

Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición

Comparison of the size of gold nanoparticles using different measurement techniques and protocols

Comparaçãõ do tamanho de nanopartículas de ouro usando diferentes técnicas e protocolos de mediçãõ

RECIBIDO: 23/7/2020 → APROBADO: 13/10/2020 ✉ sbotasini@fcien.edu.uy

👤 BOTASINI, SANTIAGO (1)

(1) LABORATORIO DE BIOMATERIALES, INSTITUTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Con el avance de la nanotecnología, tanto en el ámbito académico como comercial, ha crecido la necesidad de contar con técnicas y protocolos de caracterización de nanopartículas. Si bien existen varios métodos de medida, el “verdadero” tamaño de las nanopartículas no puede entenderse en términos absolutos, sino que está relacionado con la forma y el tipo de nanomaterial, además de la técnica y los protocolos o criterios asociados a estas mediciones. En otras palabras, cuando hablamos del tamaño de una partícula debemos tener presente dos preguntas básicas: ¿qué estamos midiendo? y ¿cómo medimos? Desde el punto de vista de la metrología, es importante centrar la discusión en los criterios a tener en cuenta y en los parámetros adicionales que debemos reportar a la hora de presentar un resultado de tamaño de nanopartículas. El presente trabajo muestra, a título comparativo, la caracterización de nanopartículas homogéneas de oro empleando diferentes técnicas y criterios de medida para los métodos de rutina DLS, UV-VIS y HR-TEM. Los resultados muestran que cuando hablamos del tamaño de partículas es necesario hacer referencia al modelo empleado, así como también a los criterios elegidos a la hora de realizar el recuento.

PALABRAS CLAVE: partículas homogéneas, síntesis, coloides, nanometrología.

ABSTRACT

With the increasing advance of nanotechnology, both in the academic and commercial areas, the need for nanoparticle characterization techniques and

protocols has grown. Although there are several measurement methods, the “true” size of nanoparticles cannot be understood in absolute terms but related to the material, the technique and to the protocols or criteria associated with these measurements. In other words, when we talk about the size of a particle, we must take into account two basic questions: what are we measuring? and how do we measure? From the metrological point of view, it is important to discuss the criteria to take into account, and which additional parameters should we report when presenting a nanoparticle size result. The present work shows, comparatively, the characterization of the size of homogeneous gold nanoparticles, using different techniques and measurement criteria with DLS, UV-VIS and HR-TEM methods. The results show how the definition of size is important to establish a result, as well as the criteria chosen when performing the particle counting.

KEYWORDS: homogeneous particles, synthesis, colloids, nanometrology.

RESUMO

Com o crescente avanço da nanotecnologia, tanto na esfera acadêmica quanto comercial, aumentou a necessidade de técnicas e protocolos de caracterização de nanopartículas. Embora existam vários métodos de medição, o tamanho “verdadeiro” das nanopartículas não pode ser entendido em termos absolutos, mas está relacionado ao tipo de material de cada técnica e aos protocolos ou critérios associados a essas medidas. Em outras palavras, quando falamos sobre o tamanho de uma partícula, devemos ter em mente duas perguntas básicas: o que estamos medindo? e como medimos? Do ponto de vista da metrologia, é importante focar a discussão nos critérios a serem levados em consideração e quais parâmetros adicionais devemos reportar ao apresentar um resultado de tamanho de nanopartícula. O presente trabalho mostra, para fins comparativos, a caracterização do tamanho de nanopartículas homogêneas de ouro, utilizando diferentes técnicas e critérios de medição para os métodos rotineiros de DLS, UV-VIS e HR-TEM. Os resultados mostram como, quando falamos em tamanho de partículas, é necessário fazer referência ao modelo utilizado, bem como aos critérios escolhidos ao fazer a contagem.

PALAVRAS-CHAVE: partículas homogêneas, síntese, coloides, nanometrologia.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha extendido el uso de nanopartículas de oro y plata con diversos fines, desde la química analítica y la ingeniería hasta la medicina. Estas nanopartículas aparecen en un gran número de aplicaciones comerciales, aprovechando las propiedades únicas que surgen de la naturaleza nanométrica del material, las cuales varían en función de sus características fisicoquímicas como la concentración, la distribución de tamaño, la composición, la forma, las propiedades de superficie (como área superficial, carga y química de superficie), la aglomeración y la naturaleza del material (Rasmussen, et al., 2018). Si bien existen técnicas y protocolos estandarizados para la caracterización de algunas nanoestructuras específicas, todavía no existen protocolos nacionales o internacionales generalizados para la evaluación de estas propiedades (Eaton, et al., 2017; Rogers, et al., 2018; Minelli, et al.,

2019). Una de las razones de esta carencia técnica es la gran diversidad de materiales; aun limitando el tipo de nanoestructura al caso específico de las nanopartículas de oro, también se evidencia la falta de estándares que permitan la comparación de medidas entre distintos laboratorios y la validación de nuevas técnicas y criterios a ser adoptados para la caracterización de las dispersiones coloidales. Salvo algunas excepciones de productos particulares, es sabido que en materia de regulación, tanto en nuestro país como en varios otros, existe un vacío legal al tratar los nanomateriales como meros productos químicos; y los pocos intentos que hay en materia de normativas son regulaciones blandas y voluntarias, que, aunque importantes, resultan insuficientes (Tanaka, 2019). En general, la toxicidad se reduce a especificar la identidad o naturaleza química del material y la dosis o concentración, cuando para el caso de los nanomateriales es necesario considerar también el tamaño, la forma y el agente estabilizante (en el caso de dispersiones coloidales).

El problema de la falta de protocolos y políticas regulatorias no es solamente legal, sino que tiene un origen técnico debido a la dificultad de generar procedimientos y materiales de referencia generalizados (Domingos, et al., 2009; Rogers, et al., 2018). A modo de ejemplo, pequeños cambios de tamaño de las nanopartículas pueden producir modificaciones drásticas en las propiedades. En particular, la carencia de materiales de referencia y de patrones de medida a nivel internacional dificulta la validación de las técnicas de laboratorio. Este problema se acentúa con el hecho de que la nanotecnología es un área de investigación dinámica, donde nuevos métodos de medición se siguen desarrollando y mejorando de forma continua, lo cual también impone un obstáculo en la generación de consensos internacionales sobre cuáles propiedades merecen ser medidas y cuál es la mejor forma de hacerlo. Para el caso de las nanopartículas metálicas de oro y plata, el National Institute of Standards and Technology (NIST), de Estados Unidos, solamente cuenta con estándares para algunos tamaños determinados (10, 30 y 60 nm SRM 8011, SRM 8012 y SRM 8013 respectivamente) (Bienert, et al., 2009; Nelson, et al., 2013).

Dentro de este contexto, desde el Laboratorio de Biomateriales hemos estado trabajando en aportar nuestro grano de arena para solucionar algunos de los desafíos que presenta el área. En particular, se ha trabajado en la detección de nanopartículas de plata a través del proyecto “Determinación de material nanoparticulado de plata (nano silver) en productos comerciales”, financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), e implementado por Santiago Botasini y Eduardo Méndez en 2020. En concreto, se desarrolló un protocolo analítico basado en las señales electroquímicas de la oxidación de las nanopartículas de plata, cuyo uso se ha extendido en diversos productos comerciales tales como agentes antibacterianos. Nuestro proyecto más reciente en materia de nanometrología, titulado “Fabricación de estándares de nanopartículas” y financiado por el Fondo Carlos Vaz Ferreira, se enfocó en la síntesis de nanopartículas de oro con similares prestaciones a las comerciales en términos de alta homogeneidad (bajo índice de polidispersión) y estabilidad de la muestra frente a la agregación (detectado por un cambio en el diámetro de la partícula).

En este sentido, el siguiente desafío consiste en generar un mayor conocimiento técnico que permita servir de insumo para la generación de protocolos de calidad,

a fin de evaluar las propiedades de las nanopartículas tanto a nivel de producción de laboratorio como de su implementación en productos comerciales.

Si bien las medidas de distribución de tamaño son una práctica de rutina de los laboratorios que trabajan con nanoestructuras, muchas veces los criterios de medición elegidos no se especifican y la medida queda a merced del analista. Incluso en algunos ejemplos, el recuento de partículas se realiza de forma manual sobre imágenes de microscopía electrónica (Hinterwirth, et al., 2013). Dentro de este contexto, el presente trabajo aborda la discusión sobre los criterios y protocolos comúnmente empleados para el recuento de nanopartículas por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) y su comparación con otras técnicas de rutina a nivel de laboratorio, como son las medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) y la espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis).

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis de nanopartículas de oro ultra-homogéneas

Todos los materiales empleados fueron de pureza analítica: ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma-Aldrich), citrato de sodio di-hidratado (99%, Carlo-Erba), hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Anedra). Todas las soluciones se prepararon empleando agua ultrapura (resistividad $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Mili Q).

La síntesis de nanopartículas se realizó mediante el método de Turkevich (Turkevich, 1985), con algunas modificaciones (Méndez y Botasini, 2019): 65 μL de una disolución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 50 mg mL^{-1} fue rápidamente adicionada en 50 mL de una disolución de NaOH ligeramente alcalina a pH 7.5 – 8.0, en un balón de 100 mL. La solución resultante se calentó a ebullición y luego se agregaron 86 μL de una disolución 114 mg mL^{-1} de citrato de sodio di-hidratado. El color de la solución cambió rápidamente de amarillo a azul y finalmente a rojo. El tiempo de reacción fue de 20 minutos, tras lo cual la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez sintetizadas, las nanopartículas fueron filtradas consecutivamente, empleando filtros Whatman Anotop de tamaño de poro nominal 0.2 μm y 0.02 μm , para asegurar la mínima dispersión de tamaños.

Medidas por microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM)

Se realizaron las medidas en un microscopio electrónico modelo JEM 2100, a temperatura ambiente (ca. 24 °C), en una grilla de carbono sobre la que se depositó una dispersión coloidal de nanopartículas con una absorbancia de ca. 1. La muestra se dejó secar por ca. 40 min. La tensión eléctrica de aceleración aplicada fue de 200 kV mediante un filamento de hexaboruro de lantano.

El procesamiento de imágenes se realizó mediante el software libre ImageJ, versión 1-8-0_112 (National Institutes of Health y Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, 2019).

La obtención de imágenes se realizó de forma aleatoria a fin de tener una representación objetiva del tamaño de la muestra, evitando los bordes de la grilla o

aglomeramientos de partículas que no permiten aplicar un recuento automático. El siguiente paso consistió en establecer la escala de la imagen (relación píxeles/distancia) empleando las herramientas del programa ImageJ.

Para el cálculo de tamaños, primero se convirtió la imagen a formato binario. Utilizando las herramientas del software se realizó un recuento automático de las partículas, excluyendo las partículas que se encontraban sobre los bordes de la imagen (esto se realiza de forma automática con el software).

Se evaluó el comportamiento empleando criterios distintos de circularidad. En todos los casos se impuso una restricción de tamaño mínimo de 1 nm² de área (para evitar el recuento de píxeles aislados), pero no hubo ninguna restricción de tamaño máximo. La circularidad se define según la siguiente expresión:

$$Circularidad = 4\pi (Área/Perímetro^2)$$

Para cada imagen se obtuvieron los mensurandos: área, diámetro de Feret y diámetro mínimo de Feret. La distribución de tamaños de la población se estimó empleando las herramientas estadísticas del software Origin (OriginLab, 2020). Se ajustaron los resultados a una función gaussiana para el cálculo del diámetro equivalente (obtenido a partir del área de cada partícula) y el diámetro de Feret.

Medidas por dispersión de luz (DLS)

Las medidas de las muestras sintetizadas se realizaron en un equipo marca Brookhaven, modelo ZPlus, siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 22412 (International Organization for Standardization, 2017).

Medidas espectrofotométricas (UV-Vis)

Las medidas se realizaron en una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico, en un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-1603, empleando agua ultrapura como blanco, y barriendo el espectro entre 350 nm – 900 nm.

Simulaciones de los espectros de nanopartículas

La simulación de los espectros de las nanopartículas de oro se realizó mediante el software MiePlot v4.6, el cual computó la absorción y la dispersión por sección de una esfera de oro en función de la longitud de onda incidente sobre la nanopartícula. El programa empleó el algoritmo BHMIE para la resolución de las ecuaciones de Mie que describen el comportamiento óptico de los espectros de nanopartículas (Bohren y Huffman, 2004; Laven, 2018). El medio se simuló mediante el algoritmo de Segelstein, que tomó en cuenta la componente real e imaginaria del índice de refracción del agua a diferentes longitudes de onda. (Segelstein, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de comenzar con la comparación de los distintos criterios de medida, lo primero que debemos considerar es la relación entre el objeto real y el mensurando que define su tamaño. En este sentido, no hay que perder de vista que las nanopartículas son cuerpos tridimensionales, mientras que las medidas se basan en mediciones sobre una imagen bidimensional (mediciones por HR-TEM), o bien en la aproximación de este cuerpo a esferas perfectas (medidas por DLS y simulaciones basadas en la teoría de Mie). Esta limitante siempre está presente y debe ser tomada en cuenta a la hora de definir el tamaño de las nanopartículas. Aun cuando el objeto de estudio sea esférico y homogéneo, en cualquiera de las técnicas la determinación del tamaño medido no siempre se correlaciona con el tamaño real de la partícula. A modo de ejemplo, mientras que en la microscopía TEM el tamaño corresponde a la medida de la “sombra” o la proyección de la imagen definida por el núcleo metálico (Figura 1), el diámetro medido por DLS será, en cambio, el diámetro hidrodinámico, definido no solamente por el tamaño del núcleo metálico sino también por la doble capa eléctrica que se genera entre la superficie de la partícula y el seno de la solución. Los cambios en la estructura de la superficie de la nanopartícula y/o en la concentración de electrolitos del medio modifican el tamaño de la doble capa eléctrica y, por tanto, el radio hidrodinámico.

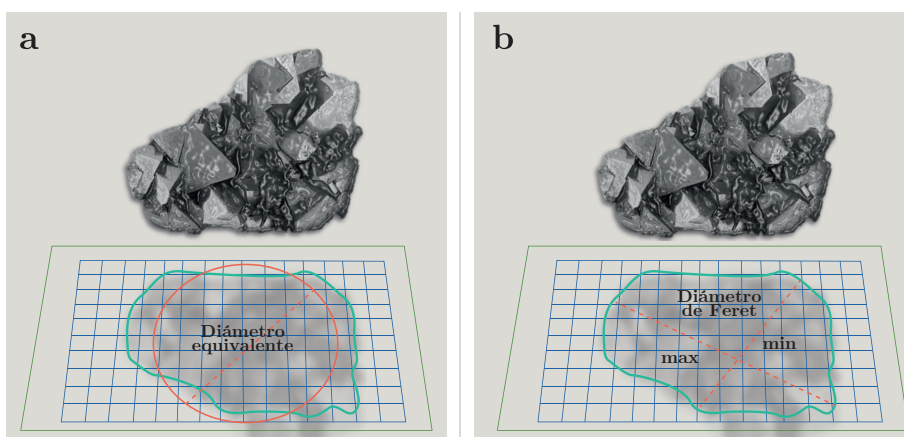


Figura 1. (a) Diámetro equivalente definido como el diámetro del círculo cuya área es igual al área de la proyección de la partícula sobre la pantalla. (b) Diámetro de Feret definido como la distancia entre los dos planos paralelos que restringen el objeto perpendicular a esa dirección. Se define un máximo y mínimo. El diámetro de Feret es el promedio entre el diámetro máximo y mínimo.

La Tabla 1 exhibe la comparación de las medidas por microscopía electrónica sobre una misma muestra, a distintos grados de magnificación y circularidad empleadas en el recuento automático para los dos mensurandos propuestos: el diámetro equivalente y el diámetro de Feret (Figura 1). Para cualquiera de las tres relaciones de tamaño,

al restringir la circularidad el tamaño medio es menor. Este efecto se debe a que, en ausencia de restricciones, el recuento considera no solamente las partículas libres sino también los agregados (Figura 2), mientras que al establecer un valor de circularidad se limita el recuento de estas aglomeraciones. En contrapartida, el número total de nanopartículas decrece de forma considerable. Este efecto incrementa para una magnificación mayor de la imagen (mayor relación píxel/nm), lo cual sugiere que a menor aumento se pierde la información de borde de la partícula y, por lo tanto, aparenta tener una circularidad mayor. El criterio elegido deberá ser dependiente de la relación píxel/nm de la imagen. Tanto el mínimo y máximo tamaño como la circularidad tienen que establecerse cuidadosamente porque influyen directamente en la distribución del tamaño y, por consiguiente, en el diámetro promedio. A su vez, la circularidad depende del área y del perímetro. En el cálculo de este último, cambios en la calidad de la imagen, en la resolución o en el brillo pueden llegar a afectar la circularidad de la partícula y, por tanto, el tamaño medido.

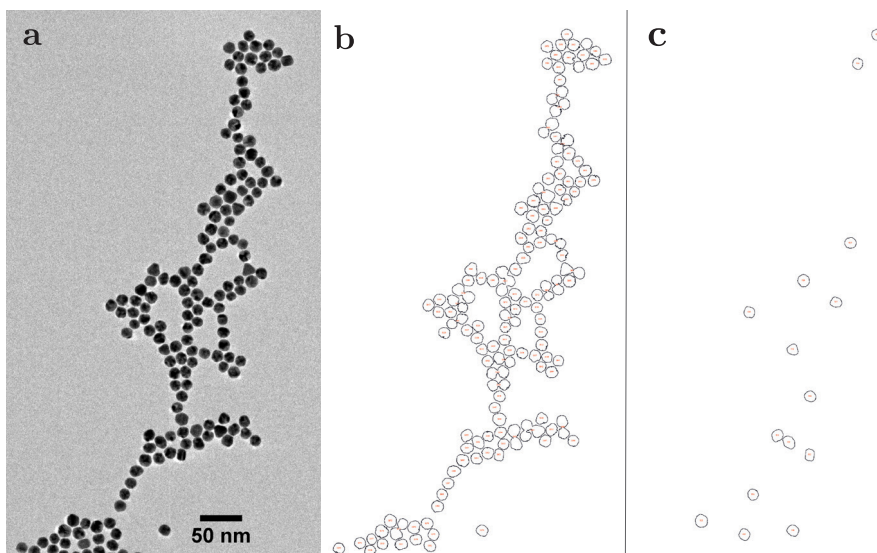


Figura 2. (a) Nanopartículas de oro a 4.0842 píxel/nm y las nanopartículas contadas para una circularidad de (b) 0 y (c) 0.7.

Tabla 1. Recuentos de tamaños de nanopartículas empleando distintos criterios.

Forma de recuento	Número de partículas contadas	Relación de tamaño píxel/nm	Circularidad	Diámetro de Feret promedio (nm)	Desviación estándar (nm)	Diámetro equivalente promedio (nm)	Desviación estándar (nm)	Diámetro de Feret de la distribución (nm)	Desviación estándar (nm)	Diámetro equivalente de la distribución (nm)	Desviación estándar (nm)
Automático	628	9.7718	0	19.50	9.61	15.4	4.90	15.1	1.09	13.4	0.97
Automático	28	9.7718	0.5	14.89	1.03	13.74	0.94	---	---	---	---
Automático	0	---	0.7	---	---	---	---	---	---	---	---
Automático	4356	4.0842	0	20.02	9.94	15.76	5.07	14.32*	1.06*	*12.94	0.89
Automático	2755	4.0842	0.5	14.47	1.36	13.14	1.13	14.27	1.05	12.92	0.90
Automático	750	4.0842	0.7	14.46	1.17	13.26	1.08	14.27	1.03	13.05	0.96
Automático	1585	2.4592	0	16.65	5.35	14.22	2.81	15.07	1.09	13.40	0.97
Automático	1335	2.4592	0.5	15.29	1.25	13.66	1.12	15.16	1.12	13.50	0.10
Automático	269	2.4592	0.7	15.31	1.62	13.81	1.44	15.08	1.11	13.60	1.02
Manual	520	2.4592	---	16.01	1.29	15.19	1.22	15.79	1.30	15.09	1.29

*El recuento automático arrojó 3 poblaciones, debido a que en la imagen aparecen varios grupos de nanopartículas superpuestas. El cálculo de distribución se realizó en función de la población mayoritaria.
 **Los espacios vacíos de la tabla se deben a una alta restricción en la circularidad de las partículas que restringe el número de partículas contadas.

No se encontraron diferencias significativas en los valores calculados a partir de los promedios de tamaños y los valores arrojados de ajustes gaussianos de los histogramas de distribución de tamaño. Sin embargo, cabe destacar que el análisis de la distribución de tamaños permite distinguir la presencia de una o más poblaciones, como es el caso de las medidas sin restricción de circularidad. Sin el dato de circularidad, el análisis de tamaño puede estar considerando los agregados y

no necesariamente partículas individuales. En este sentido, el análisis gráfico de los histogramas provee información sobre la homogeneidad y/o la habilidad del programa para distinguir entre los distintos tamaños (Figura 3).

El recuento manual mostró resultados sin diferencias significativas respecto al recuento automático. Sin embargo, el histograma reflejó cómo los valores vuelcan hacia la derecha de la media, lo cual explicaría por qué algunos autores obtienen ajustes de tipo Log-Normal en lugar de funciones gaussianas (Amendola y Meneghetti, 2009; Brito-Silva, et al., 2013). Si bien la elección del modelo de ajuste depende del análisis sistemático de la bondad de ajuste de los modelos empleados (Rice, et al., 2013), el recuento manual o bien un recuento automático que no tenga ninguna restricción de tamaño o circularidad podrían ser responsables de introducir un sesgo. Para el caso del recuento manual, podría existir una tendencia del analista de sobreestimar el tamaño de las partículas más pequeñas, (Figura 4), siendo que es más sencillo delimitar el perímetro de cada imagen cuanto más grande sean las partículas, pero se dificulta para el caso de partículas pequeñas. Esto podría favorecer el posterior ajuste de distribuciones que puedan presentar ciertas asimetrías, como sucede con el caso de log-normal. Esta observación también ha sido documentada por otros autores (Domingos, et al., 2009).

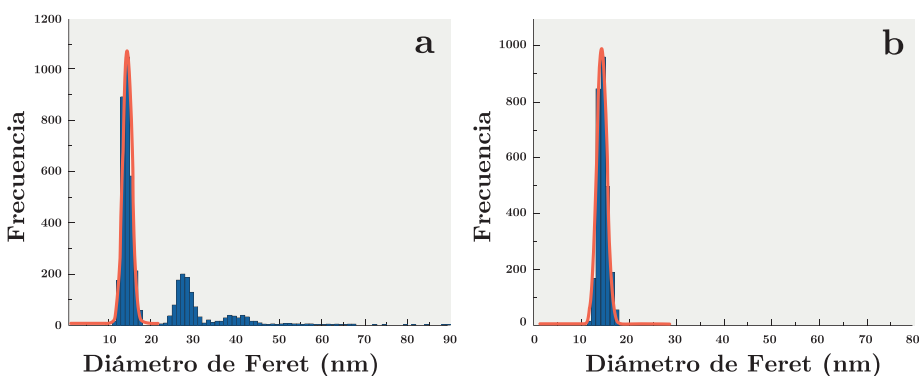


Figura 3. (a) Recuento de nanopartículas sin restricción de tamaño, (b) recuento con un filtro de circularidad de 0.5. La curva naranja representa el ajuste gaussiano.

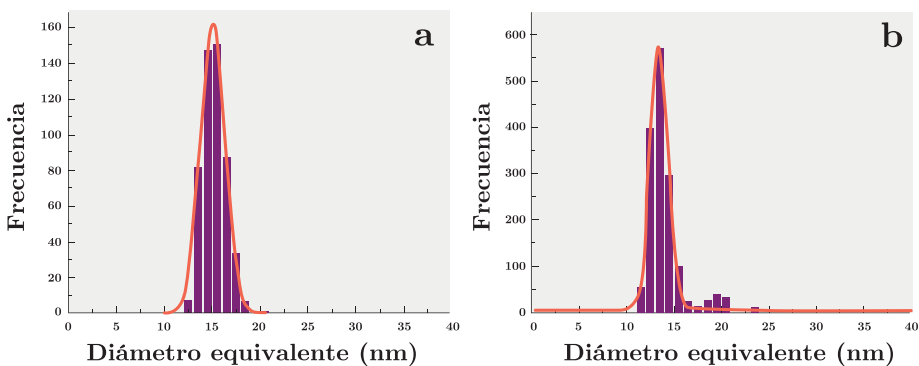


Figura 4. (a) Distribución de nanopartículas mediante el recuento manual y (b) recuento automático realizado para el mismo grado de relación píxel/nm. La curva naranja representa el ajuste gaussiano.

Entre los dos mensurandos ensayados, tanto el diámetro equivalente como el diámetro de Feret (o el promedio de ambos, en el caso que sean medidos) pueden ser empleados para la determinación del tamaño de partícula; aunque para los casos en los cuales no se establece ninguna restricción, el diámetro de Feret es más sensible a la presencia de agregados.

Si bien la medida por TEM es considerada la mejor herramienta para la determinación del tamaño de las partículas, presenta -además de las dificultades mencionadas- un costo considerable tanto en tiempo como en dinero para ser empleada como técnica de rutina. En este sentido, se requieren técnicas más sencillas y rápidas para medir el tamaño de una dispersión coloidal, como las medidas por DLS. Esta última brinda buenos resultados para muestras monodispersas. En particular, los trabajos de Souza y otros (2016) exponen cómo esta técnica arroja valores ligeramente superiores en tamaño a las medidas por TEM, siendo este incremento cercano al 20% de la medida para el caso de muestras homogéneas. En nuestro caso se verifica esta relación (Souza, et al., 2016). La diferencia entre el diámetro efectivo promedio (17.67 nm, Tabla 2) y los valores medidos por HR-TEM es de aproximadamente un 20% de la medida de DLS (14.14 nm). Sin embargo, esta estimación no necesariamente se debe cumplir en todos los casos, y dependerá en gran medida de la presencia o no de agregados y del tamaño de la doble capa eléctrica. No hay que perder de vista que el DLS mide el radio hidrodinámico (Figura 5) y el espesor de la doble capa eléctrica puede variar en función de la carga superficial, el agente de recubrimiento, el pH y la fuerza iónica de la solución.

También es relevante mencionar que para muestras polidispersas, los resultados pueden sobreestimar en mucha mayor medida el tamaño de las partículas (Meli, et al., 2012; Fissan, et al., 2014; Soliwoda, et al., 2015; Eaton, et al., 2017). En contrapartida, dada la alta sensibilidad del DLS para detectar partículas de mayor tamaño, hacen a la técnica útil para la evaluación del grado de homogeneidad de una muestra (Khlebtsov y Khlebtsov, 2011). Si bien las medidas por microscopía electrónica se usan para determinar la homogeneidad de las partículas, se tienen que considerar algunas limitaciones, tales como la dificultad de cuantificar un gran número de partículas o imágenes dudosas debido a la presencia de agregados u orientación de las partículas. Cuando se caracterizan muestras muy homogéneas, otras técnicas que puedan analizar grandes cantidades de nanopartículas son capaces de proporcionar resultados más repetibles.

Tabla 2. Medidas por DLS de las nanopartículas ultra-homogéneas sintetizadas por el método de Turkevich modificado.

Medida	Diámetro equivalente hidrodinámico (nm)	Polidispersión
1	17.98	0.01
2	17.97	0.01
3	17.86	0.03
4	17.62	0.03
5	17.55	0.03
6	17.08	0.03
Promedio	17.67	0.02
Desviación estándar	0.34	0.01

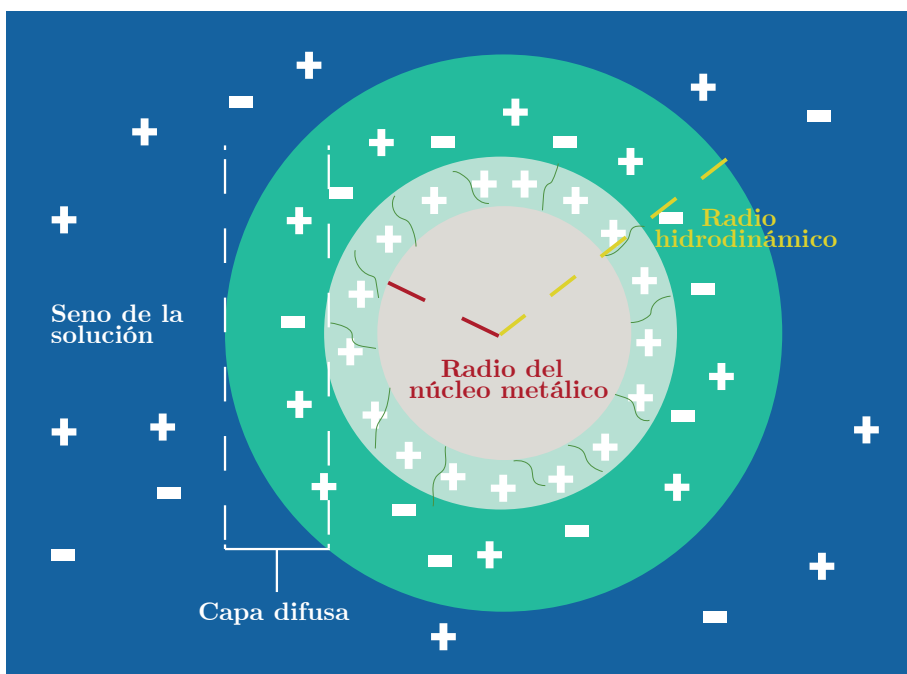


Figura 5. Esquema de la doble capa eléctrica que define el radio hidrodinámico de la nanopartícula entre el núcleo metálico junto con el agente de recubrimiento con sus cargas superficiales y el seno de la solución.

Las nanopartículas de oro son conocidas por tener un efecto de resonancia del plasmón característico, mostrando máximos a ca. 520 nm cuando las nanopartículas se encuentran libres. Sin embargo, dependiendo del tamaño de partícula, las soluciones pueden presentar ligeros corrimientos del máximo debido a cambios en la resonancia del plasmón y a variaciones en el coeficiente de extinción molar (Liu, et al., 2007). La banda de atenuación (absorción + dispersión) puede simularse computacionalmente a partir de las ecuaciones de Mie que describen los espectros de absorción de nanopartículas de oro esféricas. La Figura 6 muestra el espectro de la síntesis de nanopartículas y su comparación con las simulaciones, donde -de acuerdo con la posición del máximo- las nanopartículas tendrían un tamaño inferior a 20 nm de diámetro. Por debajo de este valor no es posible distinguir diferencias significativas. Si bien esta comparación es semi-cualitativa, permite estimar de forma rápida el tamaño de la partícula. Asimismo, los corrimientos de los máximos de absorción son también comúnmente empleados como prueba de la existencia de cambios de ligando al funcionalizar las nanopartículas. (Amendola y Meneghetti, 2009). Estos cambios son de tan solo unos pocos nanómetros, por lo que se debe tener especial cuidado al presentar este tipo de evidencia, y las medidas espectrofotométricas deben hacerse en condiciones de alta sensibilidad.

También es importante mencionar que las medidas simuladas solamente tienen en cuenta poblaciones perfectamente monodispersas, por lo que solo es útil para la caracterización de muestras homogéneas, dado que para poblaciones polidispersas las señales podrán presentar un mayor ancho medio de pico y/o corrimientos en la banda del plasmón, (Hinterwirth, et al., 2013; Shard, et al., 2018). En este caso

particular, la predicción de tamaño por debajo de los 20 nm de diámetro concuerda con los resultados obtenidos por las otras técnicas; sin embargo, estos valores solamente deben ser considerados de forma cualitativa dado que las simulaciones de Mie no muestran corrimientos significativos para tamaños inferiores a los 20 nm, y la posición del máximo también depende del grado de polidispersión de la muestra, por lo que solamente es válido para distribuciones homogéneas.

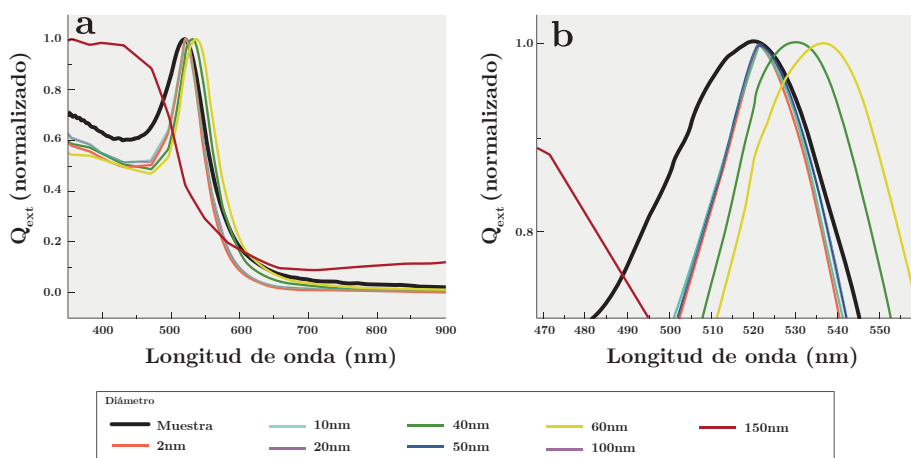


Figura 6. Simulaciones de nanopartículas de oro empleando el programa Mie Plot y su comparación con la síntesis de nanopartículas ultra-homogéneas. Los resultados muestran que de acuerdo con la posición del máximo de absorción la muestra tiene una población cuyo diámetro es inferior a los 20 nm.

CONCLUSIONES

En resumen, tanto la técnica empleada como el procesamiento de los datos son importantes a la hora de determinar el tamaño de las nanopartículas. Diferentes métodos de procesamiento de las imágenes por HR-TEM determinan ligeros corrimientos de tamaños que pueden aumentar significativamente para el caso de muestras complejas. En este sentido, es necesario establecer protocolos que permitan homogeneizar las medidas. El procesamiento automático podría ser una solución, aunque debe estar necesariamente acompañado de un proceso de inspección cualitativo para evitar el recuento de partículas agregadas. La magnificación entendida como la relación distancia/píxel es importante a la hora de reportar el tamaño de las partículas dado que afecta el valor de circularidad.

El uso de otras técnicas de rutina aporta resultados complementarios a las medidas por microscopía electrónica. Particularmente, las medidas por DLS brindan una buena estimación del tamaño para partículas monodispersas de oro recubiertas de citrato de sodio, aunque aún no hay un método consensuado para poder relacionar la medida del radio hidrodinámico con el radio obtenido por microscopía electrónica. Es una técnica sensible a cambios en el grado de polidispersión de la muestra, por lo que puede emplearse para estudiar el grado de homogeneidad, siendo más representativa que las medidas por HR-TEM ya que se trata de un método

de “conjunto”. Por su parte, los análisis por UV-Vis podrían servir como medida primaria y cualitativa para evaluar el tamaño de las partículas, así como también detectar grandes agregados, los cuales podrían interpretarse como partículas más grandes que generarían corrimientos del máximo de absorbancia a longitudes de onda mayores. Sin embargo, nuestros resultados indican que esta técnica no sería adecuada para estimar el tamaño de partículas por debajo de los 20 nm.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la participación del Dr. Eduardo Méndez y del Lic. Pablo Fagúndez por su contribución en la discusión de los resultados. También se agradece al Dr. Ruben Lazos, del Centro Nacional de Metrología de México, cuya iniciativa en realizar ensayos de intercomparación de medidas por microscopía electrónica sirvieron de inspiración para la discusión y realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Amendola, V. y Meneghetti, M., 2009. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. En: *Journal of Physical Chemistry C*, 113(11), pp.4277–4285. <https://doi.org/10.1021/jp8082425>
- Bienert, R., Emmerling, F. y Thünemann, A.F., 2009. The size distribution of “gold standard” nanoparticles. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6), pp.1651–1660. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3049-5>
- Brito-Silva, A.M., Sobral-Filho, R.G., Barbosa-Silva, R., de Araújo, C.B., Galembeck, A. y Brolo, A.G., 2013. Improved synthesis of gold and silver nanoshells. En: *Langmuir*, 29(13), pp.4366–4372. <https://doi.org/10.1021/la3050626>
- Bohren, C. y Huffman, D., 2004. *Absorption and scattering of light by small particles*. Derby: Wiley.
- Domingos, R.F., Baalousha, M., Ju-Nam, Y., Reid, M., Tufenkji, N., Lead, J., Leppard, G. y Wilkinson, K., 2009. Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. En: *Environ Sci Technol*, 43, pp.7277–7284. <https://doi.org/10.1021/es900249m>
- Eaton, P., Quaresma, P., Soares, C., Neves, C., de Almeida, M.P., Pereira, E. y West, P., 2017. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. En: *Ultramicroscopy*, 182, pp.179–190. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>
- Fissan, H., Ristig, S., Kaminski, H., Asbacha, C. y Eppelbc, M., 2014. Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. En: *Analytical Methods*, 6(18), pp.7324–7334. doi: <https://doi.org/10.1039/c4ay01203h>

- International Organization for Standardization, 2017. ISO 22412: *Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)*. Ginebra: ISO.
- Hinterwirth, H., Wiedmer, S., Moilanen, M., Lehner, A., Allmaier, G., Waitz, T., Lindner, W. y Lämmerhofer, M., 2013. Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles. En: *Journal of Separation Science*, 36(17), pp.2952–2961. doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201300460>.
- Khlebtsov, B.N. y Khlebtsov, N.G., 2011. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. En: *Colloid Journal*, 73(1), pp.118–127. doi: <https://doi.org/10.1134/S1061933X11010078>
- Laven, P., 2018. *MiePlot* [En línea]. [s.l.]: [s.n.]. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J. y Huo, Q., 2007. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), pp.3–7. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.005>
- Meli, F., Klein, T., Buhr, E., Frase, C., Gleber, G., Krumrey, M., Duta, A., Duta, S., Korpelainen, V., Bellotti, R., Picotto, G., Boyd, R. y Cuenat, A., 2012. Traceable size determination of nanoparticles, a comparison among European metrology institutes. En: *Measurement Science and Technology*, 23(12). doi: <https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/12/125005>
- Méndez, Eduardo y Botasini, Santiago, 2019. Synthesis of ultra-homogeneous gold nanoparticles. En: *Proceedings of the World Congress on New Technologies*, (NewTech'19). Lisboa: International ASET. pp. 11159. DOI: <https://doi.org/10.11159/icnfa19.152>.
- Minelli, C., Bartczak, D., Peters, R., Rissler, J., Undas, A., Sikora, A., Sjöström, E., Goenaga-Infante, H. y Shard, A., 2019. Sticky measurement problem: number concentration of agglomerated nanoparticles. En: *Langmuir*, 35(14), pp.4927–4935. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04209>
- National Institutes of Health y Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, 2019. *ImageJ* [En línea]. Versión 1-8-0_112. Bethesda: NIH. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>
- Nelson, B.C., Atha, D., Elliott, J., Marquis, B., Petersen, E., Cleveland, D., Watson, S., Tseng, I., Dillon, A., Theodore, M. y Jackman, J., 2013. NIST gold nanoparticle reference materials do not induce oxidative DNA damage. En: *Nanotoxicology*, 7(1), pp.21–29. doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.626537>.

OriginLab, 2020. *Origin Lab* [En línea]. Northampton: Originlab. [Consulta: 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.originlab.com/>

Rasmussen, K., Rauscher, H., Mech, A., Riego Sintés, J., Gilliland, D., Gonzales, M., Kearns, P., Moss, K., Visser, M., Groenewold, M. y Bleeker, E.A.J., 2018. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. En: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, pp.8-28.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.019>

Rice, S.B., Chan, C., Brown, S.C., Eschbach, P., Han, L., Ensor, D.S., Stefaniak, A.B., Bonevich, J., Vladár, A. E., Hight Walker, A.R., Zheng, J., Starnes, C., Stromberg, A., Ye, J. y Grulke, E.A., 2013. Particle size distributions by transmission electron microscopy: an interlaboratory comparison case study. En: *Metrologia*, 50(6), pp.663–678. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/50/6/663>

Rogers, K.R., Navratilova, J., Stefaniak, A., Bowers, L., Knepp, A., Al-Abed, S., Potter, P., Gitipour, A., Radwan, I., Nelson, C. y Bradham, K., 2018. Characterization of engineered nanoparticles in commercially available spray disinfectant products advertised to contain colloidal silver. En: *Science of the Total Environment*, 619–620, pp.1375–1384.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.195>

Segelstein, D., 1981. *The complex refractive index of water*. Kansas City: University of Missouri.

Shard, A.G., Wright, L. y Minelli, C., 2018. Robust and accurate measurements of gold nanoparticle concentrations using UV-visible spectrophotometry. En: *Biointerphases*, 13(6), p.061002. <https://doi.org/10.1116/1.5054780>

Soliwoda, K., Rosowski, Marcin, Tomaszewska, Emilia, Tkacz-Szczesna, Beata, Celichowski, Grzegorz, Psarski, Maciej y Grobelny, Jaroslaw, 2015. Synthesis of monodisperse gold nanoparticles via electrospray-assisted chemical reduction method in cyclohexane. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, pp.148–153. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.04.040>

Souza, T.G.F., Ciminelli, V.S.T. y Mohallem, N.D.S., 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. En: *Journal of Physics: Conference Series*, 733(1).
doi: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>.

Tanaka, L.S., 2019. Regulación blanda, normas técnicas y armonización regulatoria internacional, para la nanotecnología. En: *Mundo Nano*, 13(24), pp.1-27.
<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2020.24.69621>

Turkevich, J., 1985. Colloidal gold. Part II. En: *Gold Bull*, 18, pp.125–131.
<https://doi.org/10.1007/BF03214694>