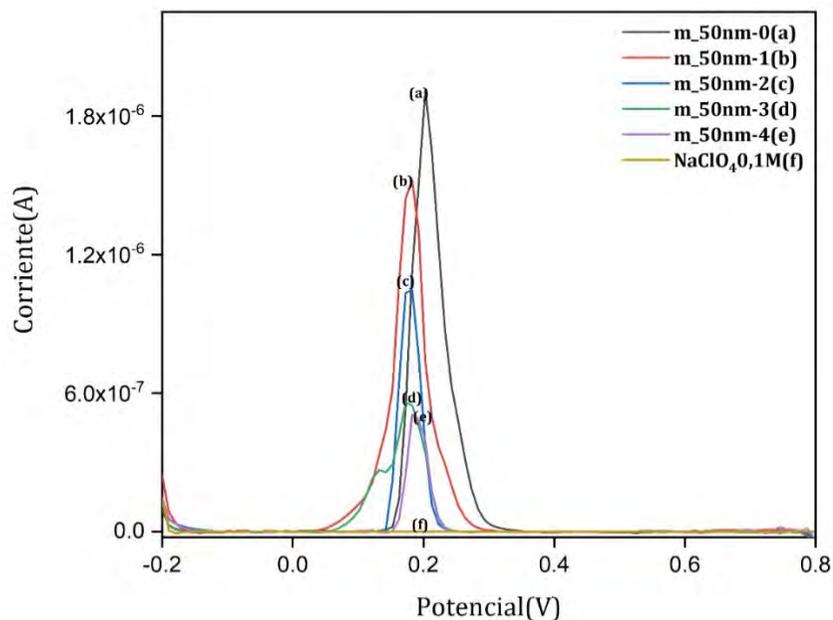


Figura 67. Voltagramas de las disoluciones mezcla de AgNPs de 50nm a 0.05mM con AMX: (a) 0mM(negro); (b) 0.05mM(rojo); (c) 0.1mM(azul); (d) 0.5mM(verde); (e) 1Mm(violeta) y  $\text{NaClO}_4$  0.1M(amarillo). Condiciones de medida como en la Figura 66.

En general, tanto para las AgNPs de 10nm (**m\_10nm-0** a la **m\_10nm-4**) como para las de 50nm (**m\_50nm-0** a la **m\_50nm-4**) se observó una disminución de la  $I_p$  con el aumento de la concentración de la ENRO. Mientras que el  $E_p$  mostró dos tendencias diferentes con el aumento de la concentración de la ENRO. Se observó un desplazamiento hacia mayores potenciales  $E_p$  en las AgNPs de 10nm, lo que indica que es necesario una mayor energía para la oxidación de las AgNPs de 10nm al ponerse en contacto con la ENRO y estas moléculas reemplacen a los aniones citratos. Mientras que la mezcla de las AgNPs de 50nm con ENRO produjo un desplazamiento del  $E_p$  hacia menores potenciales, que indica que es necesario una menor energía para la oxidación de las AgNPs de 50nm cuando es remplazado el recubrimiento *PVP* por las moléculas de ENRO.

Este resultado coincide con el obtenido en el estudio de las interacciones de las AgNPs de 10nm y 50nm con la AMX. Por lo que se mantiene la hipótesis que si bien la sustitución de los iones citratos por moléculas de antibiótico (ENRO o AMX) aumenta el tamaño de la

AgNPs de 10nm, la sustitución de las moléculas de *PVP* por moléculas de antibióticos en la superficie de las AgNPs de 50nm disminuye el tamaño de las mismas.

### 3.6.10 Cálculo electroquímico de la constante de formación de los complejos ENRO-AgNP por el método *Deford-Hume*.

Las variaciones observadas en los voltamperogramas de las AgNPs al ponerse en contacto con ENRO indican que existen interacciones entre ambas especies. Las intensidades de estas interacciones (de forma equivalente a las constantes de formación de los complejos correspondientes) se cuantificaron utilizando el método de *Deford-Hume*. Las  $I_p$  y  $E_p$  de las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-4** y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4** se utilizaron para calcular las constantes de estabilidad de los complejos *AMX-AgNP-10nm* y *AMX-AgNP-50nm*.

El gráfico de  $F0(AgNP_{10nm})$  frente a  $[ENR]L$  se ajustó a una línea recta, obteniéndose  $R=0,9963$ , siendo la ecuación calculada  $y = 3,92 \cdot 10^2 X + 0,9$  (Figura 68). El gráfico  $F0(AgNP_{50nm})$  frente a  $[ENRO]L$  también se ajustó a una línea recta, obteniéndose la ecuación  $y = 6,9 \cdot 10^3 X + 1,3$  ( $R=0,9942$ ) (Figura 67).

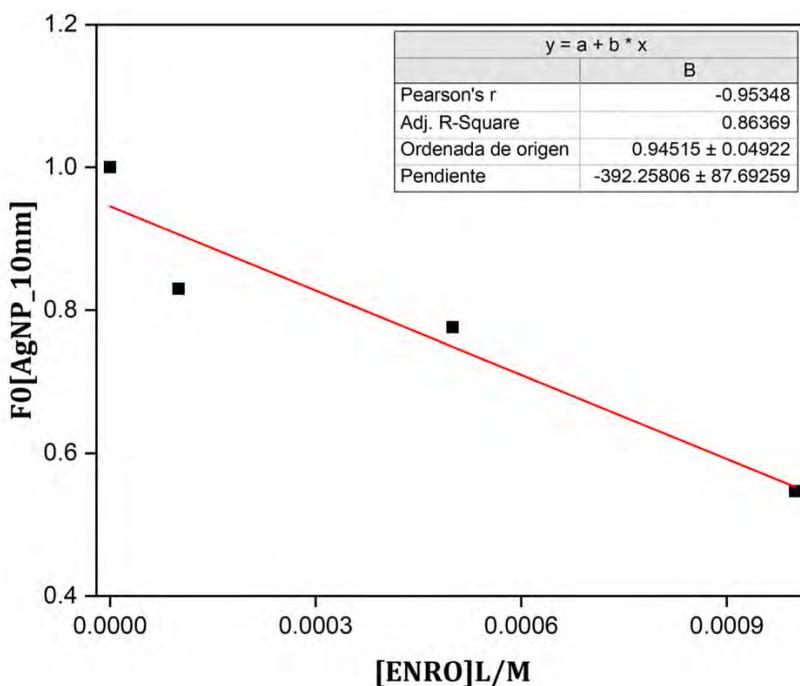


Figura 68. Representación gráfica (lineal) de la función de  $F_0(\text{AgNP}_{10\text{nm}})$  frente a la concentración de  $[\text{ENRO}]L$ , empleando el método *Deford-Hume*.

Las constantes de estabilidad de los complejos de ENRO-AgNP-10nm y ENRO-AgNP-50nm que se calcularon fueron:  $\log \beta_1 = 2,5 \pm 0,1$  y  $\log \beta_1 = 3.84 \pm 0,02$ , respectivamente. Este resultado se encuentra en concordancia con el obtenido en el estudio de las interacciones de las AgNPs con AMX. En ambos estudios las tendencias se explicaron por ecuaciones lineales y los valores de las constantes estuvieron por debajo de las calculadas para las especies de antibiótico con Ag(I). Los valores de  $\log \beta_1$  (ENRO-AgNP-10nm) y  $\log \beta_1$  (ENRO-AgNP-50nm) son ligeramente inferior que los obtenidos con la AMX, pero mantienen la relación  $\log \beta_1$  (ENRO-AgNP-10nm) <  $\log \beta_1$  (ENRO-AgNP-50nm).

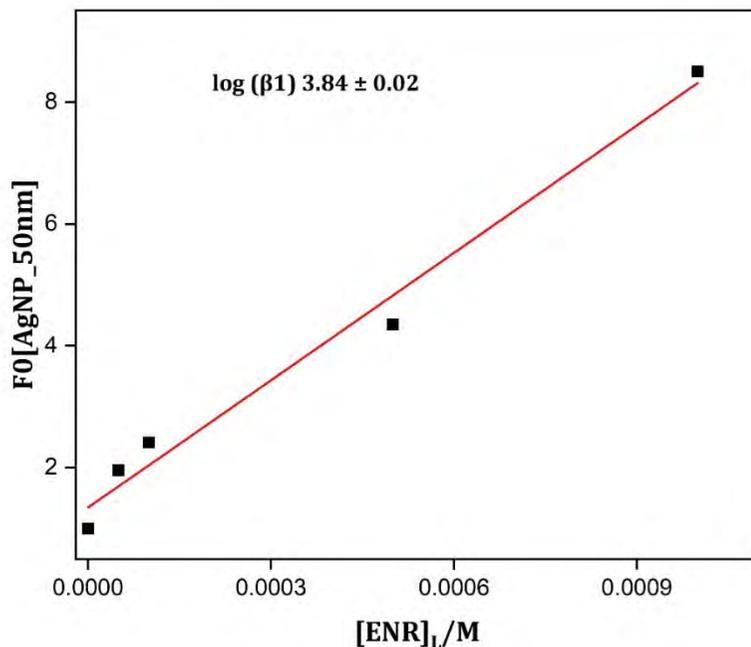


Figura 69. Representación gráfica de la función lineal  $F0(AgNP_{50nm})$  frente a la concentración de  $[ENR]_L$  (método *Deford-Hume*).

### 3.7 Otras técnicas instrumentales para la caracterización de los complejos de enrofloxacin con nanopartículas de plata.

Además de la EAM-UV-Vis y los métodos electroquímicos descritos, se obtuvo información analítica con otras técnicas, como la cromatografía hidrodinámica, para estudiar las interacciones de las especies de plata con la ENRO. *HDC* para ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos por las otras técnicas. Sin embargo, las medidas DLS no dieron buen resultado, al igual que ocurrió con esta técnica en el estudio de los complejos de nanopartículas de plata con el antibiótico AMX (sección 3.3.3).

### 3.7.1 Caracterización de complejos de ENRO con AgNPs con HDC.

Las denominadas disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-4** y de **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4** se midieron con *HDC*, con las mismas que las descritas en el apartado 3.2.4, cada una por triplicado.

En la Figura 70 se muestran los cromatogramas de las disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-4**. La señal de las AgNPs-10nm en la muestra **m\_10nm-0** tuvo un tiempo  $t_r=8,04\pm 0,00\text{min}$ . En las muestras de la **m\_10nm-1** a la **m\_10nm-4** se obtuvieron valores entre  $t_r=7,95\pm 0,00\text{min}$  (**m\_10nm-0**) y  $t_r=7,70\pm 0,03\text{min}$ , por lo que se observó una ligera disminución del tiempo de retención ( $t_r$ ), lo que significa un ligero aumento en el diámetro de las AgNPs modificadas. Estos resultados descartan la formación de agregados de nanopartículas, pues en ese caso se hubieran obtenido más de un solo pico de señal. Estos resultados por sí solos no son concluyentes, por lo que se complementó con medidas de absorción molecular EAM-UV-Vis, tal como se explica en el apartado 3.6.2.

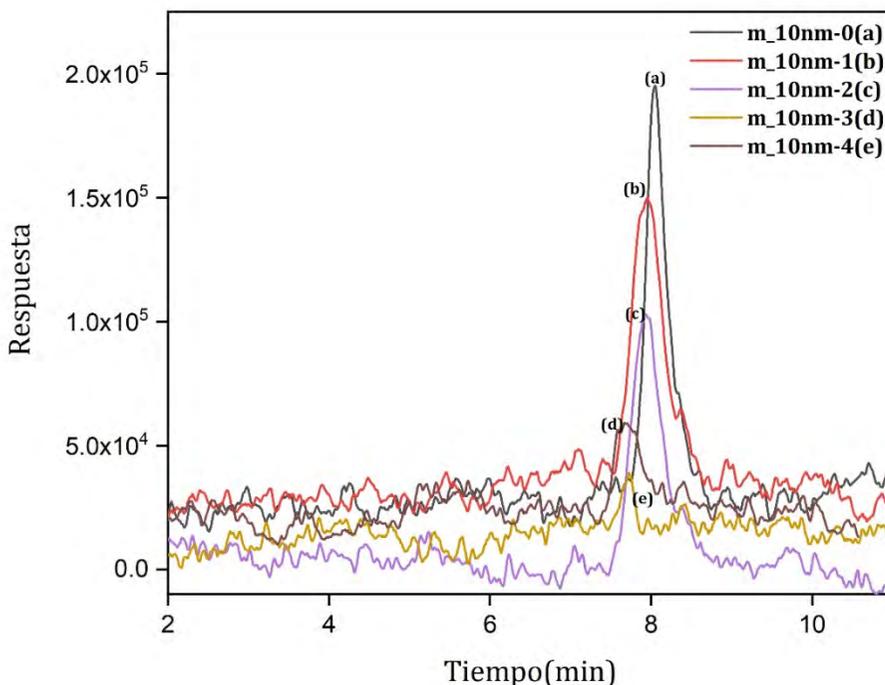


Figura 70. Cromatogramas HDC de disoluciones de AgNPs de 10nm a 0,05mM con ENRO: (a) 0mM (negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(violeta); (d) 0,5mM (amarillo); (e) 1mM

(marrón). Las medidas se llevaron a cabo en una columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de  $1,6\text{mL min}^{-1}$ , y un volumen inyectado de  $20\mu\text{L}$ .

Los cromatogramas de las disoluciones **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5** se muestran en la Figura 71. La señal obtenida con AgNPs de 50nm en la muestra **m\_50nm-0** tuvo un  $t_r=7,910\pm 0,000\text{min}$ . En las disoluciones **m\_50nm-1** a **m\_50nm-4** no se observaron variaciones en el  $t_r$ , que fueron del orden de  $7,89\pm 0,02\text{min}$ . Nuevamente, de las medidas realizadas se deduce que no hay evidencias de variaciones de tamaño en el caso de las AgNPs de 50nm, pero se descarta la formación de agregados de las nanopartículas de plata o de sus complejos, ya que se observa un solo pico.

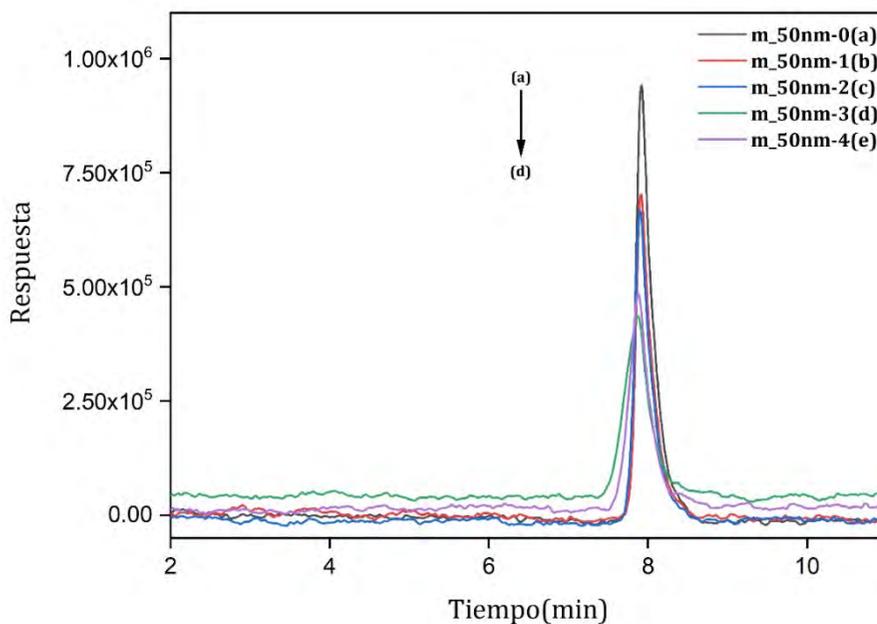


Figura 71. Cromatogramas HDC de las mezclas de AgNPs de 50nm a 0,05mM con ENRO: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta). Las medidas se llevaron a cabo en una columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de  $1,6\text{mL min}^{-1}$ , después de inyectar  $20\mu\text{L}$  de las muestras.

La conclusión más importante que nos demuestran las medidas de *HDC* es que no se producen aglomeración de las AgNPs, solas o en presencia del antibiótico ENRO. Lo que

nos permite afirmar que los cambios en los espectros de absorción de los espectros EAM-UV-Vis se deben a cambios en los grupos cromóforos del antibiótico y no a cambios en el plasmón superficial de las AgNPs debidos a estas agregaciones o aglomeraciones. Al igual que no se producen en las medidas electroquímicas, que se han realizado en las mismas condiciones químicas y físicas.

## AZITROMICINA

### 3.8 Caracterización del complejamiento de azitromicina con plata iónica y nanopartículas de plata.

Al igual que con los dos antibióticos precedentes, en esta parte de la memoria se llevó a cabo un estudio similar con un tercer antibiótico muy común y muy empleado, como es la azitromicina (AZT). El objetivo fue abordar este tipo de interacciones de la plata con un antibiótico de otra familia distinta, y comparar los resultados obtenidos con los otros antibióticos descritos en los apartados anteriores de esta memoria de Tesis Doctoral.

Los macrólidos son un amplio grupo de antibióticos que se derivan principalmente de las bacterias [174]. Se caracterizan por presentar un anillo lactónico macrocíclico al que se unen diversas desoxiazucres. Los diferentes macrólidos se clasifican atendiendo al número de miembros de la molécula [175], perteneciendo la azitromicina (AZT) al grupo de macrólidos de 15 miembros [176].

Las primeras referencias bibliográficas sobre las interacciones entre los antibióticos macrólidos y metales aparecen ya en la década de los años '60 [177]. Medidas de absorción molecular evidencian que el número de miembros es un factor determinante en la interacción y por ende el transporte de metales complejados, y se mencionan para macrólidos de entre 20 y 25 miembros valores de constantes de complejamiento del orden entre  $10\text{-}10^2$  con metales alcalinos y alcalinos térreos, a la vez que no se evidencian interacciones entre estos metales y los antibióticos macrólidos de 10 miembros [178].

Lo anterior influye en la biodisponibilidad de AZT y su presencia en el medio ambiente, que se ve afectada en aproximadamente un 24% cuando es co-administrada con

medicamentos antiácidos que contienen cationes multivalentes como Al(III) y Mg(II) [175]. Lo que demuestra la interacción entre el antibiótico y algunos metales. Esto ha fomentado el interés en la investigación de las reacciones de formación de complejos entre la AZT y algunos de los llamados metales esenciales como son el Cu(II); Fe(II); Zn(II). Estas investigaciones indican que la AZT puede formar complejos de estequiometría 1:1 con el Cu(II) y el Fe(II), mientras que puede alcanzar una mayor coordinación de hasta 4:1 con Cu(II) y el Zn(II). Los resultados anteriores se obtuvieron mediante mediciones espectrofotométricas y conductimétricas [179].

Técnicas espectroscópicas como la FT-IR y el  $^1\text{H}$ -RMN han permitido determinar los sitios de enlaces entre la AZT y algunos metales. En el estudio por FT-IR se observó un cambio en las bandas de vibración del grupo amino alifático y de los grupos hidroxilos cuando la AZT se puso en contacto con varios metales. En acuerdo con estos resultados, la espectroscopía  $^1\text{H}$ -RMN mostró la ausencia de la señal perteneciente al protón del grupo hidroxilo al ponerse en contacto la AZT con disoluciones de los metales Cu(II); Mn(II); Fe(III); Cr(III); Co(II); Ni(II) y Ca(II). Además, se observó una disminución en la multiplicidad de la señal del protón del grupo metílico unido a la amina. Tanto por FT-IR como por  $^1\text{H}$ -RMN se confirma que la coordinación de la AZT con los metales que se han estudiado ocurre a través del grupo hidroxilo y/o el grupo amino presentes en los aglicones unidos al anillo de 15 miembros [113]; [175].

Entre los estudios mencionados no se reportan resultados de interacciones entre la AZT y la Ag(I). Sin embargo, han sido encontradas referencias que muestren la existencia de interacciones entre la AZT y las AgNPs que han sido utilizadas en la fabricación de las llamadas nanodrogas conjugadas [180]. Tampoco en la bibliografía existen referencias sobre el uso de métodos electroquímicos para la caracterización de complejos de AZI con Ag(I) o AgNPs, aunque está demostrada la utilidad de estos métodos en la caracterización de complejos metálicos con ligandos de tipo orgánico [181].

En este apartado se estudian las interacciones que se producen entre la AZT, la Ag(I), y las AgNPs de 10nm y 50nm, empleando métodos voltamétricos (voltametría directa y voltametría de redisolución). El método de *Deford-Hume* fue utilizado en el cálculo de la

constante de estabilidad de los complejos de la ENRO con las diferentes especies de plata, y las técnicas EAM UV-Vis y *HDC* complementaron la interpretación de los resultados electroquímicos en el estudio de dichos complejos, como hemos descrito anteriormente.

A continuación, se presentarán los resultados que hemos encontrado sobre la caracterización de los complejos AZT-Ag(I) y AZT-AgNPs por las técnicas EAM UV-Vis, electroquímicas y *HDC*.

### 3.8.1 EAM UV-Vis en la caracterización de complejos de azitromicina con plata iónica y nanopartículas de plata.

La azitromicina (AZT), (N-metil-9a-aza-9-desoxo-9-dihidro-9a-homoeritromicina A) es un antibiótico de la familia de los antibióticos macrólidos de 15 miembros llamados azalidas (Figura 72) [115]. Se usa para el tratamiento de una serie de enfermedades infecciosas como: neumonía, bronquitis infecciones de piel y tejidos blandos y algunas enfermedades de transmisión sexual [174]. La principal diferencia estructural entre la AZT y los macrólidos naturales es la presencia de un grupo metilo en el nitrógeno perteneciente al anillo lactámico.

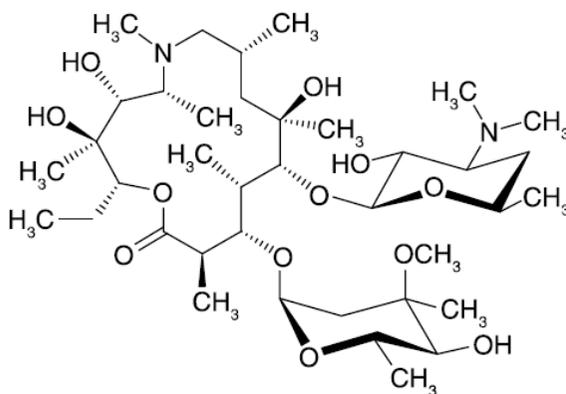


Figura 72. Estructura de la azitromicina

La AZT no se caracteriza por tener cromóforos que permitan que la molécula absorba por encima de 230nm [176]; [179]. La molécula de AZT presenta varios grupos hidroxilos (-OH) y 2 grupos de aminos terciarios, en donde puede haber transferencias electrónicas de

tipo  $n-\sigma^*$  que provocan señales entre 170 y 190nm. También contiene un grupo carboxilato endocíclico que da lugar a transiciones  $n-\pi^*$ , que generan bandas débiles de absorción alrededor de 210nm. Como el resto de moléculas orgánicas, la AZT presenta enlaces C-C que dan lugar a transiciones  $\sigma-\sigma^*$  las cuales proporcionan absorbancia en el espectro visible [175]; [182]. La Figura 73 muestra las medidas de absorción molecular de disoluciones de AZT a varias concentraciones, pudiéndose observar en estos espectros la falta de señales en el intervalo de longitudes de ondas estudiadas a partir de aproximadamente 225 nm.

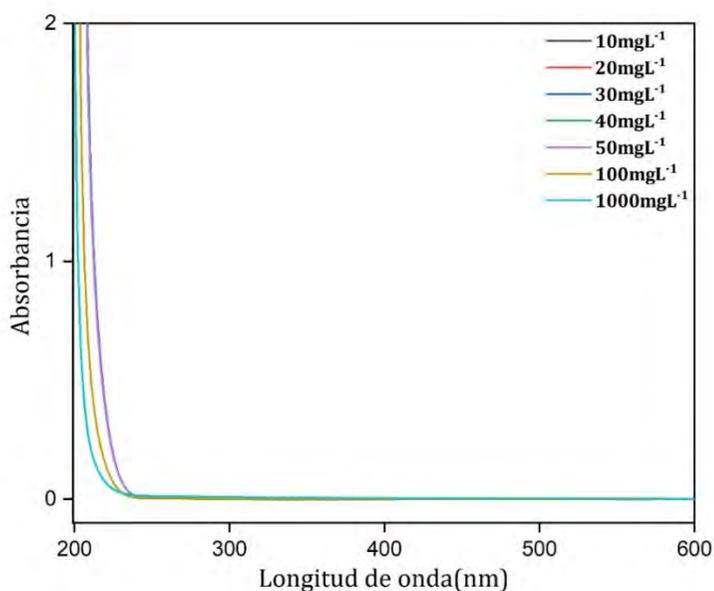


Figura 73. Espectro de absorción molecular de disoluciones de AZT de entre  $10\text{mg L}^{-1}$  y  $1000\text{mg L}^{-1}$ . Las medidas se llevaron a cabo en un intervalo de longitudes de onda de  $600\text{nm}$  a  $200\text{nm}$ , con una velocidad de barrido de longitudes de onda de  $200\text{nm min}^{-1}$ .

La falta de absorbancia de la AZT en el espectro visible o ultravioleta cercano limita el estudio espectrofotométrico de las interacciones con  $\text{Ag(I)}$  o con otros metales iónicos, siendo solo útil para el estudio de interacciones con metales cuyos iones solvatados presentan absorbancias. Sin embargo, la espectrofotometría se ha utilizado para el estudio de las interacciones entre las AgNPs y la AZT. En este estudio se midieron los cambios que produce el antibiótico en la banda *SPR* de las AgNPs

### 3.8.2 Estudio del complejo AZT-Ag(I) por EAM UV-Vis.

Como se ha indicado AZI en el apartado anterior, el estudio de interacciones entre los metales y la AZT por espectrofotometría molecular se limita al estudio con metales cuyos iones solvatados presentan absorbancia, como el Cu(II) con disoluciones acuosas azules o de Fe(II) cuyas disoluciones acuosas son amarillas.

Las disoluciones de Ag(I) son incoloras debido a la alta estabilidad de su configuración electrónica ( $[\text{Kr}] 4d^{10}$ ). Los electrones de valencia plata Ag(I) son 10 y se encuentran ocupando el orbital 4d. La ocupación total de un nivel energético brinda cierta estabilidad a los sistemas electrónicos, por lo que es necesario suministrar mayor energía para la excitación de los electrones de dicho nivel.

La ausencia de bandas de absorción, tanto de la Ag(I) como de la AZT, no hace posible estudiar mediante AEM-UV-Vis las interacciones de la plata iónica con este antibiótico.

### 3.8.3 Estudio del complejo AZT-AgNPs por EAM UV-Vis.

En este apartado se describen nuestros resultados del estudio de las interacciones de AZT con las AgNPs por EAM UV-Vis, calculando la estequiometría de sus complejos empleando una variación del método de las relaciones molares.

Se midieron disoluciones mezcla en las que se varió la concentración de la AZT frente a una concentración constante de AgNPs. Las disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5** se utilizaron con las AgNPs de 10nm de diámetro, y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5** para AgNPs de 50nm. Las disoluciones se prepararon como se describe en el apartado 1.3.1, y sus composiciones se resumen en las tablas 3 y 4. Estas disoluciones se dejaron interaccionar durante 2h temperatura ambiente, sin agitación.

El máximo de absorbancia de la banda *SPR* del patrón nominal AgNPs-10nm a 0.05mM (**m\_10nm-0**) (negro), se situó en los 392nm y tuvo una absorbancia de 0,750 en concordancia con el análisis de dicha muestra en apartados anteriores (Figura 74). Se observó una disminución de la absorbancia con el aumento de la concentración de AZT hasta 0,478 en la muestra donde la relación AgNPs:AZT fue 1:100. La banda *SPR* sufrió un ligero desplazamiento batocrómico desde 392nm (**m\_10nm-0**) hasta 397nm (**m\_10nm-5**).

El W se vio afectado notablemente con la adición de la AZT. A partir de la muestra **m\_10nm-2** donde la relación AgNPs:AZT fue 1:2 ya el cambio de W se hizo notable.

La Tabla 20 muestra un resumen de las bandas de absorción. Las variaciones de absorbancia observadas demuestran un aumento del tamaño de las AgNPs de 10nm al ponerse en contacto con la AZT, es decir, se produce su complejamiento o unión química.

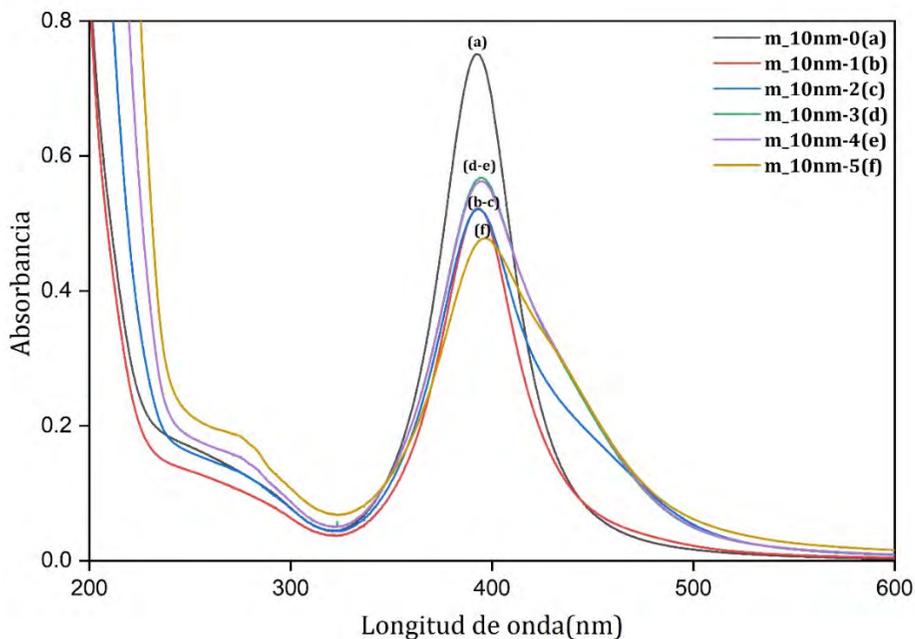


Figura 74. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 10nm a 0,05mM con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta) y (f) 1mM(amarillo). Velocidad de barrido de 200nm min<sup>-1</sup>.

Tabla 20. Resumen de las bandas de absorción en las disoluciones m\_10nm-0 a m\_10nm-5.

Mezcla	m_10nm-0	m_10nm-1	m_10nm-2	m_10nm-3	m_10nm-4	m_10nm-5
$\lambda(\text{SPR})^a$ nm	392	393	393	394,4	394,3	397
$A(\text{SPR})^b$ nm	0,750	0,522	0,521	0,568	0,563	0,478
$W(\text{SPR})^c$ nm	321-527	328-563	322-600	321,4-600	321,4-600	323->600

<sup>a</sup> $\lambda(\text{SPR})$ , longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 10nm; <sup>b</sup> $A(\text{SPR})$ , Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 10nm;

<sup>c</sup> $W(\text{SPR})$ , Ancho de la banda SPR de AgNPs de 10nm.

El método de las relaciones molares indica que cada AgNP de 10nm se encuentra rodeada de  $6,6 \cdot 10^6$  moléculas de AZT (Figura 75). Lo que equivale a decir que, aproximadamente, se produce la unión de  $2,2 \cdot 10^4$  moléculas de AZT por nanómetro cuadrado. En este caso se encontró un menor nº de moléculas de antibiótico por nanómetro cuadrado que en el caso de la AMX y de la ENRO, siendo este resultado consistente con el menor desplazamiento de las bandas *SPR* de las AgNPs cuando se ponen en contacto con la AZT. Se explica por la significativamente mayor masa molecular que presenta la AZT ( $749 \text{g mol}^{-1}$ ) en comparación con AMX ( $365 \text{g mol}^{-1}$ ) y la ENRO ( $359 \text{g mol}^{-1}$ ), es decir, por variaciones del tamaño del antibiótico.

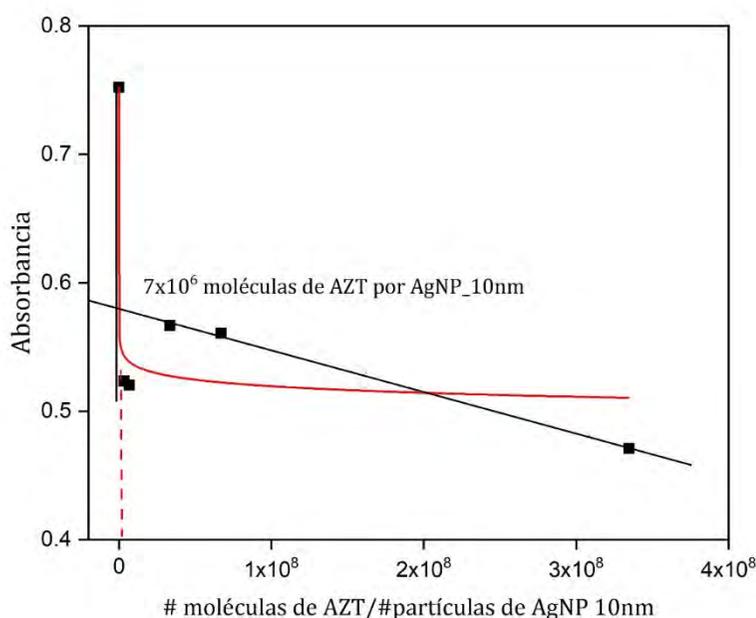


Figura 75. Variación del método de las relaciones molares para la determinación de la estequiometría del complejo de AZT con AgNPs de 10nm. La línea discontinua roja representa la estequiometría del complejo.

No se observaron cambios significativos en los espectros de absorción molecular de las disoluciones **m\_50nm** con el aumento de la concentración de AZT. La banda *SPR* de las AgNPs de 50nm en ausencia de AZT (**m\_50nm-0**) tuvo un valor de absorbancia  $A=0,623$ , y no se observó ninguna tendencia con el aumento de la concentración de AZT. Todas las

muestras mostraron el mismo  $W$ , como se puede observar en la Figura 76. La figura muestra una zona ampliada donde se detalla la pequeña tendencia hacia un desplazamiento batocrómico de la banda *SPR*.

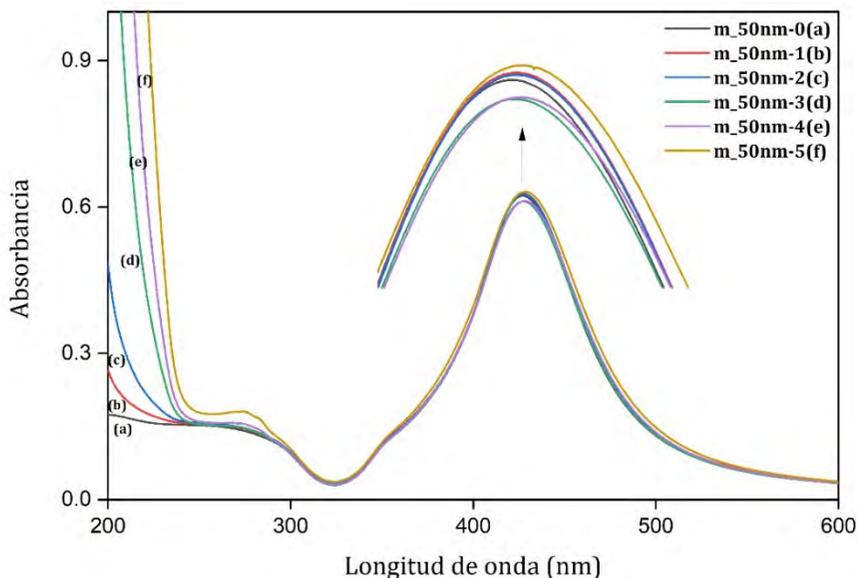


Figura 76. Espectro de absorción molecular de las disoluciones AgNPs de 50nm a 0,05mM con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta) y (f) 1mM(amarillo). Velocidad de barrido 200nm min<sup>-1</sup>.

Aunque las variaciones que se producen en los espectros de absorbancia de las nanopartículas de plata son pequeñas, los valores de absorbancia permiten calcular la relación molar (Figura 77). En la Tabla 21 se resumen las características de los espectros de las disoluciones **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5**. La estequiometría calculada fue  $3,9 \cdot 10^8$  moléculas de AZT por cada AgNP de 50nm. Lo que equivale a que aproximadamente se unen  $2,2 \cdot 10^4$  moléculas de AZT por cada nanómetro cuadrado de superficie de la nanopartícula.

En resumen, las AgNPs de 10nm recubiertas de iones citratos mostraron un ligero desplazamiento batocrómico y un aumento de la anchura de la banda de plasmón superficial, que indica un aumento pequeño del diámetro de las nanopartículas de plata.

Por el contrario, que los espectros de las AgNPs de 50m recubiertas con *PVP* no mostraron cambios significativos.

Tabla 21. Resumen de los parámetros espectrofotométricos de las disoluciones m\_50nm-0 a m\_50nm-5, en el estudio de las interacciones AZT y AgNPs de 50nm.

Mezcla	m_50nm-0	m_50nm-1	m_50nm-2	m_50nm-3	m_50nm-4	m_10nm-5
$\lambda$ (SPR) <sup>a</sup> nm	427	427,8	427,8	427,4	428,2	428,4
A(SPR) <sup>b</sup> nm	0,623	0,627	0,626	0,611	0,613	0,631
W (SPR) <sup>c</sup> nm	322,6-600	323,4-600	323,2-600	323,0-600	323,3-600	324->600

<sup>a</sup> $\lambda$ (SPR), longitud de onda del máximo de absorción de la banda SPR de AgNPs de 50nm; <sup>b</sup>A(SPR), Absorbancia de la banda SPR de AgNPs de 50nm;

<sup>c</sup>W(SPR), Ancho de la banda SPR de AgNPs de 50nm.

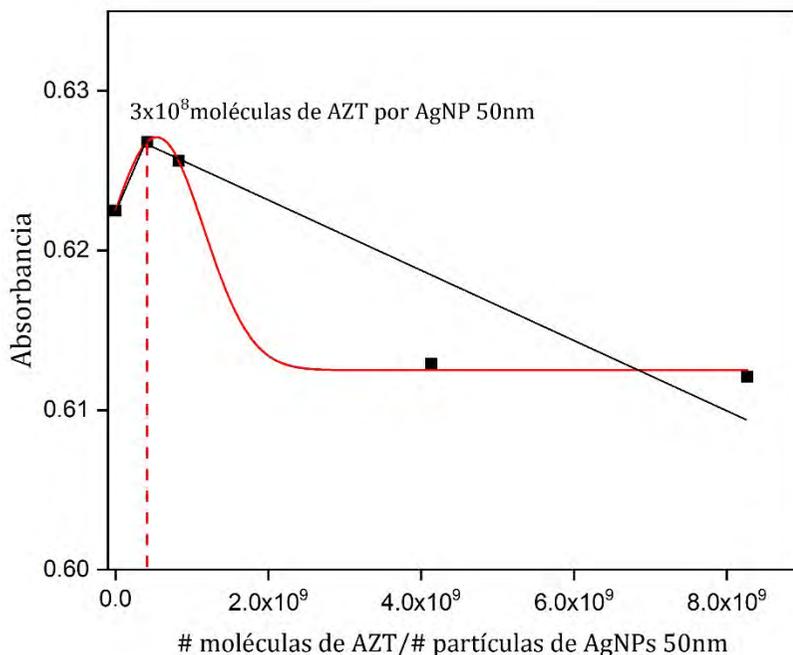


Figura 77. Resultados del método modificado de las relaciones molares para la determinación de la estequiometría del complejo de AZT con AgNPs de 50nm. La línea discontinua roja representa la estequiometría del complejo.

### 3.9 Técnicas electroquímicas en la caracterización de complejos de azitromicina con plata iónica y nanopartículas de plata.

La familia de los macrólidos tiene la propiedad de formar complejos estables con una gran variedad de metales, ya sean metales alcalinos, alcalinos-térreos, o de transición [183]. La caracterización de estos complejos se ha llevado a cabo principalmente por EAM-UV-Vis, en el caso de disoluciones catiónicas coloreadas o que presentan absorción molecular en el visible. La FT-IR y el <sup>1</sup>H-RMN también se han utilizado para la caracterización de complejos de antibióticos macrólidos con metales, proporcionando mucha información analítica sobre los grupos involucrados en el enlace [184]. Hay pocas referencias del uso de técnicas electroquímicas en la caracterización de dichos complejos, pese a las ventajas del uso de estos métodos. Por ejemplo, se han calculado constantes de formación de

complejos de antibióticos macrólidos y metales alcalinos y alcalinos térreos mediante voltametría en la interfase de dos disoluciones de electrolitos inmiscibles (*ITIES*) [185].

El principio del método *ITIES* presenta cierta analogía con la de un electrodo selectivo a iones. Se basa en la determinación de la diferencia de potencial que se genera entre dos fases inmiscibles, las cuales contienen cierta actividad de un mismo ion. Los iones son típicamente insolubles en disolventes orgánicos, pero la presencia en dicha fase de una molécula complejante puede facilitar el transporte del metal aumentando su carácter lipofílico. El transporte de esta especie cargada (catión) a través de la interfase genera una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de iones transportados. La adición de electrolitos en ambas fases permite que se pueda aplicar la diferencia de potencial adecuada para que ocurra el transporte de iones. Las sales utilizadas como electrolitos deben ser solubles solo en una de las fases, y generalmente se utilizan el LiCl para la fase acuosa y sales de amonio cuaternarias para la fase orgánica. Aunque en el proceso no hay corrientes debido a la oxidación o reducción de especies sobre la superficie de electrodo, el transporte de un ion entre dos fases genera un voltograma similar al producido por un par redox, y su análisis puede ser utilizado para la determinación de coeficientes de difusión, rendimientos de extracción y constantes de estabilidad entre otros parámetros [185]; 186].

El cálculo de constantes de constante de formación de complejos entre metales alcalinos y alcalinos térreos con josamicina, espiramicina y eritromicina se ha descrito por este procedimiento [183]. Las medidas se llevaron a cabo en una celda voltamétrica de cuatro electrodos, la fase orgánica estuvo constituida por el éster de ortonitrofenildiocilo (o-NPOE) y el tetra paraclorofenilborato de tetradodecilamonio (TDATpCIPB) como el electrolito de soporte de la fase orgánica. El macrólido en estudio también fue añadido a la fase orgánica. La escala potencial se estableció sobre la base del pico de transferencia de iones de perclorato, utilizando una disolución de perclorato de litio y los métodos voltamétricos usados fueron la voltametría cíclica y la de onda cuadrada.

La azitromicina solo forma complejos de estequiometría 1:1 con los metales estudiados, con constantes de estabilidad pequeñas, del orden de  $\log \beta \sim 3$ , mientras que los metales divalentes tuvieron mayores valores de estas constantes [187]; [188]. La AZT nuestra mayor

similitud estructural con la eritromicina, por lo que es posible que los complejos de AZT presenten constantes de estabilidad comparables con las de este antibiótico, como se demuestra con los resultados obtenidos con otras técnicas instrumentales como la EAM [176]; [189].

Aunque en muchos casos se ha determinado AZT por métodos voltamétricos, no se ha encontrado ninguna referencia que estudie con estas técnicas la formación de complejos del antibiótico con metales [190-192]. Se ha empleado la voltametría para estudiar las interacciones de la AZT con albumina de suero bovino [193].

En este apartado se resumen los resultados encontrados en la caracterización de los complejos de AZT-Ag(I) y AZT-AgNPs. Los métodos *DPV* y *ASV* se utilizaron en la caracterización de los complejos AZT-Ag(I), mientras que los complejos AZT-AgNPs se estudiaron por *VIP*. Se calculan también las constantes de formación de estos complejos por el método *Deford-Hume*.

### 3.9.1 Caracterización de complejos de AZT-Ag(I) por voltametría directa (voltametría diferencial de pulsos).

Las muestras identificadas como **Ag(I)-S0** a **Ag(I)-S4** se midieron por triplicado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. Las composiciones de estas disoluciones son las del apartado 1.3.1.

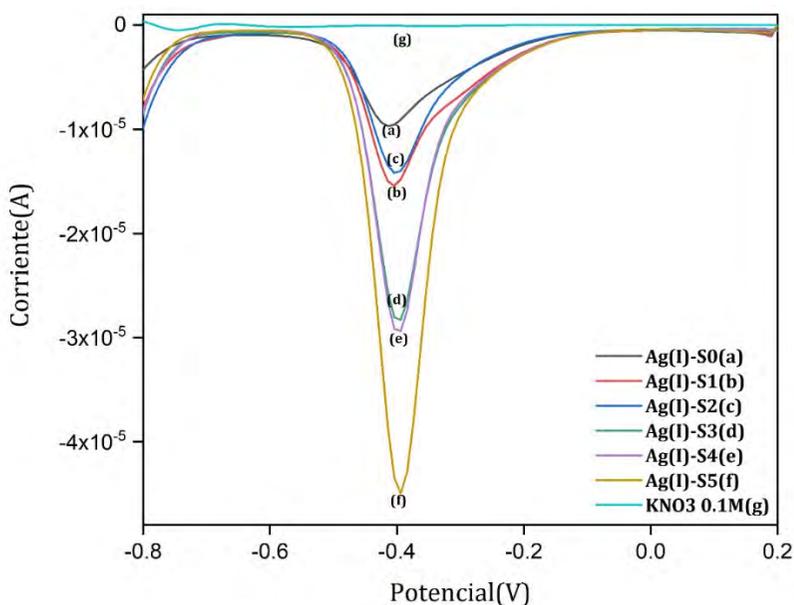


Figura 78. Voltagramas DPV de disoluciones mezcla de Ag(I) 1mM con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 2mM(rojo); (c) 4mM(azul); (d) 8mM(verde); (e) 10mM(violeta); (f) 20mM(amarillo) y (g) KNO<sub>3</sub> 0,1M(verde claro). Condiciones de medida como en la figura anterior.

Los voltagramas obtenidos se muestran en la Figura 78. El voltagrama blanco del electrolito soporte (KNO<sub>3</sub> 0,1M) no mostró picos de corriente en el intervalo de potenciales estudiado. En la disolución **Ag(I)-S0** aparece un pico de corriente a  $E_p = -0,417 \pm 0,006$ , debido a la reducción de Ag(I) a Ag(0). Cuando se mezclaron las disoluciones de Ag(I) y AZT (mezclas de **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4**), se produce un desplazamiento de  $E_p$  hacia potenciales menos negativos, de igual forma a como ocurre en los complejos de Ag(I) con el antibiótico ENRO. Este comportamiento se explica por la formación de una nueva especie complejada de plata que se forma en presencia de AZT, que requiere una mayor energía potencial (menor potencial eléctrico) para su reducción. Esta especie se identificó como el complejo Ag(I) [AZT].



Los valores de  $I_p$  aumentaron con el aumento de la concentración de AZT. La  $I_p$  en la disolución **Ag(I)-S0** fue de  $-1 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-5}$ . Mientras que en las muestras de **Ag(I)-S1** a la **Ag(I)-S4** se observó un aumento de  $I_p$ , con un valor máximo  $I_p = -5 \cdot 10^{-6} \pm 2 \cdot 10^{-5}$  en la disolución con mayor relación molar Ag(I):AZT (1:1000). El resultado obtenido indica la formación de la especie Ag(I) [AZT] como única especie resultante de la interacción entre AZT y Ag(I). Los valores de  $I_p$  y  $E_p$  se muestran en la Tabla 22..

Tabla 22. Medidas por voltimetría directa de las disoluciones mezclas **Ag(I)-S0** a **Ag(I)-S4**.

Mezclas	Área	E(V)
<b>Ag(I)-S0</b>	$-1,7 \cdot 10^{-4} \pm 4 \cdot 10^{-5}$	$-0,417 \pm 0,006$
<b>Ag(I)-S1</b>	$-2,9 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5}$	$-0,404 \pm 0,000$
<b>Ag(I)-S2</b>	$-2 \cdot 10^{-4} \pm 7 \cdot 10^{-5}$	$-0,404 \pm 0,000$
<b>Ag(I)-S3</b>	$-4,2 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-5}$	$-0,397 \pm 0,006$
<b>Ag(I)-S4</b>	$-5,4 \cdot 10^{-6} \pm 2 \cdot 10^{-5}$	$-0,394 \pm 0,000$

No se encontró el mismo comportamiento de las mismas disoluciones (**Ag(I)-S0** a la **Ag(I)-S5**) con los antibióticos AMX, ENRO y AZT. Mientras que con los antibióticos AMX y ENRO se vió un desplazamiento del pico de reducción acompañado de la aparición de un nuevo pico de reducción, demostrando una estequiometría 1:2, el estudio con AZT no mostró dos picos de reducción, que indicaría la formación de un complejo de estequiometría 1:1. Este resultado fue coincidente con los resultados que obtuvimos a partir de las medidas espectrofotométricas [183].

### 3.9.2 Cálculo de la constante de formación de los complejos Ag(I) [AZT]<sub>n</sub> por el desplazamiento de los potenciales de pico (ecuación de Nernt)

Teniendo en cuenta la *ecuación 3* y los valores calculados en la Tabla 22UV-Vis se calculó la constante de formación del complejo Ag(I) [AZT]. Se obtuvo un valor  $\log \beta_1=0,7\pm 0,2\text{CJ}^{-1}$ , comparable con los encontrados para macrólidos de 20 miembros y eritromicina con metales monovalentes  $\log k_1$  1-2 y  $\log k_1 > 3$ , respectivamente. Los complejos con metales divalentes Cu(II) [AZT] y Fe(II) [AZT] presentan valores mayores:  $7,7\cdot 10^{14}$  y  $5,4\cdot 10^{10}$ , respectivamente.

### 3.9.3 Caracterización de los complejos de Ag(I) [AZT]<sub>n</sub> por ASV.

En este apartado se describen los resultados de las medidas de la concentración de Ag(I) libre una vez reaccionada con concentraciones crecientes de AZT, medidas con sensibilidad empleando ASV. El potencial de la primera etapa de preconcentración ( $E_e=-0,40$  V) se intentó escoger cuidadosamente para asegurar que se deposita exclusivamente y de forma selectiva sólo la Ag\* presente en la disolución, y no la plata complejada con AZT, de acuerdo con el voltograma directo medido previamente (apartado 3.9.1). Si bien, en estas condiciones se depositarán en la superficie del electrodo tanto la especie Ag(I) como la Ag(I) [AZT], ya que ambas reacciones electroquímicas se diferencian en menos de 30mV. Las disoluciones se midieron por triplicado. Pero tal como se indica, no es posible diferenciar voltaméricamente ambas especies de plata libre y complejada con el antibiótico.

En la Figura 79 se muestran los voltagramas ASV de las disoluciones **Ag(I)-A0** a **Ag(I)-A4**, cuyas composiciones y modo de preparación se describen en el apartado 1.3.1. En la muestra **Ag(I)-A0** se obtuvo un pico de oxidación de Ag(I) total con  $I_p=3\cdot 10^{-7}\pm 1\cdot 10^{-7}$  A a un  $E_p=0,082\pm 0,000$  V. No se observaron diferencias significativas entre las  $I_p$  de las muestras de la **Ag(I)-A1** a la **Ag(I)-A4** ( $2\cdot 10^{-7}\pm 1\cdot 10^{-7}$  A;  $3\cdot 10^{-7}\pm 1\cdot 10^{-7}$  A;  $1\cdot 10^{-7}\pm 1\cdot 10^{-7}$  A;  $3\cdot 10^{-7}\pm 1\cdot 10^{-7}$  A) y de la **Ag(I)-A0**. El  $E_p$  se desplazó hasta  $0,089\pm 0,003$  V en la muestra **Ag(I)-A1** y hasta  $0,092\pm 0,000$  V en las disoluciones **Ag(I)-A2** a **Ag(I)-A4**.

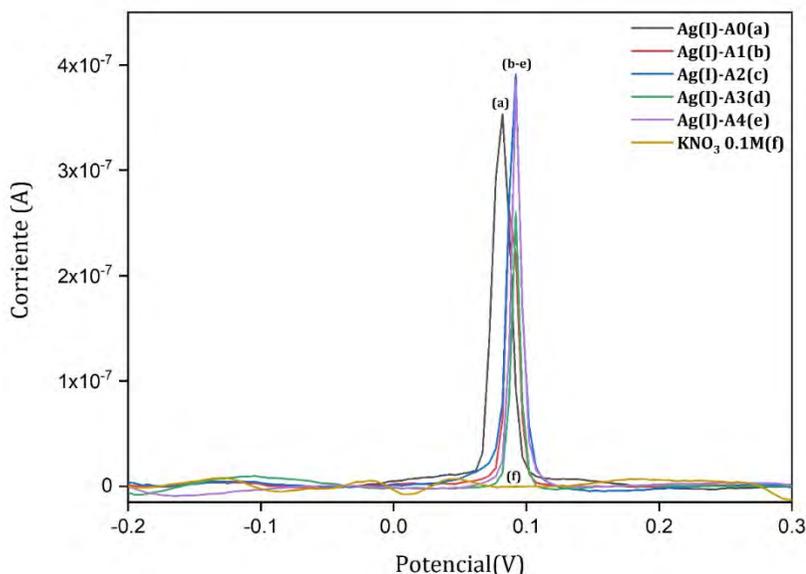


Figura 79. Voltagramas de las disoluciones mezcla de Ag(I) 2 $\mu$ M con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 2 $\mu$ M(rojo); (c) 20 $\mu$ M(azul); (d) 200 $\mu$ M(verde); (e) 2000 $\mu$ M(violeta); (f) KNO<sub>3</sub> 0,1M(amarillo). Condiciones de medida como en la Figura 78.

### 3.9.4 Cálculo de las contantes de formación de los complejos Ag(I) [AZT] por el método *Deford-Hume*.

Los valores de  $I_p$  y  $E_p$  de las disoluciones **Ag(I)-A0** a la **Ag(I)-A5** medidas por *ASV* se utilizaron para la determinación de la contante de estabilidad del complejo de *Ag(I) [AZT]* por el método de *Deford-Hume*. El cálculo empleado se explica en el apartado 3.4.4. Se calculó la función  $F0(AgI)$  según la *ecuaciónUV-Vis 7* y se representó frente a la variación de la concentración de AZT libre. Como resultado, no se observó ninguna relación entre la función  $F0(AgI)$  y la concentración libre de AZT (Figura 80).

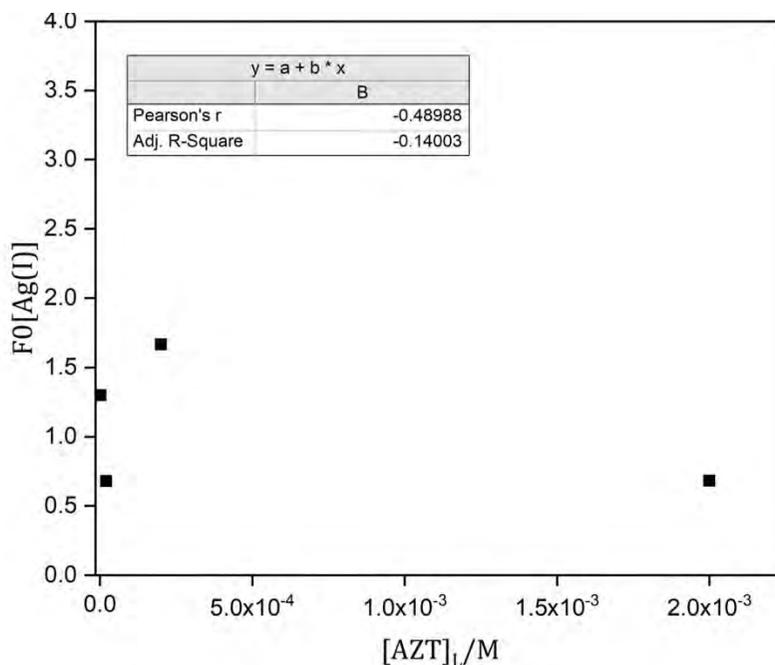


Figura 80. Representación gráfica de la función  $F0(AgI)$  frente a  $[AZT]L$  siguiendo el método de *Deford-Hume*.

La  $F0(X)$  depende principalmente de la  $\Delta E_p$  y en menor medida de la relación  $i_p$  (ecuación 8). En las mezclas de  $Ag(I)$  y AZT no se observó una tendencia al aumento de  $\Delta E_p$  con el aumento de la concentración de la AZT (Figura 80). Por lo tanto, este cálculo no permitió determinar la constante de estabilidad de la especie  $Ag(I)$  y AZT, al no encontrar evidencia matemática de la formación de complejos entre ambas especies.

### 3.9.5 Caracterización de complejos de AZT-AgNPs por VIP.

Se mezclaron AgNPs de diámetros nominales 10nm y 50nm con concentraciones crecientes de AZT y se dejaron reaccionar durante toda la noche. Las disoluciones se identificaron como **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5** y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-5**, de composiciones análogas a las empleadas anteriormente (apartado 1.3.1).

El pico de oxidación de las AgNPs de 10nm en la muestra **m\_10nm-0** tuvo valores  $E_p=0,217V$  e  $i_p=5,3 \cdot 10^{-6}A$ , y en **m\_10nm-2** a **m\_10nm-5** se observó un desplazamiento de  $E_p$  de 0,207V, 0,202V, 0,197V y 0,192V, respectivamente. La  $i_p$  sufrió una disminución en las

muestras **m\_10nm-2** ( $3,1 \cdot 10^{-6}A$ ); **m\_10nm-3;4** ( $2,9 \cdot 10^{-6}A$ ) y **m\_10nm-5** ( $8,7 \cdot 10^{-7}A$ ) que está relacionado con el aumento de la concentración AZT. (Figura 81).

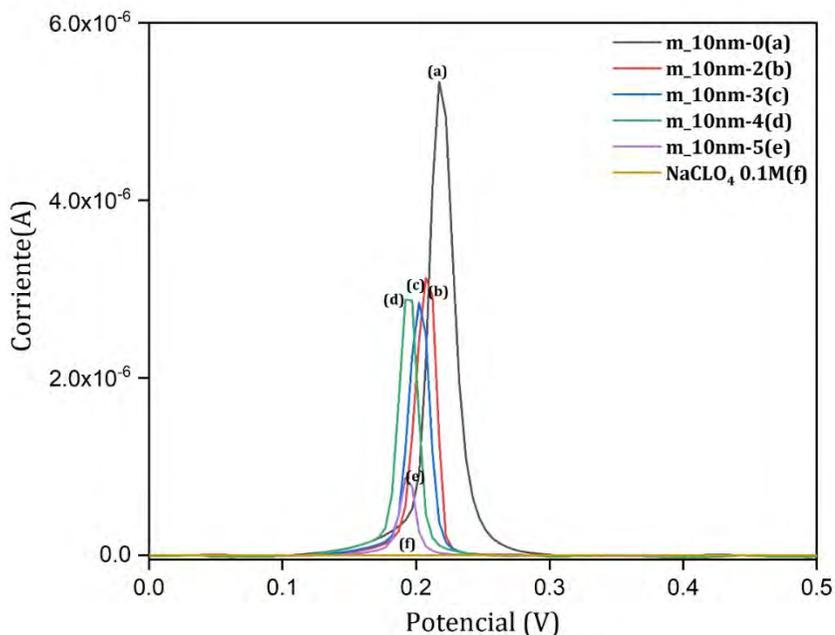


Figura 81. Voltagramas de disoluciones 0,05mM de AgNPs-10nm a con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 0,1mM(rojo); (c) 0,5mM(azul); (d) 1mM(verde); (e) 5mM(violeta); (f) NaClO<sub>4</sub> 0,1M(amarillo). Condiciones de medida como en la Figura 80

El patrón de las AgPs de 50nm de 0,05mM (**m\_50nm-0**) mostró un  $E_p=0,333V$  una energía mayor que la necesaria para la oxidación de la muestra **m\_10nm-0**. Esto se debe en parte a la diferencia entre los diámetros de las AgNPs, a mayor diámetro mayor  $E_p$ . En las muestras que contenían AZT se observó un desplazamiento de  $E_p$  hasta 0,240 en la muestra **m\_50nm-5** pasando por los valores de  $E_p$  de 0,280V (**m\_50nm-2-3**) y 0,252V (**m\_50nm-4**). El valor de  $E_p$  de la muestra **m\_50nm-1** (0,313V) no mostró una diferencia significativa con respecto a la **m\_50nm-0**. La  $I_p$  no mostró una tendencia clara con el aumento de la concentración de la AZT. La  $I_p$  sufrió un aumento en las muestras de la **m\_50nm-1** a la **m\_50nm-3** ( $5,02 \cdot 10^{-6}A$ ;  $3,68 \cdot 10^{-6}A$  y  $3,18 \cdot 10^{-6}A$  respectivamente) en comparación con la muestra **m\_50nm-0** ( $2,33 \cdot 10^{-6}A$ ), la cual no contiene AZT. En las

muestras **m\_50nm-4** y **m\_50nm-5** la  $I_p$  se vio disminuida con respecto a la **m\_50nm-0** hasta  $2,22 \cdot 10^{-6}$  A y  $8,42 \cdot 10^{-7}$  A, respectivamente.

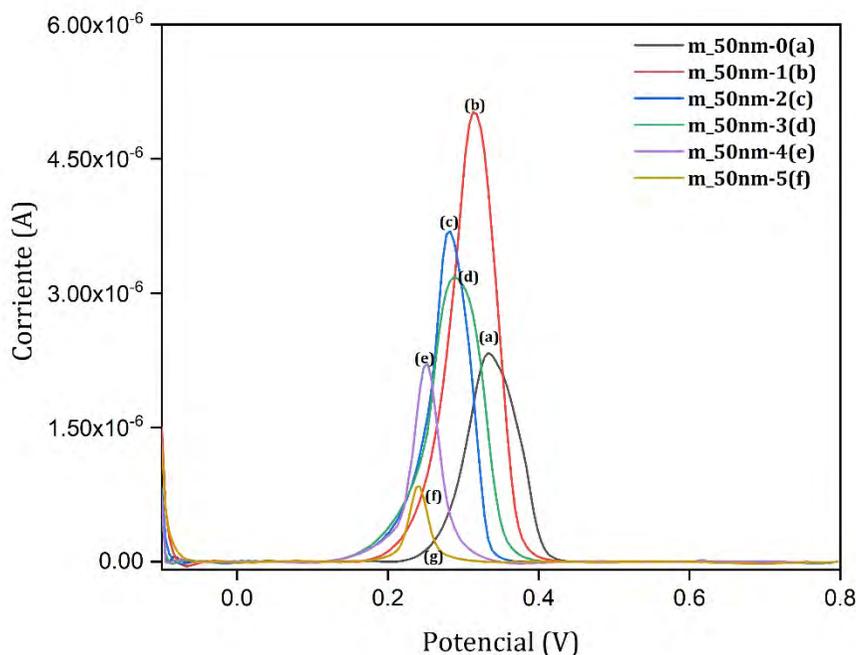


Figura 82. Voltagramas de las disoluciones mezcla de 0,05mM AgNPs-50nm con AMX en concentraciones: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 05mM(verde); (e) 1Mm(violeta); 5mM(violeta) y (f) NaClO<sub>4</sub> 0,1M(amarillo). Condiciones de medida como en la figura 81.

De los resultados obtenidos, no se puede generalizar el comportamiento con respecto a las variaciones de  $I_p$  de las dispersiones de AgNPs-10nm y de AgNPs de 50nm. Mientras que se observó una tendencia descendente de  $I_p$  en las muestras de la **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-5**, no se encontró una tendencia clara en las muestras de la **m\_50nm-0** a la **m\_50nm-5**. Tanto con las disoluciones de AgNPs de 10nm como 50nm en presencia del antibiótico se observó un desplazamiento del  $E_p$  hacia menores potenciales con el aumento de la concentración de AZT. Este comportamiento indica que la presencia de mayores concentraciones del ligando AZT en la disolución, y en exceso sobre las AgNPs, favorece la oxidación de las nanopartículas al producirse a menores potenciales anódicos.

### 3.9.6 Cálculo electroquímico de la contante de formación de los complejos AZT-AgNP por el método *Deford-Hume*.

Las  $I_p$  y  $E_p$  de las disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-4** y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4** se utilizaron para calcular las constantes de estabilidad de los complejos *AZT-AgNP-10nm* y *AZT-AgNP-50nm*.

El gráfico de  $F0(AgNP_{10nm})$  frente a  $[AZT]L$  se ajustó a una línea recta, cuya ecuación fué  $y = 2,8 \cdot 10^3 X + 1,8$  ( $R=0,9981$ ). Ver la Figura 83.

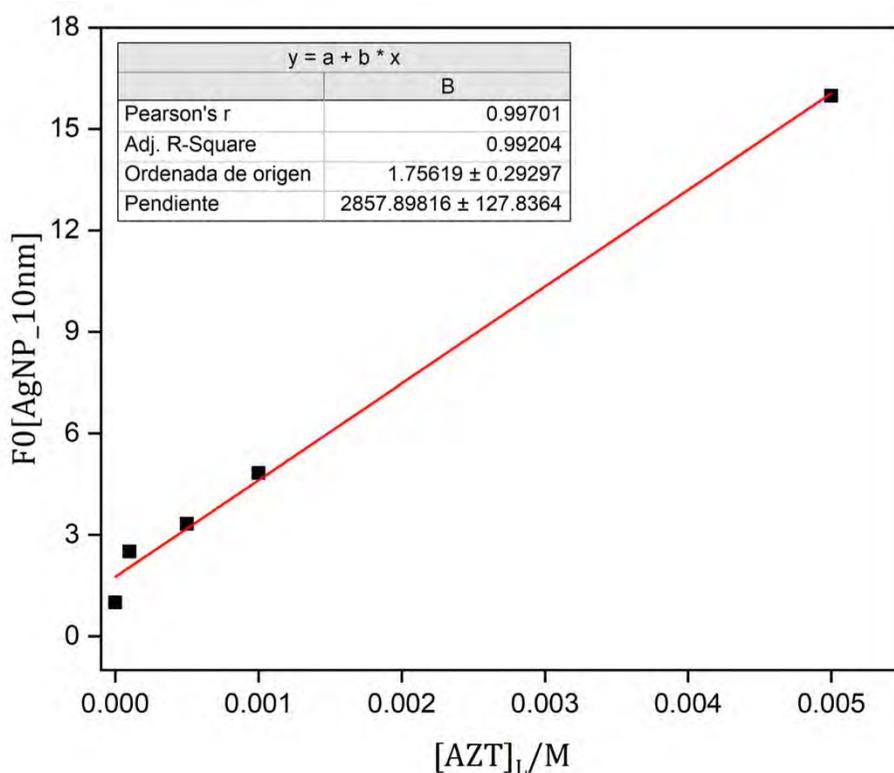


Figura 83. Representación gráfica (lineal) de la función  $F0(AgNP_{10nm})$  frente a la concentración de  $[AZT]L$ , calculada por el método *Deford-Hume*.

El gráfico  $F0(AgNP_{50nm})$  frente a  $[AZT]L$  también se ajustó a una línea recta, cuya ecuación  $y = 1,8 \cdot 10^4 X + 1,3$  tuvo un coeficiente de correlación  $R=0,9961$  (Figura 84). Las constantes de estabilidad de los complejos de ENRO-AgNP-10nm y ENRO-AgNP-50nm que

se calcularon a partir de los datos anteriores fueron:  $\log \beta_1=3,46\pm 0,01$  y  $\log \beta_1=4,25\pm 0,01$ , respectivamente.

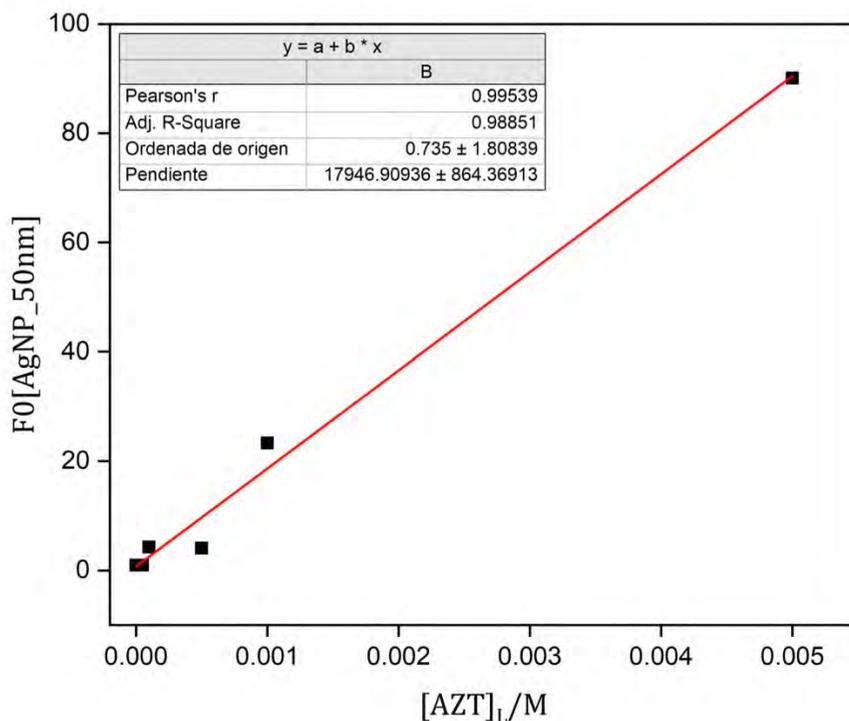


Figura 84. Representación gráfica (lineal) de la función de  $F0(AgNP_{50nm})$  frente a la concentración de  $[AZT]L$  (método *Deford-Hume*).

Este resultado concuerda con el obtenido en el estudio de las interacciones de las AgNPS con los antibióticos AMX y ENRO. Para los tres antibióticos estudiados, se cumple una relación lineal de la función  $F0(AgNP)$  frente a  $[AZT]L$ , que permite el cálculo de las correspondientes constantes de formación de los complejos (mayores en el caso de las nanopartículas de diámetros de 50nm que con respecto a las de 10nm ). Y como conclusión final, las constantes de las nanopartículas con estos antibióticos tienden a ser mayores que las calculadas para los complejos formados con los mismo ligandos con los iones  $Ag(I)$ .

### 3.10 Otras técnicas instrumentales para la caracterización de los complejos de azitromicina con nanopartículas de plata.

De la forma que se ha explicado anteriormente, además de las técnicas de electroanálisis, se utilizaron técnicas que proporcionan información analítica complementaria de la interacción que se produce entre el antibiótico AZT y las nanopartículas de plata y plata iónica Ag(I). En este apartado se muestran los resultados obtenidos con cromatografía hidrodinámica, con los mismos tipos de interacciones y disoluciones empleadas en las medidas voltamétricas y espectrofotométricas. Dadas las limitaciones encontradas para la aplicación del DLS, por los problemas de las matrices y las bajas concentraciones de las AgNPs que han de emplearse para estudios de complejamiento con los antibióticos, obteniéndose baja precisión en las medidas de los diámetros hidrodinámicos, no se empleó esta técnica con el antibiótico AZT.

#### 3.10.1 Caracterización por HDC de complejos de AZT con AgNPs.

Las disoluciones **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5** y **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4** se midieron con *HDC*, con las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado 3.2.4. Cada una de las muestras se midió por triplicado.

En la Figura 85 se observan los cromatogramas de las muestras **m\_10nm-0** a **m\_10nm-5**. Los picos de las AgNPs de 10nm en las muestras de **m\_10nm-0** a la **m\_10nm-4** en todos los casos tuvieron un  $t_r=8,11\pm 0,03$ min, mientras que en la muestra **m\_10nm-5** se desplazó hasta  $t_r=7,905\pm 0,00$ min. Este ligero desplazamiento a menores  $t_r$  indican un aumento de tamaño de la AgNP. Este resultado está de acuerdo con el encontrado en EAM-UV-Vis. La presencia de un solo pico en cada cromatograma descarta la formación de agregados de las AgNPs en presencia de la AZT.

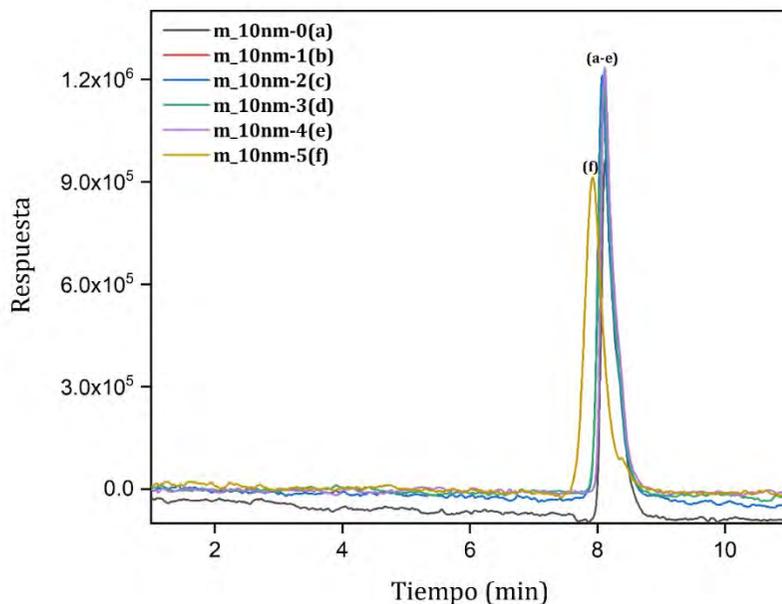


Figura 85. Cromatogramas HDC de las mezclas de AgNPs de 10nm a 0,05mM con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta). Las medidas se llevaron a cabo en una columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de 1,6mL min<sup>-1</sup>, después de inyectar 20µL de las muestras.

Los cromatogramas de las disoluciones **m\_50nm-0** a **m\_50nm-4** se muestran en la Figura 86. Las AgNPs-50nm en la muestra **m\_50nm-0** tuvieron un  $t_r=7,96\pm 0,00$ min. En las disoluciones **m\_50nm-1** a **m\_50nm-4** no se observó variación en los valores de  $t_r\sim 7,93\pm 0,01$ min. Este ligero desplazamiento a menores  $t_r$  no indica un aumento marcado en el tamaño de la AgNPs, pero sí descarta la formación de agregados de las nanopartículas de plata o de sus complejos, al observarse un solo pico.

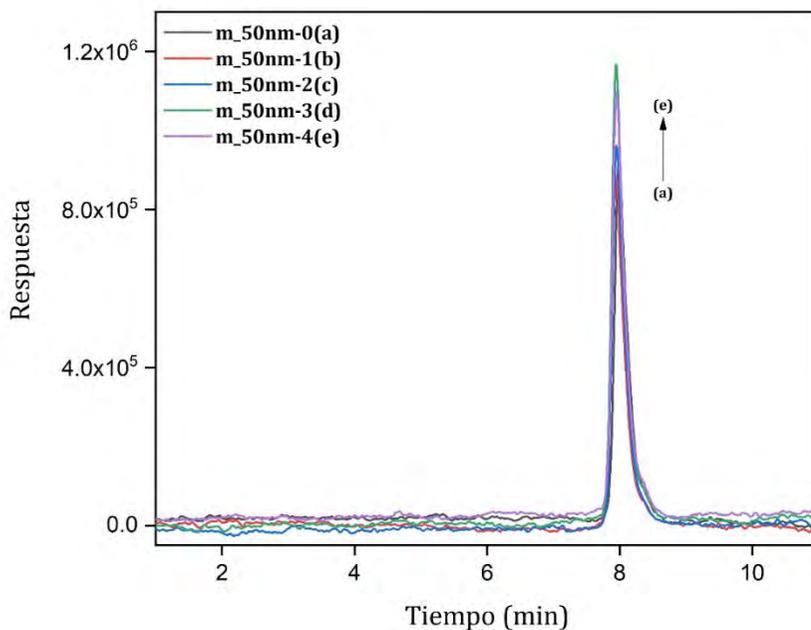


Figura 86. Cromatogramas HDC de las mezclas de AgNPs de 50nm a 0,05mM con AZT: (a) 0mM(negro); (b) 0,05mM(rojo); (c) 0,1mM(azul); (d) 0,5mM(verde); (e) 1mM(violeta). Columna PL-PSDA tipo 1, con un flujo de  $1,6\text{mL min}^{-1}$ , después de inyectar  $20\mu\text{L}$  de las muestras.

Nuevamente, la conclusión más importante de la HDC es que no se produce aglomeración ni agregación de las dispersiones de AgNPs solas o en presencia del antibiótico AZT. Lo que nos permite afirmar que los cambios en los espectros de absorción de los espectros EAM-UV-Vis se deben a cambios en los grupos cromóforos del antibiótico y no a cambios en el plasmón superficial de las AgNPs debidos a estas agregaciones o aglomeraciones. Al igual que no se producen en las medidas electroquímicas, que se han realizado en las mismas condiciones químicas y físicas.

## Conclusiones

- Se estudiaron por primera vez las interacciones entre los 3 antibióticos AMX, ENRO, AZT y las especies de plata con técnicas voltamétricas, empleando DV (Ag(I)-antibiótico), ASV (Ag(I)- antibiótico) y VIP (AgNPs- antibiótico).
- La determinación DPV de Ag(I) permitió calcular la especie disociada de las interacciones y complejos con los antibióticos, y de esta forma calcular sus constantes de formación midiendo desplazamientos de los potenciales de pico  $E_p$  que informan sobre su labilidad y energía necesaria para su disociación. Los valores calculados se resumen en la tabla 21.
- En general, los complejos de Ag(I) con los antibióticos tuvieron estequiometrias del orden 1:2, valores de  $\log \beta_1 \sim 1-6$  y  $\log \beta_2 \sim 7-9$ . Estos valores son similares y algo menores a los calculados de complejos de los mismos antibióticos con otros metales di- y trivalentes ( $\log \beta \sim 2-15$ ).
- Por primera vez se han calculado con datos electroquímicos las constantes de formación de los complejos tanto de Ag(I) como AgNPs con los 3 antibióticos AMX, ENRO, AZT. Se ha empleado el método de cálculo *Deford-Hume*, con datos de la variación de  $E_p$  en función de las relaciones estequiométricas metal:ligando.
- Para la aplicación del método *Deford-Hume*, las concentraciones de Ag(I) libres son muy pequeñas, por lo que se ha utilizado un método novedoso de determinación de estas especies no complejadas basado en voltametría de redisolución. La concentración libre se pre-concentró selectivamente ajustando de forma precisa el potencial de electrólisis en la primera etapa, evitando la reducción de las especies complejadas, que requerirían mayor energía potencial ( $E_e$ ).
- Los valores que se calcularon de estas constantes ( $\log \beta$ ) fueron pequeñas: AMX-AgNP  $3.96 \pm 0,36$ ; ENRO-AgNP  $3,17 \pm 0,95$ ; AZT-AgNP  $3,8 \pm 0,6$ . Valores medios para nanopartículas de plata de media de las constantes de 50nm y 10nm de diámetro. El método sólo requirió dilución de las muestras y la modificación del electrodo, siendo así un método relativamente sencillo y rápido.

- Para una caracterización completa de la naturaleza de los complejos formados (o del tipo de interacciones que se producen) entre Ag(I) / AgNPs y los tres antibióticos, y su interpretación, los datos voltamétricos se complementaron con la información proporcionada por otras técnicas instrumentales de análisis.
- La caracterización mediante EAM-UV-Vis tuvo como finalidad buscar cambios en las bandas de absorción de los antibióticos al reaccionar con Ag(I), o cambios en las bandas de plasmón superficial de las AgNPs cuando se dejaron reaccionar con los antibióticos, que indican si ha habido interacciones mutuas. Cambios de absorbancia de grupos cromóforos complejantes nos confirmaron su intervención en la interacción con especies de plata, formando los complejos indicados en cada caso.
- Mediante EAM-UV-Vis se calcularon las siguientes estequiometrias de la interacción de las nanopartículas de plata (10 y 50nm) con los antibióticos: AgNPs-AMX  $1,06 \times 10^5$  moléculas de AMX  $\text{nm}^{-2}$ ,  $4,13 \times 10^8$  moléculas de ENRO  $\text{nm}^{-2}$  y  $2,2 \times 10^4$  moléculas de AZT  $\text{nm}^{-2}$ . La interacción encontrada implica la unión de los antibióticos sobre la superficie de las AgNPs. Lógicamente, mayores diámetros dieron lugar a la unión de un número mayor de moléculas de antibiótico, por su mayor superficie.
- En los espectros EAM-UV-Vis se observaron desplazamientos en las bandas de absorción de los antibióticos al reaccionar con iones Ag(I), que confirmaron que los grupos cromóforos correspondientes a esas bandas intervenían en la formación de complejos con Ag(I).
- De forma similar, se observaron desplazamientos batocrómicos en EAM-UV-Vis en las bandas de plasmón superficial de las AgNPs (recubiertas de citrato) en su interacción con los 3 antibióticos, debido a un aumento de su tamaño al unirse a los antibióticos. Sin embargo, las AgNPs recubiertas con PVP se desplazaron hipsocrómicamente, en este caso por disminución de su tamaño. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en VIP (mayores valores de  $E_p$  al complejarse las AgNPs protegidas con citrato).

- Las medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) se emplearon con la finalidad de comprobar las variaciones de los diámetros hidrodinámicos de las AgNPs al reaccionar con los antibióticos. Sin embargo, no se encontraron variaciones significativas, dado que las medidas DLS no tuvieron resolución suficiente para detectar los cambios pequeños de diámetros debidos al complejamiento de las AgNPs con los antibióticos.
- Las medidas DLS sí que confirmaron que no se produjeron oxidaciones ni aglomeraciones de las AgNPs durante su reacción con los antibióticos.
- Las medidas de cromatografía hidrodinámica tuvieron también el objetivo de detectar cambios de tamaño de las AgNPs en su complejamiento con los antibióticos. Sin embargo, al igual que con DLS, no se observaron cambios en los tiempos de elución de las AgNPs después de reaccionar con los antibióticos.
- Indicando también que no hubo variaciones en los tiempos de elución debidos a aglomeraciones de las AgNPs en las condiciones experimentales de las medidas. Por lo que la HDC no tuvo la resolución suficiente para detectar el recubrimiento de las AgNPs con moléculas de antibiótico de, relativamente, bajo peso molecular.

Tabla 23. Constantes de estabilidad y estequiometrias de los complejos de AMX, ENRO, AZT con Ag(I) y AgNPs.

Métodos electroquímicos				EAM-UV-Vis	
Antibióticos	DV [Ag(I)X] Método variación de $E_p$	ASV [Ag(I)X] Método de <i>Deford- Hume</i>	VIP [AgNPX] Método de <i>Deford-Hume</i>	AgNP10nm Método de <i>Deford-Hume</i>	AgNP50nm Método de <i>Deford-Hume</i>
<b>AMX</b>	$\log \beta_1=2,0\pm 1,0$	$\log \beta_1=6,23\pm 0,04$	$\log \beta_1=3,70\pm 0,03$ (AgNP10nm)	$3,34\cdot 10^7$	$8,3\cdot 10^8$
	$\log \beta_2=9,5\pm 0,5$ RM=1:2	$\log \beta_2=9,32\pm 0,04$ RM=1:2	$\log \beta_1=4,21\pm 0,05$ (AgNP50nm) RM=1:1	Moléculas de AZT por AgNP10nm.	Moléculas de AZT por AgNP50nm.
<b>ENRO</b>	$\log \beta_1=1,5\pm 0,3$	$\log \beta_1=3,90\pm 0,01$	$\log \beta_1=2,5\pm 0,1$ (AgNP10nm)	Banda SPR solapada por bandas de la ENRO	$4,13\cdot 10^8$
	$\log \beta_2=8,0\pm 0,5$ RM=1:2	$\log \beta_2=7,09\pm 0,01$ RM=1:2	$\log \beta_1=3,84\pm 0,02$ (AgNP50nm) RM=1:1		Moléculas de AZT por AgNP50nm.

Parte III

<b>AZT</b>	$\log \beta_1=0,7\pm 0,2$ RM=1:1	No encontrado	$\log \beta_1=3,46\pm 0,01$ (AgNP10nm)	$7 \cdot 10^6$ Moléculas de AZT por AgNP10nm.	$3 \cdot 10^8$ Moléculas de AZT por AgNP50nm.
			$\log \beta_1=4,25\pm 0,01$ (AgNP50nm)		
			RM=1:1		

## Parte. IV

---

#### IV. Conclusiones finales.

La determinación de **plata iónica** ( $\text{Ag}^+$ ) en presencia de **nanopartículas de plata** (AgNPs), y viceversa, generalmente presenta problemas de interferencias. Las técnicas de electroanálisis abren la puerta a su determinación selectiva.

Hemos desarrollado nuevos procedimientos electroquímicos para la detección y cuantificación de iones  $\text{Ag(I)}$  (Parte I) y procedimientos voltamétricos para la detección,, caracterización de tamaño, y cuantificación de nanopartículas de plata (Parte II).

El objetivo final de este trabajo es el de aplicar los procedimientos electroquímicos anteriores al estudio de las **interacciones** y complejos que se producen entre las distintas especies de plata ( $\text{Ag}^+$ , AgNPs) con **3 antibióticos** (AMX, ENRO, AZT) de importancia en el medio ambiente como contaminantes emergentes. Estos antibióticos se escogieron por su presencia generalizada en aguas de 40 puntos de muestreo en ríos de cuencas fluviales de territorio POCTEFA (España-Francia), como consecuencia del Proyecto OUTBIOTICS (EFA-183-16) 2018-2021 en el que trabajamos.

Al final de cada una de estas tres partes, se han resumido en esta memoria las conclusiones más importantes del trabajo de investigación llevado a cabo.

Los procedimientos electroquímicos descritos se han validado y se han aplicado en muestras comerciales de plata coloidal (AgNPs de tamaño relativamente uniforme con un contenido variable de iones  $\text{Ag(I)}$ ), y se han comparado con las distribuciones de tamaño medidas por microscopía electrónica (FESEM / TEM), no encontrándose diferencias significativas (test t, 95% nivel de confianza).

Se ha abordado por primera vez la metodología **AGNES** sobre electrodo de mercurio aplicada la determinación de  $\text{Ag(I)}$ , con la dificultad que conlleva la oxidación selectiva de mercurio y plata a potenciales que difieren en muy pocos milivoltios. Dado que no fue posible esta separación, se ha propuesto una modificación denominada AGNES-Diferencial, a la vez que se han estudiado otras respuestas (electrodos sólidos, modificación de la etapa de redisolución por pasos de potencial).

De forma similar al *AGNES*, se ha desarrollado un nuevo método que hemos denominado *ISPIE* (*In-Situ prepared Indicator electrode*) con los mismos objetivos. Al igual que en el caso anterior, se han establecido las bases teóricas y pruebas de concepto.

Para la caracterización, detección y cuantificación de las nanopartículas de plata (Parte II), de forma principal se han estudiado dos técnicas, basadas en mecanismos químico-físicos distintos:

- (1) la voltametría de partículas inmovilizadas (**VIP**) y
- (2) la cronoculombimetría de impacto de partículas (**PCC**).

En la primera de las técnicas (VIP), los resultados poco reproducibles se mejoraron con la inmovilización de una película de nafión que retiene fuertemente las AgNPs sobre los electrodos de carbón vítreo. De esta forma, la redisolución anódica se mide sin pérdidas de las nanopartículas hacia la disolución, mejorando notablemente la sensibilidad y reproducibilidad en la cuantificación de las AgNPs.

En la segunda (PCC) se optimizaron las condiciones experimentales y los procedimientos de tratamiento de datos que permitieron obtener distribuciones de tamaño veraces y comparables a las de técnicas muy dedicadas, como microscopía electrónica y detección de partículas individuales con plasma acoplado inductivamente a espectrometría de masas. No se encontraron diferencias significativas (test t, 95% nivel de confianza) entre las distribuciones de tamaños obtenida por microscopía electrónica (FESEM / TEM) y el método PCC optimizado. Apenas se han empleado las técnicas electroquímicas de impacto con una finalidad analítica en muestras reales (distribuciones de tamaño), mucho menos para la cuantificación del número de concentración de AgNPs L<sup>-1</sup>.

Se observó (PCC) una relación lineal entre el número de colisiones y el número de nanopartículas de plata hasta  $5 \times 10^7$  AgNPs L<sup>-1</sup>. Esto significa (en función de su diámetro) concentraciones de plata metálica del orden de muy pocos ng L<sup>-1</sup>, lo que exige una gran dilución, que asegura el comportamiento individual de los impactos detectados y la ausencia de adsorción sobre el electrodo.

En la parte III se calcularon electroquímicamente, por primera, vez las **constantes de estabilidad** entre los antibióticos AMX, ENRO, AZT y las especies de plata Ag(I) y AgNPs. Empleando las técnicas voltamétricas: **DPV** (Ag(I)- antibiótico), **ASV** (Ag(I)- antibiótico) y **VIP** (AgNPs- antibiótico). Se calcularon empleando medidas de desplazamientos de potencial en función de la labilidad y fuerza de los complejos, por el procedimiento *Deford-Hume* que se basa en la determinación de la estequiometría y las constantes de estabilidad por la variación del potencial de pico y la corriente faradaica al formarse los complejos de plata.

La plata iónica formó complejos estables con amoxicilina y enrofloxacina ( $\log \beta_2=9.32\pm 0,04$  y  $7.09\pm 0,01$ , respectivamente), mientras que no se encontró complejo estable con azitromicina. En contraste, las AgNPs interaccionan con la amoxicilina, enrofloxacina y azitromicina. Los valores de las constantes calculados por el método *Deford - Hume* son muy cercanos para los tres antibióticos, lo que indica que no hay interacción específica entre la superficie de las AgNPs y los antibióticos. Para AgNPs de diámetro 10nm, los valores de las constantes de formación de los correspondientes complejos se encontraron entre  $2.5\pm 0.1$  y  $3.46\pm 0.1$ , mientras que en los AgNPs de 50nm los valores de estas constantes estaban entre  $3.7\pm 0.3$  y  $4.25\pm 0.01$ , respectivamente.

## Parte. V

---

## V. Bibliografía

1. Marambio-Jones C, Hoek EMV (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanoparticle Res* 12:1531–1551 . <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
2. Carasek E, Bianchin JN, Martendal E (2011) Determination of trace silver in water samples by online column preconcentration flame atomic absorption spectrometry using termite digestion product. *J Autom Methods Manag Chem* 2011: . <https://doi.org/10.1155/2011/839365>
3. Mizera J, Řanda Z, Kučera J (2008) Determination of silver in biological reference materials by neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem* 278:599–602 . <https://doi.org/10.1007/s10967-008-1101-0>
4. Laborda F, Bolea E, Cepriá G, Gómez MT, Jiménez MS, Pérez-Arantegui J, Castillo JR (2016) Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal Chim Acta* 904:10–32 . <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.008>
5. Mattarozzi M, Suman M, Cascio C, Calestani D, Weigel S, Undas A, Peters R (2017) Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages. *Anal Bioanal Chem* 409:63–80 . <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9946-5>
6. Chao JB, Liu JF, Yu SJ, Feng Y Di, Tan ZQ, Liu R, Yin YG (2011) Speciation analysis of silver nanoparticles and silver ions in antibacterial products and environmental waters via cloud point extraction-based separation. *Anal Chem* 83:6875–6882 . <https://doi.org/10.1021/ac201086a>
7. Ghaedi M, Shokrollahi A, Niknam K, Niknam E, Najibi A, Soylak M (2009) Cloud point extraction and flame atomic absorption spectrometric determination of cadmium(II), lead(II), palladium(II) and silver(I) in environmental samples. *J Hazard Mater* 168:1022–1027 . <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.130>

8. Francisco L, Juan C (2019) Detection and Determination of Released Ions in the Presence of Nanoparticles: Selectivity or Strategy? 1–7 . <https://doi.org/10.1002/elan.201800597>
9. Cepriá G, Pardo J, Lopez A, Peña E, Castillo JR (2016) Selectivity of silver nanoparticle sensors: Discrimination between silver nanoparticles and Ag<sup>+</sup>. *Sensors Actuators, B Chem* 230:25–30 . <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.049>
10. Cepriá G, Córdova WR, Jiménez-Lamana J, Laborda F, Castillo JR (2014) Silver nanoparticle detection and characterization in silver colloidal products using screen printed electrodes. *Anal Methods* 6:3072–3078 . <https://doi.org/10.1039/c4ay00080c>
11. Schildkraut DE, Dao PT, Twist JP, Davis AT, Robillard KA (1998) Determination of silver ions at submicrogram-per-liter levels using anodic square-wave stripping voltammetry. *Environ Toxicol Chem* 17:642–649 . [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1998\)017<0642:DOSIAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<0642:DOSIAS>2.3.CO;2)
12. David CA, Galceran J, Rey-Castro C, Puy J, Companys E, Salvador J, Monné J, Wallace R, Vakourov A (2012) Dissolution kinetics and solubility of ZnO nanoparticles followed by AGNES. *J Phys Chem C* 116:11758–11767 . <https://doi.org/10.1021/jp301671b>
13. Companys E, Galceran J, Pinheiro JP, Puy J, Salaün P (2017) A review on electrochemical methods for trace metal speciation in environmental media. *Curr Opin Electrochem* 3:144–162 . <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.007>
14. Galceran J, Companys E, Puy J, Cecilia J, Garces JL (2004) AGNES: A new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. *J Electroanal Chem* 566:95–109 . <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.11.017>
15. Vytřas K, Švancara I, Metelka R (2009) Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *J Serbian Chem Soc* 74:1021–1033 . <https://doi.org/10.2298/JSC0910021V>

16. Maldonado VY, Espinoza-Montero PJ, Rusinek CA, Swain GM (2018) Analysis of Ag(I) Biocide in Water Samples Using Anodic Stripping Voltammetry with a Boron-Doped Diamond Disk Electrode. *Anal Chem* 90:6477–6485 . <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04983>
17. Baker WS, Crooks RM (1998) Independent geometrical and electrochemical characterization of arrays of nanometer-scale electrodes. *J Phys Chem B* 102:10041–10046 . <https://doi.org/10.1021/jp982983g>
18. Mota AM, Pinheiro JP, Simões Gonçalves ML (2012) Electrochemical methods for speciation of trace elements in marine waters. Dynamic aspects. *J Phys Chem A* 116:6433–6442 . <https://doi.org/10.1021/jp2124636>
19. Brasiliense V, Patel AN, Martinez-Marrades A, Shi J, Chen Y, Combellas C, Tessier G, Kanoufi F (2016) Correlated Electrochemical and Optical Detection Reveals the Chemical Reactivity of Individual Silver Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 138:3478–3483 . <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13217>
20. Davies TJ (2016) Anodic stripping voltammetry with graphite felt electrodes for the trace analysis of silver. *Analyst* 141:4742–4748 . <https://doi.org/10.1039/c6an00590j>
21. El-Mai H, Espada-Bellido E, Stitou M, García-Vargas M, Galindo-Riaño MD (2016) Determination of ultra-trace amounts of silver in water by differential pulse anodic stripping voltammetry using a new modified carbon paste electrode. *Talanta* 151:14–22 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.008>
22. AR-M256\_20181210\_153500\_ libro.pdf
23. Liu QY, Liu BD, Yuan F, Zhuang H, Wang C, Shi D, Xu YK, Jiang X (2015) Anodic stripping voltammetry of silver(I) using unmodified GaN film and nanostructure electrodes. *Appl Surf Sci* 356:1058–1063 . <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.08.167>
24. Picheansoonthon C, Engle JD, Doskotch RW (1990) Conformational studies of 11(S)-dihydrospeciformin

25. Linsinger TPJ, Chaudhry Q, Dehalu V, Delahaut P, Dudkiewicz A, Grombe R, Von Der Kammer F, Larsen EH, Legros S, Loeschner K, Peters R, Ramsch R, Roebben G, Tiede K, Weigel S (2013) Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food. *Food Chem* 138:1959–1966 .  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.074>
26. Lowe TA, Hedberg J, Lundin M, Wold S, Wallinder IO (2013) Chemical speciation measurements of silver ions in alkaline carbonate electrolytes using differential pulse stripping voltammetry on glassy carbon compared with ion selective electrode measurements. *Int J Electrochem Sci* 8:3851–3865
27. Little TA (2016) Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods. *BioPharm Int* 2–6
28. Cder FDA (2018) Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry  
Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry
29. Shrivastava A, Gupta V (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci* 2:21 .  
<https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
30. Shah A, Khan SUD, Rana UA (2015) Determination of silver in rocks and ores samples using modified voltammetric technique. *J Chem Soc Pakistan* 37:919–929
31. Zhou XX, Lai YJ, Liu R, Li SS, Xu JW, Liu JF (2017) Polyvinylidene Fluoride Micropore Membranes as Solid-Phase Extraction Disk for Preconcentration of Nanoparticulate Silver in Environmental Waters. *Environ Sci Technol* 51:13816–13824 .  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04055>
32. TEMPLETON DM, ARIESE F, CORNELIS R, DANIELSSON L-G, MUNTAU H, LEEUWEN HP VAN, ŁOBIŃSKI AR (2000) Clinical Chemistry Section , Commission on Toxicology Guidelines for Terms Related To Chemical Speciation and Fractionation of Elements . Definitions , Structural Aspects , and Methodological Approaches. *Pure Appl Chem*, 72:1453–1470

33. Filella M (2013) Food for thought: A critical overview of current practical and conceptual challenges in trace element analysis in natural waters. *Water (Switzerland)* 5:1152–1171 . <https://doi.org/10.3390/w5031152>
34. XHANARI K, RAMOT A, PETOVAR B, FINŠGAR M (2018) In-situ Modified Antimony-Film Glassy Carbon Electrode for Metal Trace Analysis. 483–488 . <https://doi.org/10.24264/icams-2018.ix.1>
35. Ramalakshmi N, Muthukumar S, Marichamy B (2013) Preparation and Characterization of 4-hydroxybenzylidencarbamide-CTAB modified Glassy Carbon Electrode by using [Fe (CN) 6] 4-/[Fe (CN) 6] 3-redox system. *Ijcps* 2:16–24
36. D’Eramo F, Arévalo AH, Silber JJ, Sereno L (1997) Incorporation and voltammetric determination of silver (I) at an electrode electrochemically modified with a poly-benzidine film. *J Braz Chem Soc* 8:181–185 . <https://doi.org/10.1590/S0103-50531997000200017>
37. Švancara I, Kalcher K, Diewald W, Vytřas K (1996) Voltammetric Determination of Silver at Ultratrace Levels Using a Carbon Paste Electrode with Improved Surface Characteristics. *Electroanalysis* 8:336–342 . <https://doi.org/10.1002/elan.1140080407>
38. Javanbakht M, Divsar F, Badiei A, Fatollahi F, Khaniani Y, Ganjali MR, Norouzi P, Chaloosi M, Ziarani GM (2009) Determination of picomolar silver concentrations by differential pulse anodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode modified with phenylthiourea-functionalized high ordered nanoporous silica gel. *Electrochim Acta* 54:5381–5386 . <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.04.044>
39. Sulka GD, Jaskula M (2007) Determination of silver traces in pure metallic copper and zinc by a catalytic photometric method. *Croat Chem Acta* 80:147–150
40. Sisson N, Gründer Y, Lucas CA (2016) Structure and Stability of Underpotentially Deposited Ag on Au(111) in Alkaline Electrolyte. *J Phys Chem C* 120:16100–16109 . <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b12773>
41. Lord SS, Rogers LB (1954) Polarographic Studies with Gold, Graphite, and Platinum

- Electrodes. *Anal Chem* 26:284–295 . <https://doi.org/10.1021/ac60086a009>
42. Daubinger P, Kieninger J, Unmüssig T, Urban GA (2014) Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes-A cyclic voltammetry study. *Phys Chem Chem Phys* 16:8392–8399 . <https://doi.org/10.1039/c4cp00342j>
  43. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL (2018) A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ* 95:197–206 . <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
  44. Tehrani MH, Companys E, Dago A, Puy J, Galceran J (2018) Free indium concentration determined with AGNES. *Sci Total Environ* 612:269–275 . <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.200>
  45. Van Leeuwen HP, Town RM (2003) Electrochemical metal speciation analysis of chemically heterogeneous samples: The outstanding features of stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential. *Environ Sci Technol* 37:3945–3952 . <https://doi.org/10.1021/es030033p>
  46. Zavarise F, Companys E, Galceran J, Alberti G, Profumo A (2010) Application of the new electroanalytical technique AGNES for the determination of free Zn concentration in river water. *Anal Bioanal Chem* 397:389–394 . <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3439-8>
  47. Monteiro ASC, Parat C, Rosa AH, Pinheiro JP (2016) Towards field trace metal speciation using electroanalytical techniques and tangential ultrafiltration. *Talanta* 152:112–118 . <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.053>
  48. Rocha LS, Galceran J, Puy J, Pinheiro JP (2015) Determination of the Free Metal Ion Concentration Using AGNES Implemented with Environmentally Friendly Bismuth Film Electrodes. *Anal Chem* 87:6071–6078 . <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00606>
  49. Aguilar D, Parat C, Galceran J, Companys E, Puy J, Authier L, Potin-Gautier M (2013)

- Determination of free metal ion concentrations with AGNES in low ionic strength media. *J Electroanal Chem* 689:276–283 .  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.010>
50. Meena O, Garg A, Kumar Y, Pandey R (2011) Electro analytical procedure for determination of heavy metals in brassica oleraceae ver. Botrytis. *Int J ChemTech Res* 3:1596–1603
  51. Mu Q, David CA, Galceran J, Rey-Castro C, Krzemiński Ł, Wallace R, Bamiduro F, Milne SJ, Hondow NS, Brydson R, Vizcay-Barrena G, Routledge MN, Jeuken LJC, Brown AP (2014) Systematic investigation of the physicochemical factors that contribute to the toxicity of ZnO nanoparticles. *Chem Res Toxicol* 27:558–567 .  
<https://doi.org/10.1021/tx4004243>
  52. Kuehr S, Meisterjahn B, Schröder N, Knopf B, Völker D, Schwirn K, Schlechtriem C (2020) Testing the bioaccumulation of manufactured nanomaterials in the freshwater bivalve: *Corbicula fluminea* using a new test method. *Environ Sci Nano* 7:535–553 . <https://doi.org/10.1039/c9en01112a>
  53. Vale G, Franco C, Brunnert AM, dos Santos MMC (2015) Adsorption of Cadmium on Titanium Dioxide Nanoparticles in Freshwater Conditions - A Chemodynamic Study. *Electroanalysis* 27:2439–2447 . <https://doi.org/10.1002/elan.201500153>
  54. Parat C, Authier L, Aguilar D, Companys E, Puy J, Galceran J, Potin-Gautier M (2011) Direct determination of free metal concentration by implementing stripping chronopotentiometry as the second stage of AGNES. *Analyst* 136:4337–4343 .  
<https://doi.org/10.1039/c1an15481h>
  55. Aguilar D, Parat C, Galceran J, Companys E, Puy J, Authier L, Potin-Gautier M (2013) Determination of free metal ion concentrations with AGNES in low ionic strength media. *J Electroanal Chem* 689:276–283 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.010>
  56. Companys E, Cecília J, Codina G, Puy J, Galceran J (2005) Determination of Zn<sup>2+</sup> concentration with AGNES using different strategies to reduce the deposition time.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2004.09.028>

57. Parat C, Aguilar D, Authier L, Potin-Gautier M, Companys E, Puy J, Galceran J (2011) Determination of Free Metal Ion Concentrations Using Screen-Printed Electrodes and AGNES with the Charge as Response Function. *Electroanalysis* 23:619–627 .  
<https://doi.org/10.1002/elan.201000566>
58. Rocha LS, Companys E, Galceran J, Carapuça HM, Pinheiro JP (2010) Evaluation of thin mercury film rotating disk electrode to perform absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping (AGNES) measurements. *Talanta* 80:1881–1887 .  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.038>
59. Companys E, Galceran J, Pinheiro JP, Puy J, Salaün P (2017) A review on electrochemical methods for trace metal speciation in environmental media. *Curr Opin Electrochem* 3:144–162 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.09.007>
60. Pearson HBC, Galceran J, Companys E, Braungardt C, Worsfold P, Puy J, Comber S (2016) Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping (AGNES) for the determination of [Zn<sup>2+</sup>] in estuarine waters. *Anal Chim Acta* 912:32–40 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.035>
61. Pla-Vilanova P, Galceran J, Puy J, Companys E, Filella M (2019) Antimony speciation in aqueous solution followed with AGNES. *J Electroanal Chem* 849:113334 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113334>
62. Tehrani MH, Companys E, Dago A, Puy J, Galceran J (2018) Free indium concentration determined with AGNES. *Sci Total Environ* 612:269–275 .  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.200>
63. Bakker E, Pretsch E (2002) The new wave of ion-selective electrodes. *Anal Chem* 74:
64. Giancarla AA, Raffaella B, Pesavento M (2008) Determination of the Total

- Concentration and Speciation of Metal Ions in River, Estuarine and Seawater Samples. *Anal Sci* 24:1605–1611 . <https://doi.org/10.2116/analsci.24.1605>
65. Zhang J, Sun X, Wu J (2019) Heavy metal ion detection platforms based on a glutathione probe: A mini review. *Appl Sci* 9: . <https://doi.org/10.3390/app9030489>
  66. Bhatt I, Tripathi BN (2011) Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* 82:308–317 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.011>
  67. Jyoti K, Baunthiyal M, Singh A (2016) Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics . *J Radiat Res Appl Sci* 9:217–227 . <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.002>
  68. Pal B, Rana S, Kaur R (2015) Influence of different reducing agents on the Ag nanostructures and their electrokinetic and catalytic properties. *J Nanosci Nanotechnol* 15:2753–2760 . <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9222>
  69. Gurunathan S, Jeong JK, Han JW, Zhang XF, Park JH, Kim JH (2015) Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale Res Lett* 10:1–17 . <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0747-0>
  70. Zhou X, Liu J, Yuan C, Chen Y (2016) Speciation analysis of silver sulfide nanoparticles in environmental waters by magnetic solid-phase extraction coupled with ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 31:2285–2292 . <https://doi.org/10.1039/C6JA00243A>
  71. António DC, Cascio C, Gilliland D, Nogueira AJA, Rossi F, Calzolari L (2016) Characterization of silver nanoparticles-alginate complexes by combined size separation and size measurement techniques. *Biointerphases* 11:04B309 . <https://doi.org/10.1116/1.4972112>
  72. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J (2014) Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem* 86:2270–2278 . <https://doi.org/10.1021/ac402980q>

73. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J (2016) Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends Environ Anal Chem* 9:15–23 . <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.02.001>
74. Vidal JC, Torrero D, Menés S, de La Fuente A, Castillo JR (2020) Voltammetric sensing of silver nanoparticles on electrodes modified with selective ligands by using covalent and electropolymerization procedures. Discrimination between silver(I) and metallic silver. *Microchim Acta* 187:183 . <https://doi.org/10.1007/s00604-020-4139-5>
75. Tschulik K, Batchelor-McAuley C, Toh H-S, Stuart EJE, Compton RG (2014) Electrochemical studies of silver nanoparticles: a guide for experimentalists and a perspective. *Phys Chem Chem Phys* 16:616–623 . <https://doi.org/10.1039/C3CP54221A>
76. Guo SX, Khoo SB (1999) Highly selective and sensitive determination of silver(I) at a poly(8-mercaptoquinoline) film modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 11:891–898 . [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199908\)11:12<891::AID-ELAN891>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199908)11:12<891::AID-ELAN891>3.0.CO;2-9)
77. Cloake SJ, Toh HS, Lee PT, Salter C, Johnston C, Compton RG (2015) Anodic stripping voltammetry of silver nanoparticles: Aggregation leads to incomplete stripping. *ChemistryOpen* 4:22–26 . <https://doi.org/10.1002/open.201402050>
78. Nasir MZM, Pumera M (2016) Impact electrochemistry on screen-printed electrodes for the detection of monodispersed silver nanoparticles of sizes 10–107 nm. *Phys Chem Chem Phys* 18:28183–28188 . <https://doi.org/10.1039/C6CP05463C>
79. Xiao X, Fan F-R, Zhou J, Bard A (2008) Current Transients in Single Nanoparticle Collision Events. *J Am Chem Soc* 130:16669–16677 . <https://doi.org/10.1021/ja8051393>
80. Ngamchuea K, Clark ROD, Sokolov S V., Young NP, Batchelor-McAuley C, Compton

- RG (2017) Single Oxidative Collision Events of Silver Nanoparticles: Understanding the Rate-Determining Chemistry. *Chem - A Eur J* 23:16085–16096 . <https://doi.org/10.1002/chem.201703591>
81. Zhou YG, Rees N V., Compton RG (2011) The electrochemical detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution. *Angew Chemie - Int Ed* 50:4219–4221 . <https://doi.org/10.1002/anie.201100885>
82. Stuart EJE, Zhou YG, Rees N V., Compton RG (2012) Determining unknown concentrations of nanoparticles: The particle-impact electrochemistry of nickel and silver. *RSC Adv* 2:6879–6884 . <https://doi.org/10.1039/c2ra20628e>
83. Ivanova OS, Zamborini FP (2010) Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *J Am Chem Soc* 132:70–72 . <https://doi.org/10.1021/ja908780g>
84. Tschulik K, Palgrave RG, Batchelor-Mcauley C, Compton RG (2013) “Sticky electrodes” for the detection of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 24: . <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/29/295502>
85. Ward Jones SE, Campbell FW, Baron R, Xiao L, Compton RG (2008) Particle Size and Surface Coverage Effects in the Stripping Voltammetry of Silver Nanoparticles: Theory and Experiment. *J Phys Chem C* 112:17820–17827 . <https://doi.org/10.1021/jp807093q>
86. Toh HS, Jurkschat K, Compton RG (2015) The influence of the capping agent on the oxidation of silver nanoparticles: Nano-impacts versus stripping voltammetry. *Chem - A Eur J* 21:2998–3004 . <https://doi.org/10.1002/chem.201406278>
87. Stuart EJE, Tschulik K, Omanović D, Cullen JT, Jurkschat K, Crossley A, Compton RG (2013) Electrochemical detection of commercial silver nanoparticles: Identification, sizing and detection in environmental media. *Nanotechnology* 24: . <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/44/444002>
88. Barker D, Walsh FC (1991) Applications of Faraday’s Laws of Electrolysis in metal finishing. *Trans Inst Met Finish* 69:158–162 . <https://doi.org/10.1080/00202967.1991.11870915>

89. Brainina KZ, Galperin LG, Kiryuhina TY, Galperin AL, Stozhko NY, Murzakaev AM, Timoshenkova OR (2012) Silver nanoparticles electrooxidation: Theory and experiment. *J Solid State Electrochem* 16:2365–2372 . <https://doi.org/10.1007/s10008-011-1583-5>
90. Vidal JC, Viñao RB, Castillo JR (1992) Binding capacity of casein to lead and voltammetric speciation of lead in milk with a nafion coated electrode. *Electroanalysis* 4:653–659 . <https://doi.org/doi:10.1002/elan.1140040609>
91. Ghilane J, Fan FRF, Bard AJ, Dunwoody N (2007) Facile electrochemical characterization of core/shell nanoparticles. Ag core/Ag<sub>2</sub>O shell structures. *Nano Lett* 7:1406–1412 . <https://doi.org/10.1021/nl070268p>
92. Wang L, Kang J, Nam J Do, Suhr J, Prasad AK, Advani SG (2015) Composite membrane based on graphene oxide sheets and nafion for polymer electrolyte membrane fuel cells. *ECS Electrochem Lett* 4:F1–F4 . <https://doi.org/10.1149/2.0021501eel>
93. Robinson DA, Liu Y, Edwards MA, Vitti NJ, Oja SM, Zhang B, White HS (2017) Collision Dynamics during the Electrooxidation of Individual Silver Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 139:16923–16931 . <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09842>
94. Teo WZ, Pumera M (2014) Fate of silver nanoparticles in natural waters; integrative use of conventional and electrochemical analytical techniques. *RSC Adv* 4:5006 . <https://doi.org/10.1039/c3ra43224f>
95. Stuart EJE, Rees N V., Cullen JT, Compton RG (2013) Direct electrochemical detection and sizing of silver nanoparticles in seawater media. *Nanoscale* 5:174–177 . <https://doi.org/10.1039/c2nr33146b>
96. Sokolov S V., Bartlett TR, Fair P, Fletcher S, Compton RG (2016) Femtomolar detection of silver nanoparticles by flow-enhanced direct-impact voltammetry at a microelectrode array. *Anal Chem* 88:8908–8912 . <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02670>

97. Farkas J, Peter H, Christian P, Gallego Urrea JA, Hassellöv M, Tuoriniemi J, Gustafsson S, Olsson E, Hylland K, Thomas KV (2011) Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ Int* 37:1057–1062 . <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.006>
98. Sokolov S V., Eloul S, Kätelhön E, Batchelor-McAuley C, Compton RG (2017) Electrode–particle impacts: a users guide. *Phys Chem Chem Phys* 19:28–43 . <https://doi.org/10.1039/c6cp07788a>
99. Cheng W, Compton RG (2014) Electrochemical detection of nanoparticles by “nano-impact” methods. *TrAC - Trends Anal Chem* 58:79–89 . <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.01.008>
100. Anderson TJ, Zhang B (2016) Single-Nanoparticle Electrochemistry through Immobilization and Collision. *Acc Chem Res* 49:2625–2631 . <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00334>
101. Romer I, Briffa SM, Dasilva YAR, Hapiuk D, Trouillet V, Palmer RE, Valsami-Jones E (2019) Impact of particle size, oxidation state and capping agent of different cerium dioxide nanoparticles on the phosphate-induced transformations at different pH and concentration. *PLoS One* 14:1–17 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217483>
102. Peng J, Peng S, Jiang A, Wei J, Li C, Tan J (2010) Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction. *Anal Chim Acta* 683:63–68 . <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.033>
103. Ashworth MRF (2006) Analytical Methods. *Chem Sulphonic Acids, Esters their Deriv* 323–350 . <https://doi.org/10.1002/0470034394.ch9>
104. Laborda F, Gimenez-Ingalaturre AC, Bolea E, Castillo JR (2019) Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry as screening tool for detection of particles. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* 159:105654 . <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.105654>
105. Uivarosi V (2013) Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications:

- An update. *Molecules* 18:11153–11197 .  
<https://doi.org/10.3390/molecules180911153>
106. Frei A, Zuegg J, Elliott AG, Baker M, Braese S, Brown C, Chen F, G. Dowson C, Dujardin G, Jung N, King AP, Mansour AM, Massi M, Moat J, Mohamed HA, Renfrew AK, Rutledge PJ, Sadler PJ, Todd MH, Willans CE, Wilson JJ, Cooper MA, Blaskovich MAT (2020) Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chem Sci* 11:2627–2639 . <https://doi.org/10.1039/c9sc06460e>
  107. Arivarasan VK, Loganathan K, Jayachandran V, Chaskar AC (2019) Synergistic-cidal effect of amoxicillin conjugated silver nanoparticles against *Escherichia coli*. *bioRxiv* 832568 . <https://doi.org/10.1101/832568>
  108. Mostafa S, El-Sadek M, Alla EA (2002) Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *J Pharm Biomed Anal* 28:173–180 . [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00591-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00591-X)
  109. Zampakou M, Akrivou M, Andreadou EG, Raptopoulou CP, Psycharis V, Pantazaki AA, Psomas G (2013) Structure, antimicrobial activity, DNA- and albumin-binding of manganese(II) complexes with the quinolone antimicrobial agents oxolinic acid and enrofloxacin. *J Inorg Biochem* 121:88–99 .  
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.013>
  110. El-Shwiniy WH, El-Attar MS, Sadeek SA (2013) Metal complexes of enrofloxacin part I: Preparation, spectroscopic, thermal analyses studies and antimicrobial evaluation. *J Korean Chem Soc* 57:52–62 .  
<https://doi.org/10.5012/jkcs.2013.57.1.52>
  111. Tarushi A, Lafazanis K, Kljun J, Turel I, Pantazaki AA, Psomas G, Kessissoglou DP (2013) First- and second-generation quinolone antibacterial drugs interacting with zinc(II): Structure and biological perspectives. *J Inorg Biochem* 121:53–65 .  
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.009>
  112. Gozlan I, Rotstein A, Avisar D (2013) Amoxicillin-degradation products formed under

- controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere* 91:985–992 .  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.095>
113. Goel S (2015) Antibiotics in the Environment: A Review. *ACS Symp Ser* 1198:19–42 .  
<https://doi.org/10.1021/bk-2015-1198.ch002>
114. Bartłomiejczyk T, Lankoff A, Kruszewski M, Szumiel I (2013) Silver nanoparticles - Allies or adversaries? *Ann Agric Environ Med* 20:48–54
115. González-jiménez A, García A (2020) in *Bone Tissue Infections*. 5:27–36
116. Vidović K, Kroflič A, Jovanović P, Šala M, Grgić I (2019) Electrochemistry as a Tool for Studies of Complex Reaction Mechanisms: The Case of the Atmospheric Aqueous-Phase Aging of Catechols. *Environ Sci Technol*.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02456>
117. Branica G, Metikoš-Huković M, Omanović D (2006) Voltammetric determination of stability constants of lead complexes with vitamin C. *Croat Chem Acta* 79:77–83
118. Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, Bercaw JE, Goldberg KI (2010) NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 29:2176–2179 . <https://doi.org/10.1021/om100106e>
119. Swann GEA, Patwardhan S V. (2011) Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for assessing biogenic silica sample purity in geochemical analyses and palaeoenvironmental research. *Clim Past* 7:65–74 .  
<https://doi.org/10.5194/cp-7-65-2011>
120. Luther GW, Theberge SM, Rickard D (2000) Determination of stability constants for metal-ligand complexes using the voltammetric oxidation wave of the anion/ligand and the DeFord and Hume formalism. *Talanta* 51:11–20 .  
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00234-9)
121. Alekseev VG, Demskaya L V. (2007) Ag(I) complexes with the ampicillin, amoxicillin,

- and cephalixin anions. *Russ J Coord Chem Khimiya* 33:203–207 .  
<https://doi.org/10.1134/S1070328407030086>
122. El-Gamel NEA (2013) Silver(i) complexes as precursors to produce silver nanowires: Structure characterization, antimicrobial activity and cell viability. *Dalt Trans* 42:9884–9892 . <https://doi.org/10.1039/c3dt33092c>
123. Battistel D, Baldi F, Gallo M, Faleri C, Daniele S (2015) Characterisation of biosynthesised silver nanoparticles by scanning electrochemical microscopy (SECM) and voltammetry. *Talanta* 132:294–300 .  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.023>
124. Yoon I, Park HS, Cui BC, Li JZ, Kim JH, Lkhagvadulam B, Shim YK (2011) Photodynamic and antioxidant activities of divalent transition metal complexes of methyl pheophorbide-A. *Bull Korean Chem Soc* 32:2981–2987 .  
<https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.8.2981>
125. Instituto Nacional De Medicamentos (Iname) Farmacopea Argentina
126. Murray WA, Barnes WL (2007) Plasmonic materials. *Adv Mater* 19:3771–3782 .  
<https://doi.org/10.1002/adma.200700678>
127. Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG (2014) A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139:4855–4861 . <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>
128. Lim J, Lee NE, Lee E, Yoon S (2014) Surface modification of citrate-capped gold nanoparticles using ctab micelles. *Bull Korean Chem Soc* 35:2567–2569 .  
<https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.8.2567>
129. Nghiem THL, La TH, Vu XH, Chu VH, Nguyen TH, Le QH, Fort E, Do QH, Tran HN (2010) Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* 1:4–9 . <https://doi.org/10.1088/2043-6254/1/2/025009>
130. Fernández-Ponce C, Muñoz-Miranda JP, de los Santos DM, Aguado E, García-Cozar

- F, Litrán R (2018) Influence of size and surface capping on photoluminescence and cytotoxicity of gold nanoparticles. *J Nanoparticle Res* 20: . <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4406-0>
131. Suvarna S, Das U, Sunil KC, Mishra S, Sudarshan M, Saha K Das, Dey S, Chakraborty A, Narayana Y (2017) Synthesis of a novel glucose capped gold nanoparticle as a better theranostic candidate. *PLoS One* 12:1–15 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178202>
132. Gnanadhas DP, Thomas M Ben, Thomas R, Raichur AM, Chakravorty D (2013) Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4945–4955 . <https://doi.org/10.1128/AAC.00152-13>
133. Dien et al. 2013 (2008) 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* 23:1–7 . <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
134. Bosque-Sendra JM, Almansa-López E, García-Campaña AM, Cuadros-Rodríguez L (2003) Data Analysis in the Determination of Stoichiometries and Stability Constants of Complexes. *Anal Sci* 19:1431–1439 . <https://doi.org/10.2116/analsci.19.1431>
135. Doménech-Carbó A, González-Béjar M, Pérez-Prieto J (2015) Application of the Generalized Molar-Ratio Method to the Determination of the Stoichiometry and Apparent Binding Constant of Nanoparticle-Organic Capping Systems. *Electroanalysis* 27:2302–2312 . <https://doi.org/10.1002/elan.201500232>
136. Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR (2011) Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 26:1362–1371 . <https://doi.org/10.1039/c0ja00098a>
137. Sasikumar G, Arulmozhi S, Ashma A, Sudha A, Askar ali SJ (2019) Mixed ligand ternary complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) and their structural characterization, electrochemical, theoretical and biological studies. *J Mol Struct*

- 1187:108–120 . <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.03.031>
138. Bulut I, Biçer E (2010) Study of binary complexes of Cu(II), Ni(II) and Co(II) with sulfamethazine by voltammetry. *Russ J Electrochem* 46:62–71 . <https://doi.org/10.1134/S1023193510010076>
139. Biçer E, Arat C (2008) Voltammetric behaviours of Zn(II) and Ni(II) complexes with acid red 1 at mercury electrode. *J Chil Chem Soc* 53:1734–1739 . <https://doi.org/10.4067/S0717-97072008000400023>
140. Quan G, Yan J (2010) Binding constants of lead by humic and fulvic acids studied by anodic stripping square wave voltammetry. *Russ J Electrochem* 46:90–94 . <https://doi.org/10.1134/S1023193510010118>
141. Sanz CG, Serrano SHP, Brett CMA (2019) Electrochemical characterization of cefadroxil  $\beta$ -lactam antibiotic and Cu(II) complex formation. *J Electroanal Chem* 844:124–131 . <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.077>
142. Martínez-Huitle CA, Suely Fernandes N, Cerro-Lopez M, Quiroz MA (2010) Determination of trace metals by differential pulse voltammetry at chitosan modified electrodes. *Port Electrochim Acta* 28:39–49 . <https://doi.org/10.4152/pea.201001039>
143. Khaloo SS, Mozaffari S, Barekat A, Karimi F (2015) Fabrication of a modified electrode based on multi-walled carbon nanotubes decorated with iron oxide nanoparticles for the determination of enrofloxacin. *Micro Nano Lett* 10:561–566 . <https://doi.org/10.1049/mnl.2015.0123>
144. Jafari S, Dehghani M, Nasirizadeh N, Azimzadeh M (2018) An azithromycin electrochemical sensor based on an aniline MIP film electropolymerized on a gold nano urchins/graphene oxide modified glassy carbon electrode. *J Electroanal Chem* 829:27–34 . <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.053>
145. Hayat A, Marty JL (2014) Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools

- for environmental monitoring. *Sensors* (Switzerland) 14:10432–10453 .  
<https://doi.org/10.3390/s140610432>
146. Nanoparticles S, Core A, Shell AO, Ghilane J, Fan FF, Bard AJ, Dunwoody N (2007) Facile Electrochemical Characterization. *Nano* 2–8
  147. Garbellini GS, Salazar-banda GR, Avaca LA, Química I De, Carlos DS, Paulo UDS, Sp SC (2008) Revisão. 31:123–133
  148. Bolaños KL, Nagles E, Arancibia V, Otiniano M (2014) OPTIMIZING ADSORPTION VOLTAMMETRIC TECHNIQUE (AdSV) IN DETERMINING OF AMARANTH ON CARBON PRINTED ELECTRODES . EFFECT OF SURFACTANTS ON SENSITIVITY. *Rev Soc Química Perú* 80:115–123
  149. Radic S (2015) Biophysical Interaction Between Nanoparticles and Biomolecules
  150. Stiufiuc R, Iacovita C, Lucaciu CM, Stiufiuc G, Dutu AG, Braescu C, Leopold N (2013) SERS-active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol. *Nanoscale Res Lett* 8:1–5 . <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-47>
  151. Cuadros-Moreno A, Casañas Pimentel R, San Martín Martínez E, Yañes Fernandez J (2014) Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American J Phys Educ* 8:14
  152. Giudice F (2017) anfifílicas de interés farmacológico " " Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico " Tesis Doctoral en Ciencias Químicas Biol . Francesca Giudice Departamento de Química Biológica CIQUIBIC
  153. Striegel AM, Brewer AK (2012) Hydrodynamic Chromatography. *Annu Rev Anal Chem* 5:15–34 . <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143107>
  154. Wang YJ, Hu RD, Jiang DH, Zhang PH, Lin QY, Wang YY (2011) Synthesis, crystal structure, interaction with BSA and antibacterial activity of La(III) and Sm(III) complexes with enrofloxacin. *J Fluoresc* 21:813–823 .

<https://doi.org/10.1007/s10895-010-0775-1>

155. Kim NG, Kim MA, Park Y II, Jung TS, Son SW, So BJ, Kang HG (2015) Magnetic nanoparticle based purification and enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody against enrofloxacin. *J Vet Sci* 16:431–437 . <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.4.431>
156. Rajendraprasad N, Basavaiah K (2015) Development and Validation of New Spectrophotometric Methods to Determine Enrofloxacin in Pharmaceuticals. *J Appl Spectrosc* 82:513–519 . <https://doi.org/10.1007/s10812-015-0139-3>
157. Domingos RF, Franco C, Pinheiro JP (2015) The role of charged polymer coatings of nanoparticles on the speciation and fate of metal ions in the environment. *Environ Sci Pollut Res* 22:2900–2906 . <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3546-8>
158. Cuprys A, Pulicharla R, Brar SK, Drogui P, Verma M, Surampalli RY (2018) Fluoroquinolones metal complexation and its environmental impacts. *Coord Chem Rev* 376:46–61 . <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.05.019>
159. Kulkarni AD, Patil SA, Badami PS (2009) Electrochemical properties of some transition metal complexes: Synthesis, characterization and In-vitro antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II), Mn(II) and Fe(III) complexes. *Int J Electrochem Sci* 4:717–729
160. Palecek E, Jelen F, Trnková L (1986) Cyclic voltammetry of DNA at a mercury electrode: an anodic peak specific for guanine. *Gen Physiol Biophys* 5:315–329
161. Pages BJ, Ang DL, Wright EP, Aldrich-Wright JR (2015) Metal complex interactions with DNA. *Dalt Trans* 44:3505–3526 . <https://doi.org/10.1039/c4dt02700k>
162. Plouffe J, Schwartz DB, Kolokathis A, Sherman BW, Arnow PM, Gezon JA, Suh B, Anzuetto A, Greenberg RN, Niederman M, Paladino JA, Ramirez JA, Inverso J, Knirsch CA (2000) Clinical efficacy of intravenous followed by oral azithromycin monotherapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia.

<https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1796-1802.2000>

163. Keskar MR, Jugade RM (2015) Spectrophotometric investigations of macrolide antibiotics: A brief review. *Anal Chem Insights* 10:29–37 .  
<https://doi.org/10.4137/Aci.s30656>
164. Walsh MI, Rizk MS, Eid MI, Fathy ME (2007) Spectrophotometric determination of four macrolide antibiotics in pharmaceutical formulations and biological fluids via binary complex formation with eosin and spectrophotometry. *J AOAC Int* 90:1579–1587
165. Oxalate Ir Ref.Pdf
166. Tajima I, Okada M, Sumitomo H (1981) Binding and Transport of Alkali and Alkaline Earth Metal Ions by Synthetic Macrolides Containing Tetrahydropyran Rings. *J Am Chem Soc* 103:4096–4100 . <https://doi.org/10.1021/ja00404a020>
167. Hamdan I (2014) Comparative in-vitro investigations of the interaction between some macrolides and Cu ( II ), Zn ( II ) and Fe ( II ) Comparative in-vitro investigations of the interaction between some mac ...
168. Shiekh RA, Rahman IA, Malik MA, Masudi SM, Luddin N (2012) Synthesis, spectral, electrochemical and biological studies of nitrogen donor macrocyclic ligand and its transition metal complexes. *Int J Electrochem Sci* 7:12829–12845
169. Karthick Raja Namasivayam S, Samrat K (2016) Cytotoxicity of chitosan stabilized silver and gold nanoparticles loaded azithromycin and ofloxacin nanodrug conjugate AgNp-AZ, OF and AuNp- AZ, OF) against blood cells. *Der Pharm Lett* 8:421–434
170. Voltammetry NP, Voltammetry DP, Voltammetry SW (2019) EC-Lab – Application Note # 67 Introduction to pulsed voltammetric techniques : DPV , NPV and SWV I – INTRODUCTION II – THEORETICAL DESCRIPTION EC-Lab – Application Note # 67. 1–5
171. Ríos Gómez MY (2011) Transiciones electrónicas en moléculas orgánicas.

172. Vladimirova E V., Dunaeva AA, Shipulo E V., Petrukhin OM, Kostitsyna M V. (2011) Studies of complex formation between macrolide antibiotics and alkali and alkali-Earth metals by the voltammetry at the interface of two immiscible electrolyte solutions. *Russ J Electrochem* 47:361–368 .  
<https://doi.org/10.1134/S1023193510121031>
173. Samra SE, Jeragh B, El-nokrashy AM, El-asmy A a (2014) classic radionuclide 188W/188Re generator. 2:4–7 . <https://doi.org/10.4172/2329-6798.10001>
174. Arrigan DWM, De Eulate EA, Liu Y (2016) Electroanalytical Opportunities Derived from Ion Transfer at Interfaces between Immiscible Electrolyte Solutions. *Aust J Chem* 69:1016–1032 . <https://doi.org/10.1071/CH15796>
175. Between I, Immiscible TWO, Electrolytes L (2008) Petr vanýsek \*1 and Luis basáez ramírez 2 2 1. 2:
176. Ensafi AA, Allafchian AR, Rezaei B (2013) A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbon nanotubes decorated with MgCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> for the determination of azithromycin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 103:468–474 .  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.021>
177. Sultana N, Arayne MS, Sabri R (2005) Erythromycin synergism with essential and trace elements. *Pak J Pharm Sci* 18:35–39
178. Hu L, Zhou T, Feng J, Jin H, Tao Y, Luo D, Mei S, Lee YI (2018) A rapid and sensitive molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor for Azithromycin determination in biological samples. *J Electroanal Chem* 813:1–8 .  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.010>
179. Farghaly OAEM, Mohamed NAL (2004) Voltammetric determination of azithromycin at the carbon paste electrode. *Talanta* 62:531–538 .  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.08.026>

180. Wu Y, Ji X, Hu S (2004) Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry* 64:91–97 .  
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2004.03.005>

## VI. Listado de Figuras

FIGURA 1. (A) SWASV DEL CONTROL POSITIVO (AG(I) Y AGNPS DE 60NM A 0,5 MGL <sup>-1</sup> ) (ROJO); (B) CONTROL NEGATIVO (AGNPS DE 40NM A 0,5MGL <sup>-1</sup> ) (AZUL). EL ELECTROLÍTO SOPORTE FUE NaClO <sub>4</sub> 0,1M. ED=-0,5V; TD=120; TR=5S; BARRIDO DE POTENCIAL: 0 A 0,5V; ΔE=0,004V, VBP = 0,04Vs <sup>-1</sup> .....	30
FIGURA 2. CALIBRADO EN LA DETERMINACIÓN POR SWASV DE AG(I) EN PRESENCIA DE AGNPS (ELECTROLITO SOPORTE NaClO <sub>4</sub> 0,1M) .....	32
FIGURA 3. DISOLUCIONES COMERCIALES DE PLATA COLOIDAL Y AG(I) COMERCIALIZADAS COMO ANTIBACTERICIDAS:(A) WELLNESS™ COLLOIDAL SILVER Y (B) BIOVEDIK™ .....	35
FIGURA 4. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR ULTRAVIOLETA-VISIBLE DE: (A) DISOLUCIÓN ESTÁNDAR DE AGNPS DE 40NM (5MGL <sup>-1</sup> ); (B) WELLNESS COLLOIDAL SILVER™ Y (C) BIOVEDIK™. VELOCIDAD DE BARRIDO 100NM MIN <sup>-1</sup> .....	36
FIGURA 5. VOLTAGRAMAS DE REDISOLUCIÓN SWASV DE LAS MUESTRAS: (A) WELLNESS COLLOIDAL SILVER TM (ROJO) Y (B) BIOVEDIK™ (NEGRO) EN NaClO <sub>4</sub> 0,1M (1:10). CONDICIONES DE MEDICIÓN COMO EN FIGURA 4	37
FIGURA 6. CELDA VOLTAMÉTRICA Y SISTEMA DE TRES ELECTRODOS. ELECTRODO DE TRABAJO (EPT O EAU DE D=2MM), ELECTRODO DE REFERENCIA 3M. AG/AGCl CON PUENTE SALINO KNO <sub>3</sub> 0,1M, Y ELECTRODO AUXILIAR (HILO DE Pt, DIÁMETRO 0,5 MM). .....	40
FIGURA 7.VOLTAMPEROGRAMA DE KNO <sub>3</sub> 0,1M (ELECTROLITO SOPORTE) CON ELECTRODOS DE TRABAJO PtE1 (A) Y PtE2 (B). Ei=0,2V; Ef=-0,9V; ΔE= -0,01V; ΔEp=0,05V; Tm=0,05s Y Tp=0,5s. ....	41
FIGURA 8. VOLTAMPEROGRAMA DE KNO <sub>3</sub> 0,1M (ELECTROLITO SOPORTE) CON ELECTRODOS DE TRABAJO AuE1 (A) Y AuE2 (B). Ei=0,2V; Ef=-0,9V; ΔE=-0,01V; ΔEp=0,05V; Tm=0,05s Y Tp=0,5s. ....	42
FIGURA 9. VOLTAMPEROGRAMAS DE DISOLUCIÓN DE KNO <sub>3</sub> 0,1M (LÍNEAS DISCONTINUAS) Y DISOLUCIÓN DE AG(I) 10MGL <sup>-1</sup> (LÍNEAS CONTINUAS) CON: (A) EPT1 Y (B) EPT2. CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA ANTERIOR. ....	43
FIGURA 10. VOLTAMPEROGRAMAS DE DISOLUCIÓN DE KNO <sub>3</sub> 0,1M (LÍNEAS DISCONTINUAS) Y DISOLUCIÓN DE AG(I) 10MGL <sup>-1</sup> (LÍNEAS CONTINUAS) CON: (A) AuE1 Y (B) AuE2. CONDICIONES DE MEDICIÓN COMO EN LA FIGURA ANTERIOR.....	43
FIGURA 11. CURVA DE CALIBRADO (LINEAL) DE AG(I) EN KNO <sub>3</sub> 0,1M POR VOLTAMETRÍA DIRECTA SOBRE PtE. ....	44

FIGURA 12. FUNDAMENTO DEL MÉTODO <i>AGNES</i> : (A) LA PRIMERA ETAPA SE LLEVA A CABO EN UN SOLO PASO (UN SOLO POTENCIAL) Y (B) LA PRIMERA PARTE SE LLEVA A CABO EN DOS PASOS (PROGRAMA DE POTENCIALES). .	52
FIGURA 13. EXPERIENCIA <i>AGNES-D</i> DE UNA DISOLUCIÓN DE $Ag(I)$ DE $10^{-6}$ M. $E_{1A}=-0,5154V$ ( $T_{1A}=500s$ ), $E_{1B}=-0,454586V$ ( $T_{1B}=50-500$ ) Y $E_2 = -0,4473V$ ( $Y_2=500$ ). .....	56
FIGURA 14. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MODELO TEÓRICO ISPIE DE LA VARIACIÓN DE LA CORRIENTE EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL (EC.11).....	58
FIGURA 15. BARRIDOS LSV EN EL PROCEDIMIENTO ISPIE: (A) ELECTROLITO DE SOPORTE $KNO_3$ $0,1M$ (AZUL CLARO); (B, C) DISOLUCIONES $Ag(I)$ $0,875 \cdot 10^{-6}$ M (AZUL OSCURO Y VERDE); (D, E) DISOLUCIÓN $Ag(I)$ $7 \cdot 10^{-5}$ M (VIOLETA Y AMARILLO). $E_i=+0,1V$ ; $E_f = +0,65V$ ; $v_b=0,1mVs^{-1}$ , $\Delta E=0,1mV$ ; $E_e=0,1V$ Y $T_e=200s$ .	60
FIGURA 16. VARIACIÓN DE POTENCIAL POR SALTOS DE $20mV$ EN UN TIEMPO DE $30s$ , EMPLEADOS EN EL SEGUNDO MÉTODO ISPIE PARA EL CÁLCULO DE $\epsilon_{NULO}$ .....	61
FIGURA 17. VOLTAMPEROGRAMAS DE (A) $Ag(I)$ $5 \cdot 10^{-7}M$ (ROJO), (B) $Ag(I)$ $6 \cdot 10^{-6}M$ (AZUL CLARO) Y (C) SUPPORTING ELECTROLYTE (AZUL OSCURO). $E_e=0,1V$ ; $T_e=800s$ . $E_i=0,16V$ ; $E_f=0,74V$ ; SALTOS= $20mV$ . TIEMPO DE SALTOS $30s$ .....	62
FIGURA 18. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA RELACIÓN ENTRE EL POTENCIAL DEL PICO VOLTAMÉTRICO $E_p$ Y EL LOGARITMO NEPERIANO DEL DIÁMETRO DE LAS <i>AGNPs</i> EN EL INTERVALO DE DIÁMETRO DE $20nm$ A $100nm$ . ECUACIÓN LÍNEAL MEDIDA Y COEFICIENTE DE REGRESIÓN (R). CADA MEDIDA ES EL VALOR MEDIO DE 3 RÉPLICAS.....	74
FIGURA 19. VOLTAGRAMAS DE BARRIDOS SUCESIVOS SOBRE UN GCE MODIFICADO CON $3\mu L$ DE <i>AGNPs</i> $40nm$ ( $0,5mL^{-1}$ ). (A) BARRIDO 1; (B) BARRIDO 2; (C) BARRIDO 3; (D) BARRIDO 4; (E) BARRIDO 5. $E_i=0V$ ; $E_f=0,5V$ ; $\Delta E=1,95mV$ ; $F=25Hz$ Y $\Delta E_p = 0,02V$ . .....	77
FIGURA 20. VOLTAGRAMAS DE GCE MODIFICADO CON $3\mu L$ DE <i>AGNPs</i> $40nm$ ( $0,5mL^{-1}$ ) MÁS: (A) $3\mu L$ DE NAFION™ AL 5% (M/V), (B) $3\mu L$ DE NAFION™ AL 2,5%(M/V), (C) $3\mu L$ DE NAFION™ AL 1,6%(M/V), (D) $3\mu L$ DE NAFION™ AL 1,25%(M/V). MISMAS CONDICIONES DE MEDIDA QUE LAS EMPLEADAS EN LA FIGURA 2.	78
FIGURA 21. VOLTAGRAMAS DE GCE MODIFICADO CON: (A) $3\mu L$ DE <i>AGNPs</i> $40nm$ ( $0,5mL^{-1}$ ) MÁS $3\mu L$ NAFION™ $0,25\%$ (M/V) Y (B) $3\mu L$ DE <i>AGNPs</i> $40nm$ ( $0,5mL^{-1}$ ). CONDICIONES DE MEDIDA COMO FIGURA 2. .	79
FIGURA 22. VOLTAGRAMAS DE BARRIDOS SUCESIVOS SOBRE UN GCE MODIFICADO CON $3\mu L$ DE <i>AGNPs</i> $40nm$ ( $0,5mL^{-1}$ ) Y $3\mu L$ DE NAFION™ $0,25\%$ (M/V). (A) A (T) BARRIDOS DE 1 AL 20. (·) $\Delta P$ DE LOS BARRIDOS; (■) DIFERENCIA ENTRE $\Delta P$ DE LOS BARRIDOS. ....	80

FIGURA 23. REPRESENTACIÓN DE LAS CARGAS (Q) RELACIONADAS CON EL PATRÓN DE AGNPs 40NM (0,5MGL-1). (--- -) QTEÓRICA, (●) QPRÁCTICA CON GCE MODIFICADO CON NAFION™, (▲) QPRÁCTICA CON GCE MODIFICADO CON NAFION™.....	81
FIGURA 24. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA EN LAS MEDIDAS PCC.....	85
FIGURA 25. CRONOAMPEROGRAMAS MEDIDOS EN UNA DISOLUCIÓN BLANCO (SIN AGNPs) DE ELECTROLITO SOPORTE NaClO <sub>4</sub> 0,02M: (A) MEDIDA CON CAJA DE FARADAY ABIERTA, Y (B) MEDIDA CON CAJA DE FARADAY CERRADA. ....	86
FIGURA 26. (A) CRONOAMPEROGRAMA DE UNA DISPERSIÓN DE AGNPs (10NM DE DIÁMETRO, 10NGL-1) EN NaClO <sub>4</sub> 0,02 M CON AUE (DIÁMETRO 0,5±0,05MM) Y AMPLIFICACIÓN DE LAS CORRIENTES FARADAICAS Y CAPACITIVAS (B) DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO SIGUIENDO LA EC. 1. ....	87
FIGURA 27. DISTRIBUCIONES DE TAMAÑO A PARTIR DE CRONOAMPEROGRAMAS DE 25NGL <sup>-1</sup> DE AGNPs. CONDICIONES INSTRUMENTALES: $E_e=+0,50V$ Y $E_e=+0,70V$ , PARA DIÁMETROS DE: (A): 10NM; (B): 20NM; (C) 40NM; (D) 60NM; Y (E): 100NM .....	89
FIGURA 28. CRONOAMPEROGRAMA DE UNA DISPERSIÓN DE AGNPs DE 20NM EN NaClO <sub>4</sub> 0,02M (20 NGL-1). $E_e=+0,70V$ DURANTE 10s. RECUADROS (A) AMPLIACIÓN DE LAS MEDIDAS DE CORRIENTE ENTRE 6,7 Y 7,2s; (B) DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO CALCULADA A PARTIR DE LOS PICOS REGISTRADOS ENTRE 2-10s. 90	90
FIGURA 29. INFLUENCIA DEL FACTOR DE ASIMETRÍA (AF) EN LAS DISTRIBUCIONES DE TAMAÑO CALCULADAS, A PARTIR DE CRONOAMPEROGRAMAS DE UNA DISPERSIÓN DE 25NGL-1 AGNPs ESTÁNDAR (20,0±1,2NM DE DIÁMETRO NOMINAL) EN 0,02 M NaClO <sub>4</sub> . SE MIDIERON LOS PICOS DE COLISIÓN EN EL INTERVALO DE 0,5 A 10s ( $E_e=+0,50V$ ) .....	92
FIGURA 30. DISTRIBUCIONES DE TAMAÑO DE AGNPs 25NGL-1 (20,0±1,2NM DE DIÁMETRO NOMINAL) EN NaClO <sub>4</sub> 0,02M. INFLUENCIA DEL VALOR DE DISCRIMINACIÓN $DF(1)$ EN ALTURA DE PICO EN EL CÁLCULO ALS. EN TODOS LOS CASOS, $AF=0,20$ . SE MIDIÓ EN EL INTERVALO DE 0,5 A 10s ( $E_e=+0,50V$ ). ....	93
FIGURA 31. DISTRIBUCIONES DE TAMAÑO DE AGNPs 25NGL-1 (20,0±1,2NM DE DIÁMETRO) EN NaClO <sub>4</sub> 0,02M. INFLUENCIA DEL VALOR DE DISCRIMINACIÓN $DF(2)$ . CONDICIONES; $AF=0,20$ ; $DF(1)=0$ , $ASL=2$ . LAS MEDIDAS SE REALIZARON EN EL INTERVALO DE 4 A 10s ( $E_e=+0,50V$ ).....	94
FIGURA 32. AJUSTE LINEAL ENTRE EL NÚMERO DE IMPACTOS (DE 0,5 A 10s) Y EL NÚMERO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA L-1 (10NM DE DIÁMETRO). LAS CONCENTRACIONES NUMÉRICAS DE AGNPs L-1 SE CORRESPONDEN A LAS CONCENTRACIONES DE AGNPs DE 0,0025, 0,025 Y 0,25NGL-1.....	97

FIGURA 33. AJUSTES NO LINEALES DE LA FUNCIÓN DEL NÚMERO EN IMPACTOS (DE 0,5 A 10s) RELACIONADAS CON EL NÚMERO DE AGNPs L-1 (10NM DE DIÁMETRO). SE MIDió UN TOTAL DE 5 CONCENTRACIONES DE AGNPs EN POTENCIAS DE 10 EN EL RANGO DE $4,5 \cdot 10^5$ A $4,5 \cdot 10^8$ L <sup>-1</sup> . .....	99
FIGURA 34. MUESTRA <i>WELLNESS</i> COLLOIDAL SILVERTM: (A) IMAGEN TEM; (B) DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE TEM; (C) CRONOAMPEROGRAMA, MUESTRA DILUIDA EN NaClO <sub>4</sub> 0,02M. (1/108,36)(V/V), RECUADRO: PICOS DE CORRIENTE TRANSITORIOS; Y (D) HISTOGRAMA DE TAMAÑO MEDIDO POR EL MÉTODO PCC. ....	101
FIGURA 35. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA <i>BIOVEDIK</i> TM: (A) IMAGEN TEM; (B) DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE TEM; (C) CRONOAMPEROGRAMA, MUESTRA DILUIDA EN NaClO <sub>4</sub> 0,02M. (1/107,27) (V/V), RECUADRO: PICOS DE CORRIENTE TRANSITORIOS; Y (D) DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO PCC. ....	102
FIGURA 36. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA <i>HIGH STABILITY</i> TM: (A) IMAGEN TEM; (B) DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO TEM; (C) CRONOAMPEROGRAMA, MUESTRA DILUIDA EN NaClO <sub>4</sub> 0.02M. (1/107,33) (V/V), RECUADRO: PICOS DE CORRIENTE TRANSITORIOS; Y (D) DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO PCC. ....	103
FIGURA 37. ESTRUCTURA DE LA AMOXICILINA. ....	116
FIGURA 38. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LA AMOXICILINA [134] .....	116
FIGURA 39. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES DE AMX CON Ag(I): (A) 0mM(MARRÓN); (B) 1,5mM(NEGRO); (C) 3mM(ROJO); (D) 6mM(AZUL); (E) 9mM(VERDE); (F) 12mM(AZUL); (G) 15mM(AMARILLO) Y (G) 30mM (AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO 100NM MIN <sup>-1</sup> . ....	117
FIGURA 40. ESPECTROS DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE DISPERSIONES DE AGNPs DE DIÁMETROS: (A) 10NM (NEGRO); (B) 20NM (ROJO); (C) 40NM (AZUL); Y (D) 60NM (VERDE) DE AGNPs. LA CONCENTRACIÓN DE AGNPs FUERON DE 5mGL <sup>-1</sup> EN AGUA MQ. VELOCIDAD DE BARRIDO DE 100NM MIN <sup>-1</sup> . ....	120
FIGURA 41. CAMBIO DE COLORACIÓN EN LAS MUESTRAS M_10NM-0 A M_10NM-5. ESTE CAMBIO SE MUESTRA EN ORDEN CRECIENTE DE IZQUIERDA A DERECHA. ....	121
FIGURA 42. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AgNPs DE 10NM A 0,05mM CON AMX: (A) 0mM(NEGRO); (B) 0,05mM(ROJO); (C) 0,1mM(AZUL); (D) 0,5mM(VERDE); (E) 1mM(VIOLETA); (F) 5mM(AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO DE 200NM MIN <sup>-1</sup> . ....	123
FIGURA 43. VARIACIÓN DEL MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE AMX CON AGNPs DE 10NM. LA LÍNEA DISCONTINUA ROJA REPRESENTA LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO .....	126

FIGURA 44. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA); (F) 5MM(AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO DE 200NM MIN <sup>-1</sup> . .....	128
FIGURA 45. VARIACIÓN DEL MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE AMX CON AGNPs DE 50NM. LA LÍNEA DISCONTINUA ROJA REPRESENTA LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO. ....	130
FIGURA 46. VOLTAGRAMAS DE DISOLUCIONES MEZCLA DE AG(I) 1MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 1MM(ROJO);(C) 5MM(AZUL); (D) 10MM(VERDE); (E) 20MM(VIOLETA); (F) AMX 0,2MM(AZUL MARINO) Y (G) KNO3 0,1M(VERDE CLARO). LAS MEDIDAS SE REALIZARON CON DOS ELECTRODOS DE PLATINO (TRABAJO Y AUXILIAR) Y UN ELECTRODO AG/AGCL (REFERENCIA). EL $\Delta E=0,01V$ , $\Delta E_p=0,05V$ , $T_M=0,05s$ Y $T_P=0,5s$ .....	134
FIGURA 47. (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,2MM(VIOLETA); (C) 0,8MM(AMARILLO); (D) 1MM(NEGRO OSCURO); (E) 1,5MM(VERDE) Y (F) KNO3 0,1M(AZUL OSCURO). ELECTRODO DE TRABAJO (GC) DE REFERENCIA (AG/AGCL) Y TRABAJO (PLATINO). PRECONCENTRACIÓN: $E_E=-0,2V$ DURANTE $T_E=120s$ . BARRIDO DE POTENCIALES: DE -0,2V A 1,0V; $\Delta E=0,05V$ , $\Delta E_p=0,05V$ , $T_M=0,05s$ Y $T_P=0,5s$ . ....	138
FIGURA 48. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (CUADRÁTICA) DE LA FUNCIÓN $F_0AgI$ FRENTE A $AMXL$ SIGUIENDO EL MÉTODO DE DEFORD-HUME. ....	141
FIGURA 49. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE AGNPs DE 10NM A 0,05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y (F) 5MM(AMARILLO). ELECTRODO DE TRABAJO (GC MODIFICADO CON 5 $\mu$ L DE DISOLUCIÓN) DE REFERENCIA (AG/AGCL) Y TRABAJO (PLATINO) [6]. BARRIDO DE POTENCIALES: DE -0,2V A 1,0V; $\Delta E=0,05V$ , $\Delta E_p=0,05V$ , $T_M=0,05s$ Y $T_P=0,5s$ .....	143
FIGURA 50. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE). CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA ANTERIOR. ....	144
FIGURA 51. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (LINEAL) DE LA FUNCIÓN DE $F_0AgNP_{10nm}$ FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE $AMXL$ SIGUIENDO EL MÉTODO DE DEFORD-HUME. ....	146
FIGURA 52. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (LINEAL) DE LA FUNCIÓN DE $F_0AgNP_{50nm}$ FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE $AMXL$ SIGUIENDO EL PROCEDIMIENTO DEFORD-HUME. ....	147

FIGURA 53. ESQUEMA DE UN INSTRUMENTO DLS Y MEDIDA DE UNA MUESTRA: (A) COMPONENTES INSTRUMENTALES DE UN EQUIPO DE DLS; (B) REGISTRO DE INTENSIDAD DE LUZ DISPERSADA POR UNA MUESTRA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO [163] .....	149
FIGURA 54. ESQUEMA DE SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS EN UNA COLUMNA DE SEPARACIÓN EN HDC. ....	150
FIGURA 55. CROMATOGRAMAS HDC DE LAS MEZCLAS DE AGNPs DE 10NM A 0,05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y (F) 5MM(AMARILLO), LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UNA COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6ML, DESPUÉS DE INYECTAR 20 $\mu$ L DE LAS MUESTRAS.....	156
FIGURA 56. CROMATOGRAMAS HDC DE LAS MEZCLAS DE AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y (F) 5MM(AMARILLO). LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UNA COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6ML, INYECTANDO 20 $\mu$ L DE LAS MUESTRAS. ....	157
FIGURA 57. ESTRUCTURA DE LA ENROFLOXACINA. ....	159
FIGURA 58. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES DE ENRO 0,015MM CON Ag(I): (A) 0MM(ROJO); (B) 0,05MM(AZUL); (C) 0,5MM(VERDE); (D) 2,5MM(VIOLETA); (E) 5MM(AMARILLO); (F) Ag(I) 5MM(NEGRO). LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UN RANGO DE LONGITUDES DE ONDA DE 400NM A 200NM, CON UNA VELOCIDAD DE BARRIDO DE LONGITUDES DE ONDA DE 100NM MIN-1. ....	161
FIGURA 59. CAMBIO DE COLORACIÓN EN LAS MUESTRAS M_10NM-0 A M_10NM-4 ESTANDO ESTAS MUESTRAS COLOCADA DE MODO CRECIENTE DE IZQUIERDA A DERECHA.....	162
FIGURA 60. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AGNPs DE 10NM A 0,05MM CON ENRO: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) ENRO(VIOLETA). VELOCIDAD DE BARRIDO DE 200NM MIN-1. ....	164
FIGURA 61. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON ENRO: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA); (F) ENRO 0,05MM(AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO DE 200NM MIN-1. ....	166
FIGURA 62. VARIACIÓN DEL MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE ENRO CON AGNPs DE 50NM. LA LÍNEA DISCONTINUA ROJA REPRESENTA LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO. ....	168

FIGURA 63. VOLTAGRAMAS DPV DE DISOLUCIONES MEZCLA DE $Ag(I)$ 1MM CON ENRO: (A) 0MM(NEGRO); (B) 2MM(ROJO); (C) 4MM(AZUL); (D) 8MM(VERDE); (E) 10MM(VIOLETA); (F) 20MM(AMARILLO) Y (G) $KNO_3$ 0,1M(VERDE CLARO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO LA FIGURA ANTERIOR. ....	171
FIGURA 64. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE $Ag(I)$ 2 $\mu$ M CON AMX: (A) 0MM(ROJO); (B) 2 $\mu$ M(AZUL CLARO); (C) 20 $\mu$ M(VIOLETA); (D) 100 $\mu$ M(VERDE); (E) 200 $\mu$ M(AZUL OSCURO); 500 $\mu$ M(LILA) Y (F) $KNO_3$ 0,1M(NEGRO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA 47. ....	175
FIGURA 65. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA FUNCIÓN CUADRÁTICA $F0AgI$ FRENTE A $ENRL$ SIGUIENDO EL MÉTODO DE <i>DEFORD-HUME</i> . ....	176
FIGURA 66. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE $AgNPs$ DE 10NM A 0,05MM CON ENRO: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,1MM(ROJO); (C) 0,5MM(AZUL); (D) 1MM(VERDE); (E) $NaClO_4$ 0,1M(VIOLETA). CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA ANTERIOR.....	178
FIGURA 67. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE $AgNPs$ DE 50NM A 0.05MM CON AMX: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0.05MM(ROJO); (C) 0.1MM(AZUL); (D) 0.5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y $NaClO_4$ 0.1M(AMARILLO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA 66.....	179
FIGURA 68. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (LINEAL) DE LA FUNCIÓN DE $F0AgNP_{10nm}$ FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE $ENROL$ , EMPLEANDO EL MÉTODO <i>DEFORD-HUME</i> . ....	181
FIGURA 69. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA FUNCIÓN LINEAL $F0AgNP_{50nm}$ FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE $ENRL$ (MÉTODO <i>DEFORD-HUME</i> ).....	182
FIGURA 70. CROMATOGRAMAS HDC DE DISOLUCIONES DE $AgNPs$ DE 10NM A 0,05MM CON ENRO: (A) 0MM (NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(VIOLETA); (D) 0,5MM (AMARILLO); (E) 1MM (MARRÓN). LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UNA COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6MLMIN <sup>-1</sup> , Y UN VOLUMEN INYECTADO DE 20 $\mu$ L. ....	183
FIGURA 71. CROMATOGRAMAS HDC DE LAS MEZCLAS DE $AgNPs$ DE 50NM A 0,05MM CON ENRO: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA). LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UNA COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6ML MIN <sup>-1</sup> , DESPUÉS DE INYECTAR 20 $\mu$ L DE LAS MUESTRAS. ....	184
FIGURA 72. ESTRUCTURA DE LA AZITROMICINA.....	187

FIGURA 73. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE DISOLUCIONES DE AZT DE ENTRE 10MGL <sup>-1</sup> Y 1000MG L <sup>-1</sup> . LAS MEDIDAS SE LLEVARON A CABO EN UN INTERVALO DE LONGITUDES DE ONDA DE 600NM A 200NM, CON UNA VELOCIDAD DE BARRIDO DE LONGITUDES DE ONDA DE 200NM MIN <sup>-1</sup> . .....	188
FIGURA 74. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AGNPs DE 10NM A 0,05MM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y (F) 1MM(AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO DE 200NM MIN <sup>-1</sup> . .....	190
FIGURA 75. RESULTADOS DEL MÉTODO MODIFICADO DE LAS RELACIONES MOLARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE AZT CON AGNPs DE 50NM. LA LÍNEA DISCONTINUA ROJA REPRESENTA LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO.....	196
FIGURA 76. VOLTAGRAMAS DPV DE DISOLUCIONES MEZCLA DE Ag(I) 1MM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 2MM(ROJO); (C) 4MM(AZUL); (D) 8MM(VERDE); (E) 10MM(VIOLETA); (F) 20MM(AMARILLO) Y (G) KNO3 0,1M(VERDE CLARO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO EN LA FIGURA ANTERIOR.....	199
FIGURA 77. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE Ag(I) 2μM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 2μM(ROJO); (C) 20μM(AZUL); (D) 200μM(VERDE); (E) 2000μM(VIOLETA); (F) KNO3 0,1M(AMARILLO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO FIGURA EQ_AMX_DPV47 .....	202
FIGURA 78. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA FUNCIÓN <i>F0AgI</i> FRENTE A <i>AZTL</i> SIGUIENDO EL MÉTODO DE <i>DEFORD-HUME</i> .....	203
FIGURA 79. VOLTAGRAMAS DE DISOLUCIONES 0,05MM DE AGNPs-10NM A CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,1MM(ROJO); (C) 0,5MM(AZUL); (D) 1MM(VERDE); (E) 5MM(VIOLETA); (F) NaClO4 0,1M(AMARILLO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO FIGURA EQ_AMX_VIP1049.....	204
FIGURA 80. VOLTAGRAMAS DE LAS DISOLUCIONES MEZCLA DE 0,05MM AGNPs-50NM CON AMX EN CONCENTRACIONES: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 05MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA); 5MM(VIOLETA) Y (F) NaClO4 0,1M(AMARILLO). CONDICIONES DE MEDIDA COMO FIGURA EQ_AMX_VIP1049 .....	205
FIGURA 81. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (LINEAL) DE LA FUNCIÓN <i>F0AgNP_10nm</i> FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE <i>AZTL</i> , CALCULADA POR EL MÉTODO DEFORD-HUME. ....	206
FIGURA 82. REPRESENTACIÓN GRÁFICA (LINEAL) DE LA FUNCIÓN DE <i>F0AgNP_50nm</i> FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE <i>AZTL</i> (MÉTODO <i>DEFORD-HUME</i> ). ....	207
FIGURA 83. CROMATOGRAMAS HDC DE LAS MEZCLAS DE AGNPs DE 10NM A 0,05MM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA). LAS MEDIDAS SE	

LLEVARON A CABO EN UNA COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6ML MIN-1, DESPUÉS DE INYECTAR 20 $\mu$ L DE LAS MUESTRAS. .... 209

FIGURA 84. CROMATOGRAMAS HDC DE LAS MEZCLAS DE AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA). COLUMNA PL-PSDA TIPO 1, CON UN FLUJO DE 1,6MLMIN-1, DESPUÉS DE INYECTAR 20 $\mu$ L DE LAS MUESTRAS. .... 210

## VII. Listado de Tablas

TABLA 1. RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES Y RELACIONES MOLARES AMX / Ag(I) EN LAS DISOLUCIONES NUMERADAS COMO M-0 A M-7.....	19
TABLA 2. RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES DE ENRO Y Ag(I) Y RELACIONES MOLARES EN LAS DISOLUCIONES QUE SE HAN NUMERADO E-0 A E-4.....	20
TABLA 3. CONCENTRACIONES DE LOS 3 ANTIBIÓTICOS AMX, ENRO, AZT Y AgNPs DE 10NM, Y SUS RELACIONES MOLARES, EN LAS DISOLUCIONES DENOMINADAS M_10NM-0A M_10NM -5.....	21
TABLA 4. RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES DE AMX ENRO, AZT Y AgNPs DE 50NM EN LAS DISOLUCIONES NUMERADAS COMO M_50NM-0 A M_50NM -5.....	22
TABLA 5. RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES AMX Y Ag(I) EN LAS DISOLUCIONES DE REACCIÓN NUMERADAS COMO Ag(I)-S0 A Ag(I)-S4.....	23
TABLA 6. RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES DE LA REACCIÓN DE Ag(I) CON LOS 3 ANTIBIÓTICOS AMX, ENRO Y AZT, NUMERADAS COMO Ag(I)-A0 A Ag(I)-A5.....	24
TABLA 7. REPETIBILIDAD, LINEALIDAD, RANGO DE TRABAJO, RECUPERACIÓN, ROBUSTEZ, LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO DE SWASV .....	34
TABLA 8. CONCENTRACIONES DE AGTOTAL Y Ag(I) DETERMINADAS POR SWASV Y AAS. LAS CONCENTRACIONES DE AgNPs SE OBTUVIERON POR DIFERENCIA.....	37
TABLA 9. REPETIBILIDAD, LINEALIDAD, RANGO DE TRABAJO, ROBUSTEZ, LD Y LQ DE VOLTAMETRÍA DIRECTA SOBRE PtE. ....	45
TABLA 10. DESVIACIONES ESTÁNDAR RELATIVAS DE LOS VALORES DE $E_p$ MEDIDOS CON LOS PATRONES DE TAMAÑO DE AgNPs INDICADOS, EN CONCENTRACIONES 0,5MGL <sup>-1</sup> .....	75
TABLA 11. DIÁMETRO MEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LAS AgNPs EN LAS 3 MUESTRAS MEDIDOS CON LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES INDICADAS. VALORES DE NÚMERO DE CONCENTRACIÓN AgNPs L-1 MEDIDOS POR PCC Y SP-ICP-MS.....	104
TABLA 12. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS ENCONTRADOS EN LAS MEZCLAS M_10NM-0 A M_10NM-5.....	124
TABLA 13. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS ENCONTRADOS EN LAS MEZCLAS M_50NM-0 A M_50NM-5.....	129

TABLA 14. MEDIDAS VOLTAMÉTRICAS DP-ASV DE LAS DISOLUCIONES MEZCLAS <b>Ag(I)-A0</b> A <b>Ag(I)-A4</b> ESTUDIADAS. .....	140
TABLA 15. DIÁMETRO, POLIDIRPERSIDAD (PDI), MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR (SD) DEL DIÁMETRO MEDIDAS POR DLS DE LAS MEZCLAS DE LA M_10NM-0 A LA M_10NM-5. ....	152
TABLA 16. DIÁMETRO, PDI, MEDIA Y SD DEL DIÁMETRO MEDIDAS POR DLS DE LAS MEZCLAS DE LA <b>M_50NM-0</b> A LA <b>M_50NM-5</b> . ....	154
TABLA 17. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS ENCONTRADOS EN LAS DISOLUCIONES M_10NM-0 A M_10NM-3. ....	164
TABLA 18. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS ENCONTRADOS EN LAS MEZCLAS <b>M_50NM-0</b> A <b>M_50NM-4</b> . ....	167
TABLA 19. MEDIDAS POR VOLTAMETRÍA DIRECTA DE LAS DISOLUCIONES MEZCLAS Ag(I)-S0 A Ag(I)-S4. ....	173
TABLA 20. RESUMEN DE LAS BANDAS DE ABSORCIÓN EN LAS DISOLUCIONES M_10NM-0 A M_10NM-5. ....	191
TABLA 21. VARIACIÓN DEL MÉTODO DE LAS RELACIONES MOLARES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO DE AZT CON AGNPs DE 10NM. LA LÍNEA DISCONTINUA ROJA REPRESENTA LA ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO. ....	192
TABLA 22. ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR DE LAS DISOLUCIONES AGNPs DE 50NM A 0,05MM CON AZT: (A) 0MM(NEGRO); (B) 0,05MM(ROJO); (C) 0,1MM(AZUL); (D) 0,5MM(VERDE); (E) 1MM(VIOLETA) Y (F) 1MM(AMARILLO). VELOCIDAD DE BARRIDO 200NM MIN-1. ....	193
TABLA 23. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LAS DISOLUCIONES M_50NM-0 A M_50NM-5, EN EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES AZT Y AGNPs DE 50NM. ....	195
TABLA 24. MEDIDAS POR VOLTAMETRÍA DIRECTA DE LAS DISOLUCIONES MEZCLAS <b>Ag(I)-S0</b> A <b>Ag(I)-S4</b> . ....	200
TABLA 25. CONSTANTES DE ESTABILIDAD Y ESTEQUIOMETRIAS DE LOS COMPLEJOS DE AMX, ENRO, AZT CON Ag(I) Y AGNP. ....	214

## VIII. Abreviaturas empleadas

<b>A</b>	Absorbancia
<b>AAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica
<b>Ag(I)</b>	Plata iónica (Ag <sup>+</sup> )
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de plata
<b>AGNES</b>	Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping
<b>AMX</b>	Amoxicilina
<b>AMX_B1</b>	Banda de absorción 1 de la amoxicilina
<b>AMX_B2</b>	Banda de absorción 2 de la amoxicilina
<b>AMX_B3</b>	Banda de absorción 3 de la amoxicilina
<b>ASV</b>	Voltametría de redisolución anódica
<b>AZT</b>	Azitromicina
<b>CV</b>	Voltametría cíclica
<b>DLS</b>	Dispersión dinámica de la luz
<b>DPV</b>	Voltametría diferencial de pulso
<b>DV</b>	Voltametría directa
<b>EAM</b>	Espectrometría de absorción molecular
<b>Ee</b>	Potencial de electrólisis
<b>Ei</b>	Potencial inicial

<b>Ef</b>	Potencial final
<b>ENRO</b>	Enrofloxacin
<b>ENRO_B1</b>	Banda de absorci3n 1 de la enrofloxacin
<b>ENRO_B2</b>	Banda de absorci3n 2 de la enrofloxacin
<b>ENRO_B3</b>	Banda de absorci3n 3 de la enrofloxacin
<b>Ep</b>	Potencial de m1ximo de corriente de un pico voltam3trico
<b>FESEM</b>	Microscopía electr3nica de barrido
<b>FFF</b>	fraccionamiento de flujo de campo
<b>HDC</b>	Cromatografía hidrodinámica.
<b>ISPIE</b>	<i>In Situ Prepared Indicator Electrode</i>
<b>If</b>	Corriente faradaica
<b>Ip</b>	M1xima corriente del pico voltam3trico
<b>Mili Q</b>	Agua desmineralizada (18,2M $\Omega$ cm <sup>-1</sup> a 25 °C)
<b>PCC</b>	Cronoculombimetría de colisi3n de partícula
<b>POCTEFA</b>	Programa INTERREG V-A España-Francia-Andorra
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>SAM</b>	Mono capa autoensamblada
<b>SPR</b>	Resonancia de plasm3n superficial

<b>SP-ICP-MS</b>	Detección de partículas individuales con Plasma Acoplado Inductivamente - Espectrometría de Masas
<b>SWV</b>	Voltametría de onda cuadrada
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión.
<b>te</b>	Tiempo de electrólisis.
<b>tm</b>	Tiempo de modulación
<b>tp</b>	Tiempo de intervalo
<b>tr</b>	Tiempo de retención (o de reposo)
<b>UV- Vis</b>	Ultravioleta- Visible
<b>vb</b>	Velocidad de barrido de potenciales
<b>VIP</b>	Voltametría de partículas inmovilizadas.
<b><math>\Delta E</math></b>	Incremento de paso (barrido escalonado de potencial)
<b><math>\Delta E_p</math></b>	Amplitud de modulación, impulso del potencial (voltametría impulsional)