

Fabricación y estudio estadístico para manipular tamaño y estabilidad de nanopartículas de oro esféricas

Katerine Belalcazar Zapata¹, José Luis Enríquez Carrejo¹, Rey David Molina Arredondo¹,
Jorge Flores Garay¹ y Delfino Cornejo Monroy¹

¹ Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Resumen

Las nanoestructuras de oro presentan extraordinarias propiedades ópticas, químicas y físicas. Dichas propiedades son manipulables con base en el tamaño, composición, distancia interpartícula, propiedades del medio y forma de las nanoestructuras. La finalidad del presente trabajo es identificar a través del diseño experimental los factores con efectos estadísticamente significativos para manipular el tamaño y estabilidad de nanopartículas de oro esféricas (NPs de Au@LA) y optimizar los niveles de los factores significativos de las NPs fabricadas por el método coloidal, usando cloruro de oro como precursor, borohidruro de sodio como reductor y ácido lipoico como estabilizador. Se eligió un DOE fraccionado para determinar el efecto de cuatro variables del proceso: velocidad de agitación (rpm), temperatura (T), orden de adición del ácido lipoico (AL) y relación de moles reductor/precursor (RRP), obteniendo como resultado del análisis de la varianza suficiente evidencia para decir que la T y el RRP tienen un efecto significativo en las variables de respuesta, luego estos factores se estudiaron en un diseño central compuesto para encontrar la configuración que optimiza las respuestas, el modelo predijo que para obtener NPs de 2 nm y estables el nivel de los RRP debían ser de 6.9794 y una T de 24°C, se fabricaron las NPs de Au@LA con estos parámetros y fueron sometidas a caracterización por espectroscopia ultravioleta-visible, espectroscopia de correlación de fotones para evaluar el tamaño y adición de cloruro de sodio para acelerar la desestabilidad, dando como resultado que los parámetros predichos por el modelo son válidos para obtener NPs de Au@LA con tamaño de 2nm y altamente estables.

Palabras clave: nanotecnología, nanopartículas de oro, diseño de experimentos.

Introducción

La nanociencia y la nanotecnología se encargan del estudio, desarrollo y aplicación de materiales a escala nanométrica (Pitkethly, 2004), específicamente de materiales con al menos una dimensión longitudinal menor a los 100 nm. (Takeuchi, 2009) Lo extraordinario de la nanotecnología radica en que los materiales en bulto a escala

nanométrica presentan nuevas y novedosas propiedades (Pitkethly, 2004). En los últimos años se ha presentado un gran interés en el diseño y estudio de nanopartículas (NPs) de oro, por un lado, son las NPs metálicas más estables (Daniel & Astruc, 2004), pero más relevante, debido a su gran potencial para aplicaciones en diversas áreas tales como

las biológicas y biomédicas, sensores y catálisis. Las NPs de oro se pueden bioconjugarse con diversos ligandos, tal como ADN, péptidos y anticuerpos a través de enlaces covalentes y no covalentes para obtener propiedades novedosas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer (X. Huang, Jain, El-Sayed, & El-Sayed, 2007). En aplicaciones biomédicas, específicamente para el tratamiento y diagnóstico del cáncer, las nanopartículas de oro pequeñas (menores a 10 nm), han demostrado mejores resultados de penetración y acumulación en tumores cancerígenos, lo cual favorece el transporte de fármacos y la biodisponibilidad de los tratamientos (K. Huang et al., 2012). Al modificar la capa superficial de las NPs con diferentes moléculas orgánicas, estas se vuelven viables para aplicaciones como biosensores dándoles una gran sensibilidad (Elghanian, Storhoff, Mucic, Letsinger, & Mirkin, 1997). Los biosensores basados en NPs de oro han demostrado mejor sensibilidad que los métodos comerciales, un ejemplo es el biosensor para la detección de la salmonela (Afonso et al., 2013). Además, las NPs de oro presentan actividad catalítica (Anand et al., 2013), la cual tiene una gran dependencia del tamaño (Chen, Cai, Yan, & Goodman, 2006). Esta dependencia del tamaño también se ha observado en sus propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas (Nie, Petukhova, & Kumacheva, 2010). No obstante, y a pesar que el oro nanoestructurado es uno de los materiales más comunes, no hay numerosos reportes que indiquen claramente cuales factores del proceso de fabricación tienen un efecto significativo sobre el tamaño y estabilidad de las nanopartículas de oro. Aunado a lo

anterior, para la aplicación exitosa de cualquier nanomaterial en cualquier campo tecnológico, se debe tener un control preciso en las propiedades físicas y químicas de las nanoestructuras y como lo hemos mencionado con anterioridad las propiedades estructurales del oro a escala nanométrica, al igual que todos los nanomateriales dependen fuertemente de tamaño, composición, distancia interpartícula, propiedades del medio y forma (Kelly, Coronado, & Zhao, 2003) Por esta razón es importante conocer los factores que tienen un efecto significativo para controlar estas propiedades estructurales y darles a las NPs una aplicación deseada.

El diseño experimental permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental (Montgomery, 2014), en este artículo se presentará la síntesis de NPs de Au@LA esféricas, usando cloruro de oro (AuCl_3) como precursor, borohidruro de sodio NaBH_4 como agente reductor y ácido lipoico $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$ para la estabilización, se estudiarán cuatro factores que intervienen en el proceso de fabricación de las NPs de Au@LA (velocidad de agitación, temperatura, orden de adicción del ácido lipoico y relación de moles reductor/precursor) en un diseño factorial fraccionario para determinar cuál de estos cuatro factores tienen un efecto estadísticamente significativo en el tamaño y la estabilidad, ya que de acuerdo a Montgomery (Montgomery, 2014), este tipo de experimento son uno de los más utilizados para identificar los factores críticos de un proceso. Posteriormente los factores con efectos significativos en la

variable de respuesta de interés se estudiarán en un experimento de optimización (diseño central compuesto) para obtener un modelo matemático que prediga la mejor configuración para los factores significativos para fabricar NPs de Au@LA con tamaño menor a 10nm y

altamente estables, se validará la respuesta pronosticada utilizando métodos de caracterización como son el espectrofotómetro UV-Vis y espectrofotometría de correlación de fotones.

Materiales

Solución de cloruro de oro (AuCl_3) al 1% base metal y con 99.99% de pureza de Salt Lake Metals, borohidruro de sodio (NaBH_4), ácido lipoico ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$); estos dos últimos de Sigma-Aldrich[®]. Sal de mesa (NaCl) y alcohol etílico al 96% de alcoholes de Guadalajara S.A de C.V. Todos los reactivos fueron empleados tal como se recibieron y los accesorios utilizados para la reacción fueron lavados tenazmente con detergente en polvo Alconox[®] y agua desionizada antes de ser utilizados.

Parrilla de agitación y calentamiento con termómetro marca Corning[®], balanza analítica Ohaus[®] 65gx0.0001g, purificador de agua WaterPro PS Labconco[®] 18.2 M Ω cm, espectrofotómetro UV-Vis de un solo haz con rango de 190 a 1100 nm \pm 1, 0.5 nm adquirido a la empresa Zhejiang Holdwell Group Limited, analizador de nano partículas SZ-100 Horiba[®]. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab[®] 16.

Métodos

Método experimental

Basado en la metodología de “abajo hacia arriba” y específicamente en el método coloidal se sintetizaron y estabilizaron nanopartículas de oro, tomando como base la metodología propuesta por D. Cornejo y colaboradores (Trejo-Durán, Cornejo-Monroy, Alvarado-Méndez, Olivares-Vargas, & Castano, 2014).

Fabricación de NPs de Au@LA

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se colocaron 50 ml de agua desionizada con

450 μ L de AuCl_3 y se puso en agitación vigorosa; esta solución se puso en baño maria para mantener una temperatura constante, una vez alcanzada la temperatura se adicionó NaBH_4 . Finalmente se adicionó 0.007 g de $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$ como agente estabilizador. Con este procedimiento se obtuvieron NPs de Au@LA. Es importante resaltar que a lo largo de la experimentación se realizaron cambios en algunos de los parámetros de fabricación; la velocidad de agitación, la temperatura de la solución, el orden de adición de el estabilizador se agregó en

algunas corridas experimentales antes del reductor y en otras se agregó después del reductor y la relación moles reductor/precursor también fue variada.

Método para el diseño y análisis experimental

Diseño del Experimento de exploración

Se estudió el efecto de cuatro factores que están presentes en el proceso de fabricación de las NPs de Au@LA: velocidad de agitación (rpm), relación molar reductor/precursor (RRP), temperatura (T) y orden de adición del ácido lipoico (AL). Estos factores se estudiaron inicialmente en un diseño de experimentos tipo exploratorio;

específicamente en un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} , cada factor en el diseño fue variado en dos niveles (ver tabla 1) y se emplearon dos puntos centrales, uno para T y otro para el AL. Los puntos centrales ofrecen protección contra la curvatura de los efectos de segundo orden y al mismo tiempo permiten evaluar el error experimental (Montgomery, 2014). El diseño experimental consistió de 24 corridas (ver tabla 2), la matriz se diseñó en el programa Minitab 16[®]; el orden en que se realizaron las corridas fue de forma aleatorizada y las variables de respuesta que se evaluaron fueron el tamaño en nm y la razón de estabilidad de las NPs a los 30 días.

Tabla 1. Factores y niveles empleados para el DOE fraccionado

Factores	Niveles
Velocidad de agitación (rpm)	baja, alta
Temperatura, °C (T)	5, 25, 45
Orden de adición del ácido lipoico (orden AL)	Antes, después
Relación moles reductor/precursor (RRP)	1, 7, 14

Tabla 2. Matriz del diseño factorial fraccionado, con 4 factores del proceso de fabricación de NPs de Au@LA

Corrida	Orden	rpm	T	AL	RRP
13	1	bajo (-1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
16	2	alto (1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
15	3	bajo (-1)	25 (0)	después (1)	7 (0)

2	4	alto (1)	5 (-1)	antes (-1)	13 (1)
12	5	alto (1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
14	6	alto (1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
8	7	alto (1)	45 (1)	después (1)	13 (1)
11	8	bajo (-1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
6	9	alto (1)	5 (-1)	después (1)	1 (-1)
20	10	alto (1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
7	11	bajo (-1)	45 (1)	después (1)	1 (-1)
24	12	alto (1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
1	13	bajo (-1)	5 (-1)	antes (-1)	1 (-1)
21	14	bajo (-1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
4	15	alto (1)	45 (1)	antes (-1)	1 (-1)
3	16	bajo (-1)	45 (1)	antes (-1)	13 (1)
9	17	bajo (-1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
17	18	bajo (-1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
19	19	bajo (-1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
18	20	alto (1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
23	21	bajo (-1)	25 (0)	después (1)	7 (0)
10	22	alto (1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
22	23	alto (1)	25 (0)	antes (-1)	7 (0)
5	24	bajo (-1)	5 (-1)	después (1)	13 (1)

Análisis del experimento de exploración

Se analizaron los datos experimentales en el programa Minitab® 16, se utilizaron los valores-*p* de la tabla de análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés “ANalysis Of VAriance”) para

determinar cuáles de los factores en el modelo tienen un efecto estadísticamente significativo, se manejó un nivel de confianza del 90% (correspondiendo a un valor de α de 0.1), el valor-*p* que se obtuvo por factor se comparó con el nivel α , los

factores con valor- p menor que α , fueron considerados estadísticamente significativos; así también se analizó la tabla de efectos y coeficientes estimados para determinar la fortaleza relativa de los efectos y se utilizó el coeficiente estadístico de determinación (R^2) y el ajustado (R^2) para determinar la proporción de variación en los datos de respuesta explicada por los términos del modelo. La gráfica de efectos de Pareto fue utilizada para comparar la magnitud relativa y la significancia estadística tanto de los efectos principales como de interacción. La gráfica de residuos se empleó para evaluar si el modelo era adecuado y cumplía con los supuestos del error (los errores son independientes, asimétricos, normales, varianza constante y valor promedio del error es cero)

Diseño del experimento de optimización

Para encontrar la configuración que optimice la respuesta de los factores con efectos significativos en las variables de salida de interés, se utilizó un diseño central compuesto. Cada factor en el diseño fue variado a 5 niveles diferentes ($-\sqrt{2}$, -1 , 0 , 1 , $\sqrt{2}$) (ver tabla 3). Se diseñó la matriz de experimentación en el

software Minitab 16[®], el diseño del experimento para la optimización se compuso de 13 corridas (ver tabla 4). Las corridas se llevaron a cabo de forma aleatorizada durante la experimentación. Para reducir el tamaño de las NPs de Au@LA y aumentar la estabilidad se utilizó el modelo ajustado de segundo orden que permite incorporar la curvatura para aproximar la respuesta. (Montgomery, 2014) El polinomio de segundo orden es el siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde y es el tamaño o la estabilidad de las nanopartículas que predice el modelo, β_0 es el coeficiente de regresión constante que representa la respuesta media cuando todas las variables codificadas son cero, β_i es el coeficiente lineal que indica un incremento en la respuesta y cuando x_i aumenta en una unidad, β_{ii} es el coeficiente de regresión cuadrático y β_{ij} es el coeficiente de regresión que denota la interacción entre la variable x_i y la variable x_j (para valores de i diferentes de j) y x_i es el nivel codificado de la variable independiente.

Tabla 3. Factores y niveles empleados para el diseño central compuesto

Factores	Niveles
Temperatura, °C (T)	11, 15, 25, 35, 39
Relación moles reductor/precursor (RRP)	3.5, 4.5, 7, 9.5, 10.5

Tabla 4. Matriz del diseño central compuesto, con 2 factores del proceso

de fabricación de NPs de Au@LA

Corrida	Orden	T	RRP
2	1	35 (1)	4.5 (-1)
12	2	25 (0)	7 (0)
6	3	39 (1.414)	7 (0)
11	4	25 (0)	7 (0)
1	5	15 (-1)	4.5 (-1)
5	6	11 (-1.414)	7 (0)
9	7	25 (0)	7 (0)
4	8	35 (1)	9.5 (1)
10	9	25 (0)	7 (0)
13	10	25 (0)	7 (0)
8	11	25 (0)	10.5 (1.414)
3	12	15 (-1)	9.5 (1)
7	13	25 (0)	3.46 (-1.414)

Análisis del experimento de optimización

Se analizaron los datos experimentales en el programa Minitab® 16 para analizar la varianza; se utilizaron los valores-*p* de las pruebas F y de las pruebas T para buscar todos los efectos lineales, cuadráticos y de interacción; se utilizó un nivel de confianza del 90% (correspondiendo a un valor de α de 0.1), Los efectos individuales se determinaron utilizando la tabla de regresión, esta misma tabla ofreció para cada termino en el modelo un coeficiente para construir la ecuación (1) que representa la relación entre la respuesta y los factores , R^2 y R^2 ajustado permitieron

determinarla la calidad de ajuste del modelo de regresión, fue utilizada la gráfica de optimización para evaluar la forma en que los factores afectan la respuesta pronosticada y la gráfica superpuesta de contornos para evaluar conjuntamente las múltiples respuestas del experimento e identificar las mejores configuraciones de los factores para optimizar la respuesta.

Métodos de Caracterización de las NPs de Au@LA

Espectrofotómetro UV-Visible

Se analizó la absorbancia de las NPs de Au@LA en un rango de 250 a 1000 nm utilizando una celda de cuarzo de 3.5 ml y con un paso de luz de 10 mm. Con base en la metodología propuesta por W. Haiss y colaboradores (Haiss, Thanh, Aveyard, & Fernig, 2007) se calculó el tamaño de partícula en nanómetros a partir de la relación que hay entre la máxima absorbancia correspondiente a la resonancia de plasmón superficial (A_{spr}) y la Absorbancia a 450 nm empleando la siguiente ecuación:

$$d = \exp(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2)$$

Ecuación 2

Donde los valores usados para B_1 y B_2 fueron 3.00 y 2.20 respectivamente. El cálculo del diámetro de partícula usando esta ecuación da como resultado una desviación promedio del ~11%. Se utilizó el software OriginPro[®] versión 8 para graficar los datos de absorbancia arrojados por el espectrofotómetro UV- Vis y determinar los valores de A_{spr} y A_{450} . Para calcular el tamaño de NPs de Au@LA con tamaño (>25nm) se utilizó la máxima longitud de onda correspondiente a la resonancia de plasmón superficial (λ_{spr}) y se utilizó la siguiente ecuación:

$$d = \frac{\ln\left(\frac{\lambda_{spr}-\lambda_0}{L_1}\right)}{L_2}$$

Ecuación 3

Donde los valores usados para λ_0 , L_1 y L_2 fueron 512, 6.53 y 0.0216 respectivamente.

Espectroscopia de correlación de fotones

El tamaño de las NPs fue evaluado en el espectrofotómetro de correlación de

fotones (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering") utilizando una celda de cuarzo de 3.5 ml con dos caras transparentes. El coloide fue diluido diez veces en agua. La luz dispersada fue detectada en un ángulo de 173°.

Evaluación de la estabilidad de las NPs de Au@LA

Para cuantificar la razón de estabilidad de las NPs fabricadas durante cada corrida experimental, se estimó el tamaño de partícula a partir de los espectros de absorbancia obtenidos por espectroscopia UV-Vis y usando la metodología propuesta por W. Haiss y colaboradores (Haiss et al., 2007). Para acelerar la desestabilización de las NPs de Au@LA se utilizó NaCl. Al coloide obtenido de NPs de Au@LA se le adicionó NaCl hasta una concentración del 10%. Después de un número de días establecido se midió nuevamente el tamaño y se calculó el porcentaje de inestabilidad a partir de la siguiente ecuación:

$$\left(1 - \frac{T_f - T_i}{T_i}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde T_f es el tamaño final de las NPs de Au@LA con 10% de NaCl a un tiempo n y T_i es el tamaño inicial de las NPs de Au@LA sin NaCl recién fabricadas.

Resultados y discusión

La NPs de Au@LA fabricadas a lo largo de toda la experimentación presentaron diferentes cambios a medida que se variaban los parámetros de experimentación, un ejemplo de ello es la coloración de las NPs, (ver figura 1) donde se puede observar cinco diferentes colores:

amarillo claro, café oscuro, rojo intenso, rojo y morado azul; así también se puede observar que algunas NPs presentaron un

comportamiento coloidal y otras agregados y sedimentos.



Figura 1. NPs de Au@LA fabricadas a diferentes parámetros de experimentación

Diseño del Experimento de exploración

A continuación se puede observar en la tabla 5 la matriz obtenida, conformada de 24 corridas a partir del diseño factorial

fraccionado 2^{4-1} con sus diferentes combinaciones de rpm, T, AL y RRP. Así también se presentan las dos variables de respuesta: el tamaño y la razón de estabilidad.

Tabla 5. Matriz del diseño factorial fraccionado, mostrando los factores y niveles empleados y las variables de respuesta

Corrida	rpm	T	AL	RRP	Tamaño	Estabilidad
1	bajo	5	antes	1	*	*
2	alto	5	antes	13	*	*
3	bajo	45	antes	13	*	*
4	alto	45	antes	1	*	*
5	bajo	5	después	13	35.31	0.37
6	alto	5	después	1	76.39	0.41
7	bajo	45	después	1	125.87	0.75
8	alto	45	después	13	41.49	0.32
9	bajo	25	antes	7	*	*
10	alto	25	antes	7	*	*
11	bajo	25	después	7	2.38	0.92
12	alto	25	después	7	2.33	0.91
13	bajo	25	antes	7	*	*
14	alto	25	antes	7	*	*
15	bajo	25	después	7	2.40	0.93

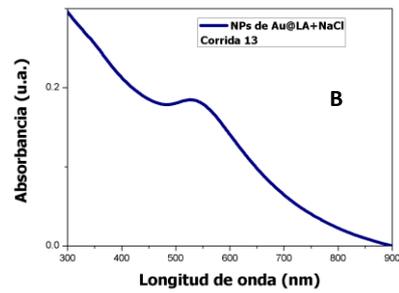
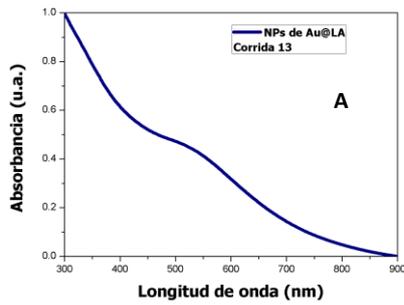
16	alto	25	después	7	2.79	1.00
17	bajo	25	antes	7	*	*
18	alto	25	antes	7	*	*
19	bajo	25	después	7	2.43	0.92
20	alto	25	después	7	2.48	0.95
21	bajo	25	antes	7	*	*
22	alto	25	antes	7	*	*
23	bajo	25	después	7	2.22	0.91
24	alto	25	después	7	2.25	0.91

Las variables de respuesta que se presentan en la tabla 5 se puede observar en la columna de resultados (tamaño y estabilidad) un asterisco (*), representando que el resultado de la corrida no es cuantificable utilizando la metodología de W. Haiss y colaboradores, (Haiss et al., 2007) dado que en estos resultados el espectro de las NPs el pico correspondiente al A_{Spr} no es muy notable.

Análisis estadístico del experimento exploratorio

Las corridas que se realizaron con el factor AL en el nivel “antes” y que en la tabla 5 presentan un signo * en la columna de resultados (tamaño y estabilidad) no fue posible cuantificar la variable de respuesta, porque el espectro de las NPs no presentaban pico notable en el A_{Spr} . Creemos que las NPs que se les adicionó el estabilizador en el nivel “antes” tienen un tamaño menor a los 2 nm; dado que los

espectros obtenidos no presentan un A_{Spr} notable como se puede observar en la figura 2A; además estos espectros se parecen a los presentados en el artículo de O. Varnavski y colaboradores (Varnavski, Ramakrishna, Kim, Lee, & Goodson, 2009) los espectros que se presentan en la figura 2A pertenecen a NPs extremadamente pequeñas; incluso es posible contar el número de átomos; así también se observa en la figura 2B el espectro de las NPs después de 60 días de haberles realizado la prueba de estabilidad descrita en el apartado 2.3.3. se ilustra un cambio en el espectro haciendo notable el rango A_{Spr} , lo cual permitió cuantificar el tamaño con la metodología de W. Haiss y colaboradores (Haiss et al., 2007); el resultado de estas mediciones dio como resultado NPs mayor que 2 nm, lo cual infiere que las NPs fabricadas con el factor AL en el nivel “antes” el tamaño es menor a 2nm.



El resultado de las 12 corridas del diseño factorial fraccionado de la tabla 5 que si fue posible cuantificar las variables de respuestas (tamaño y estabilidad) se proyectó en un diseño fraccionario más pequeño para poder someter el modelo a Figura 2. Espectros de absorción para las NPs de Au@LA de la corrida 13 A) NPs sintetizadas con orden de adición del ácido lipoico antes del reductor, donde el

un análisis de la varianza y evaluar si el factor rrp, T, RRP tienen un efecto significativo en el tamaño y estabilidad de las NPs de Au@LA; los resultados que se estudiaron en la tabla 6 tienen constante el factor AL en el nivel “después”.

pico del A_{Spp} no es obvio, B) espectro después de 60 días de realizar prueba de estabilidad, las NPs presentan un λ_{Spp} en 526nm.

Tabla 6. Matriz del Diseño factorial fraccionado $2^{(3-1)}$, con el factor AL constante en el nivel “después”

Orden	Orden				
	Corrida rpm	T	RRP	Tamaño	Estabilidad
1	Bajo	5	13	35.31	0.37
2	Alto	5	1	76.39	0.41
3	Bajo	45	1	125.87	0.75
4	Alto	45	13	41.49	0.32
5	Bajo	25	7	2.38	0.92
6	Alto	25	7	2.33	0.91
7	Bajo	25	7	2.40	0.93
8	Alto	25	7	2.79	1.00
9	Bajo	25	7	2.43	0.92
10	Alto	25	7	2.48	0.95
11	Bajo	25	7	2.22	0.91
12	Alto	25	7	2.25	0.91

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo de regresión para el tamaño de la tabla 7 demuestra que el modelo es muy apropiado, como evidencia la prueba F de Fisher (35.94) y un valor de probabilidad muy bajo (0.000); así también es evidente para la curvatura, la prueba de F de Fisher (268.23) y un valor p (0.000).

La significancia de cada coeficiente fue evaluada por la prueba *t* de Student y el

valor P de la tabla 8 los valores P para los dos efectos principales sobre el tamaño de las NPs de Au@LA son menores que 0.1 (T = **0.004** y RRP = **0.000**). Por lo tanto, existe evidencia de un efecto significativo; en la figura 3 se ilustra en una gráfica de Pareto el orden de significancia estadística de cada factor de forma decreciente; la línea de referencia en la gráfica indica cuáles efectos son significativos.

Tabla 7. Análisis de varianza para tamaño, DOE fraccionado

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Suma de Cuadrados ajustado	Cuadrado medio	F	P
--------	--------------------	-------------------	----------------------------	----------------	---	---

Efectos principales	3	4862.8	4862.8	1620.9	35.94	0.000
Curvatura	1	12097.9	12097.9	12097.9	268.23	0.000
Error residual	7	315.7	315.7	45.1		
Total	11	17276.4				

Tabla 8. Efectos y coeficientes estimados para tamaño, DOE fraccionado

Término	Efecto	Coefficiente	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante		69.77	3.358	20.78	0.000
rpm	-7.15	-3.57	1.939	-1.84	0.108
T	27.83	13.91	3.358	4.14	0.004
RRP	-62.73	-31.37	3.358	-9.34	0.000
Punto Central		-67.36	4.113	-16.38	0.000

R-cuadrada = 98.17%

R-cuadrada(ajustado) = 97.13%

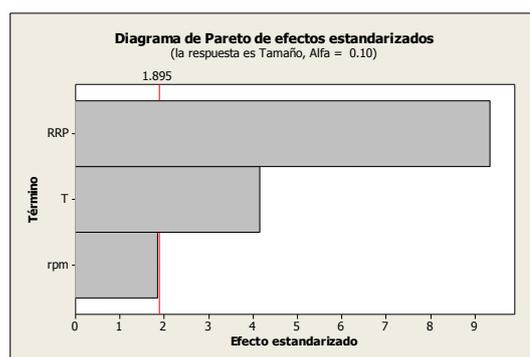


Figura 3. Diagrama de efectos de Pareto para el tamaño de NPs de Au@LA

Los valores R^2 y R^2 ajustado en la tabla 9 representan la proporción de variación en los datos de respuesta explicada por los términos del modelo; para los datos sobre

tamaño, R^2 es de 97.29% y el valor R^2 ajustado es de 96.27% por lo que hay evidencia para decir que el modelo explica muy bien la variación en la respuesta.

Tabla 9. Efectos y coeficientes estimados para tamaño, sin incluir factores con efectos no significativos.

Término	Efecto	Coeficiente	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante		69.76	3.828	18.22	0.000
T	27.83	13.92	3.828	3.63	0.007
RRP	-62.73	-31.36	3.828	-8.19	0.000
Punto central		-67.35	4.688	-14.37	0.000
R-cuad. = 97.29%		R-cuad.(ajustado) = 96.27%			

El análisis de varianza (ANOVA) del modelo de regresión para la estabilidad de la tabla 10 demuestra que el modelo es apropiado, como evidencia la prueba F de Fisher (5.25) y un valor de probabilidad bajo (0.033); Así también es evidente para la curvatura, la prueba de F de Fisher (110.22) y un valor p (0.000).

Los valores P de la tabla 11 para los dos efectos principales sobre estabilidad de las NPs de Au@LA son menores que 0.1 (T = **0.087** y RRP = **0.015**). Por lo tanto, existe evidencia de un efecto significativo.

Tabla 10. Análisis de varianza para estabilidad, DOE fraccionado

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Suma de Cuadrados ajustado	Cuadrado medio	F	P
Efectos principales	3	0.083750	0.083750	0.027917	5.25	0.033
Curvatura	1	0.585938	0.585938	0.585938	110.22	0.000
Error residual	7	0.037212	0.037212	0.005316		

Total	11	0.706900
--------------	----	----------

Los valores R^2 y R^2 ajustado en la tabla 12 representan la proporción de variación en los datos de respuesta explicada por los términos del modelo; para los datos sobre

estabilidad, R^2 es de 93.67% y el valor R^2 ajustado es de 91.30% por lo que hay evidencia para decir que el modelo explica muy bien la variación en la respuesta.

Tabla 11. Efectos y coeficientes estimados para estabilidad, DOE fraccionado

Término	Efecto	Coficiente	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante		0.4625	0.03646	12.69	0.000
Rpm	-0.0500	-0.0250	0.02105	-1.19	0.274
T	0.1450	0.0725	0.03646	1.99	0.087
RRP	-0.2350	-0.1175	0.03646	-3.22	0.015
Punto Central		0.4688	0.04465	10.50	0.000
R-cuad. = 94.74%			R-cuad.(ajustado) = 91.73%		

Tabla 12. Efectos y coeficientes estimados para estabilidad, sin incluir factores con efectos no significativos

Término	Efecto	Coefficiente	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante		0.4625	0.03738	12.37	0.000
T	0.1450	0.0725	0.03738	1.94	0.088
RRP	-0.2350	-0.1175	0.03738	-3.14	0.014
Punto central		0.4687	0.04578	10.24	0.000
R-cuad. = 93.67%		R-cuad.(ajustado) = 91.30			

A partir del diseño factorial fraccionado 2^{3-1} se puede concluir que los factores T y RRP presentan un efecto estadísticamente significativo tanto para el tamaño de las NPs de Au@LA como para la estabilidad; así también el efecto de curvatura tiene un efecto significativo en la respuesta, los NPs con menor tamaño y alta estabilidad se obtuvieron en los puntos centrales por esta razón se recomienda realizar un diseño central compuesto para optimizar la configuración de los niveles de los factores RRP y T.

Diseño del experimento de optimización

Para encontrar la configuración que optimice la respuesta de los factores con efectos significativos en el tamaño y la estabilidad, se realizó un diseño central compuesto con diferentes combinaciones de moles de reductor/precursor (RRP) y Temperatura de la reacción (T), los resultados obtenidos de la experimentación se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13. Matriz del diseño central compuesto, se estudiaron dos factores a cinco niveles, que se presentan con su respectiva codificación y variables de respuesta (tamaño y estabilidad) obtenida por cada corrida

Corrida	T	RRP	Tamaño	Estabilidad
1	15 (-1)	4.50 (-1)	90.38	0.76
2	35 (1)	4.50 (-1)	140.23	0.96
3	15 (-1)	9.50 (1)	2.51	0.99
4	35 (1)	9.50 (1)	2.71	0.97
5	11 (-1.414)	7.00 (0)	2.19	0.99
6	39 (1.414)	7.00 (0)	2.35	0.98
7	25 (0)	3.46 (-1.414)	156.77	0.93
8	25 (0)	10.54 (1.414)	2.77	0.98
9	25 (0)	7.00 (0)	2.25	0.98
10	25 (0)	7.00 (0)	2.24	0.99
11	25 (0)	7.00 (0)	2.20	0.99
12	25 (0)	7.00 (0)	2.20	0.98
13	25 (0)	7.00 (0)	2.27	0.99

2.1.1. Análisis estadístico del experimento de optimización

La combinación de la corrida 1, 2, y 7 en los niveles de RRP de (-1.414 y -1) dan como resultado NPs con un tamaño (>90 nm) y se puede observar en la corrida 1 y 2 que el nivel del reductor es el mismo para las dos corridas, pero el nivel de la temperatura cambia dando como efecto NPs mas grandes cuando el nivel de la temperatura es mayor; así también se puede observar que el tamaño de NPs es (>3 nm) cuando el nivel de RRP se

encuentra en un nivel de (0, 1, 1.414); la estabilidad en tamaños (>3nm) es mayor al 0.90, la menor estabilidad se presenta en la corrida 1 donde la estabilidad es del 0.76.

El ANOVA del modelo de regresión para el tamaño del diseño central compuesto de la tabla 14 demuestra que el modelo es muy apropiado, como evidencia la prueba F de Fisher (56.10) y un valor de probabilidad muy bajo (0.000).

Tabla 14. Análisis de varianza para el tamaño, diseño central compuesto

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio ajustado	F	P
Regresión	5	38507.0	7701.4	56.10	0.000
Error residual	7	961.0	137.3		
Total	12	39468.0			

El análisis de significancia de regresión lineal se presenta en la tabla 15, donde el valor p de 0.072 para la interacción T por RRP es menor que 0.1. Por lo tanto, existe un efecto de interacción significativo. Es decir, el efecto de la temperatura en el tamaño de las NPs de Au@LA depende de los moles de reductor/precursor. El valor p de 0.000 para el efecto cuadrático de RRP por RRP es menor que 0.01. Por lo tanto, existe evidencia significativa de un efecto

cuadrático, indicando que la relación entre moles de reductor/precursor y tamaño de NPs siguen una línea curva; contrario al efecto cuadrático de T por T el valor p es de 0.344 mayor a 0.1. Por esta razón, existe evidencia de un efecto cuadrático no significativo sobre el tamaño de las NPs. El efecto lineal de la temperatura y los RRP se consideran significativos sobre la variable de respuesta dado que la interacción es significativa.

Tabla 15. Coeficientes de regresión estimados para tamaño, diseño central compuesto

Término	Coeficientes de regresión	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante	2.232	5.240	0.426	0.683
T	6.285	4.143	1.517	0.173
RRP	-55.397	4.143	-13.373	0.000
T*T	4.503	4.442	1.014	0.344
RRP*RRP	43.253	4.442	9.736	0.000
T*RRP	-12.412	5.859	-2.119	0.072

R-cuad. = 97.57%

R-cuad.(pred.) =
82.68%

R-cuad.(ajustado) = 95.83%

En la tabla 16 para cada término del modelo, hay un coeficiente que permite construir una ecuación que represente la relación entre la respuesta y los factores. Para los datos sobre tamaño de NPs de Au@LA, la ecuación de regresión es la siguiente:

Tamaño = $5.365 + 6.285(T) - 55.397(RRP)$
Ecuación 5

$$+ 42.666(RRP)^2 - 12.412(T * RRP)$$

Para los datos sobre tamaño, 97.21% de la variación en el tamaño es explicada por el modelo, R^2 pronosticado es de 84.92% y el R^2 ajustado es de 95.81% por lo que hay evidencia para decir que el modelo explica muy bien la variación en el tamaño de NPs de Au@LA.

Tabla 16. Coeficientes de regresión estimados para tamaño, sin incluir términos no significativos.

Término	Coeficientes de regresión	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante	5.365	4.239	1.266	0.241
T	6.285	4.150	1.514	0.168
RRP	-55.397	4.150	-13.350	0.000
RRP*RRP	42.666	4.412	9.670	0.000
T*RRP	-12.412	5.869	-2.115	0.067

R-cuad. = 97.21%

R-cuad.(pred.) =
84.92%

R-cuad.(ajustado) = 95.81%

Con la finalidad de evaluar la adecuación del modelo se utilizó la figura 4 donde se analizaron los residuos, es decir, la diferencia entre los valores observados y los valores ajustados. En la figura 4A) se gráfica los residuos en una hoja de probabilidad normal; como se puede observar en la gráfica los residuos siguen una línea recta, lo cual indica que el modelo cumple con los supuestos de normalidad. En la figura La gráfica 4B) es un histograma de los residuos donde se muestra la distribución de los residuos para todas las muestras, como se puede observar hay una simetría a pesar de que el histograma no sigue una forma de campana. 4C) se muestran los residuos versus sus valores de ajuste, obsérvese que

los residuos aparecen distribuidos aleatoriamente cerca del cero, lo cual indica que hay una tendencia constante en la varianza. Finalmente, en la figura 4D) se gráfica los residuos versus su orden de observación, en esta gráfica los residuos aparecen distribuidos aleatoriamente cerca del cero, lo cual indica que no hay correlación entre ellos. Con base a las gráficas de la figura 4 y a todos los resultados del análisis estadístico se argumenta que el diseño de experimentación realizado y sus resultados son satisfactorios y que los posibles errores durante la preparación de las muestras no influyeron en los resultados y conclusiones del diseño de experimentos.

Tabla 17. Análisis de varianza para la estabilidad, diseño central compuesto

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio ajustado	F	P
Regresión	5	0.033679	0.006736	3.52	0.066
Error residual	7	0.013414	0.001916		
Total	12	0.047092			

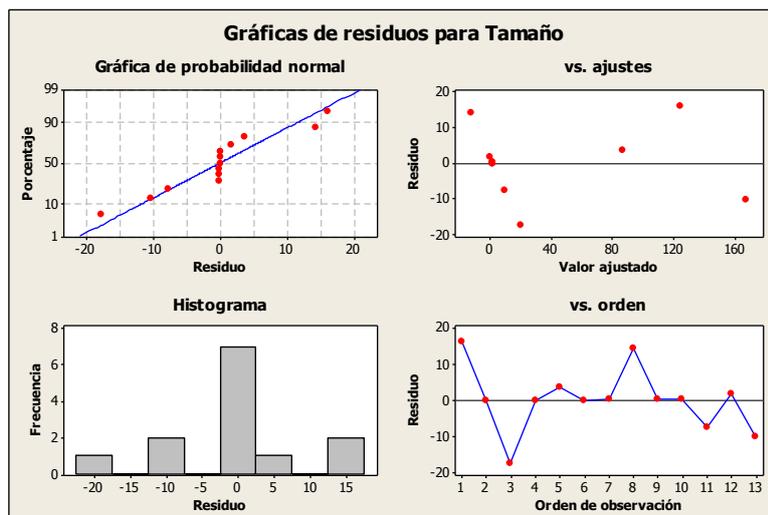


Figura 4. Gráficas de residuos para verificar la adecuación del modelo. A) Residuos versus los valores esperados, B) histograma para mostrar la distribución de los residuos, C) residuos versus sus valores de ajuste, y D) residuos versus su orden de observación.

El ANOVA del modelo de regresión para la estabilidad del diseño central compuesto de la tabla 17 demuestra que el modelo es El análisis de significancia de regresión lineal se presenta en la tabla 18, el valor p de 0.040 para la interacción T por RRP es menor que 0.1. Por lo tanto, existe un efecto de interacción significativo. Es decir, el efecto de la temperatura en la estabilidad de las NPs de Au@LA depende de los moles de reductor/precursor. El valor p de 0.459 para el efecto cuadrático

moderadamente apropiado, como evidencia la prueba F de Fisher (3.52) y un valor de probabilidad (0.066).

de T por T y el valor p de 0.135 para el efecto cuadrático de RRP por RRP son mayores que 0.1. Por lo tanto, existe evidencia de no tener un efecto cuadrático significativo sobre la estabilidad de las NPs. El efecto lineal de la temperatura y los RRP se consideran significativos sobre la variable de respuesta dado que la interacción es significativa.

Tabla 18. Coeficientes de regresión estimados para estabilidad, diseño central compuesto

Término	Coefficientes de regresión	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante	0.98600	0.01958	50.366	0.000
T	0.02073	0.01548	1.340	0.222
RRP	0.03884	0.01548	2.509	0.040
T*T	-0.01300	0.01660	-0.783	0.459
RRP*RRP	-0.02800	0.01660	-1.687	0.135
T*RRP	-0.05500	0.02189	-2.513	0.040
R-cuad. = 71.52%		R-cuad.(ajustado) = 51.17%		

En la tabla 19 para cada término del modelo, hay un coeficiente que permitió construir una ecuación que represente la relación entre la respuesta y los factores. Para los datos sobre estabilidad de NPs de Au@LA, la ecuación de regresión es la siguiente:

$$\text{Estabilidad} = 0.96077 + 0.02073(T) + 0.03884(\text{RRP})$$

Ecuación 6

$$- 0.05500(T * \text{RRP})$$

Para los datos sobre estabilidad, 58.62% de la variación en la estabilidad es explicada

por el modelo y el R^2 ajustado es de 44.83% por lo que hay evidencia para decir que el modelo explica moderadamente la variación en la estabilidad de NPs de Au@LA.

Los parámetros que se incluyeron para la optimización del tamaño fue un objetivo de 2nm y para la estabilidad el objetivo es de una razón de estabilidad del 0.9830. en la figura 5 se muestran la solución global pronosticada por el optimizador donde el valor del RRP es de 6.9794 y para la T es de 24°C.

Tabla 19. Coeficientes de regresión estimados de Estabilidad, sin incluir términos no significativos

Término	Coefficientes de regresión	Error estándar de los coeficientes	T	P
Constante	0.96077	0.01291	74.447	0.000
T	0.02073	0.01645	1.260	0.239
RRP	0.03884	0.01645	2.361	0.043
T*RRP	-0.05500	0.02327	-2.364	0.042
R-cuad. = 58.62%		R-cuad.(ajustado) = 44.83%		

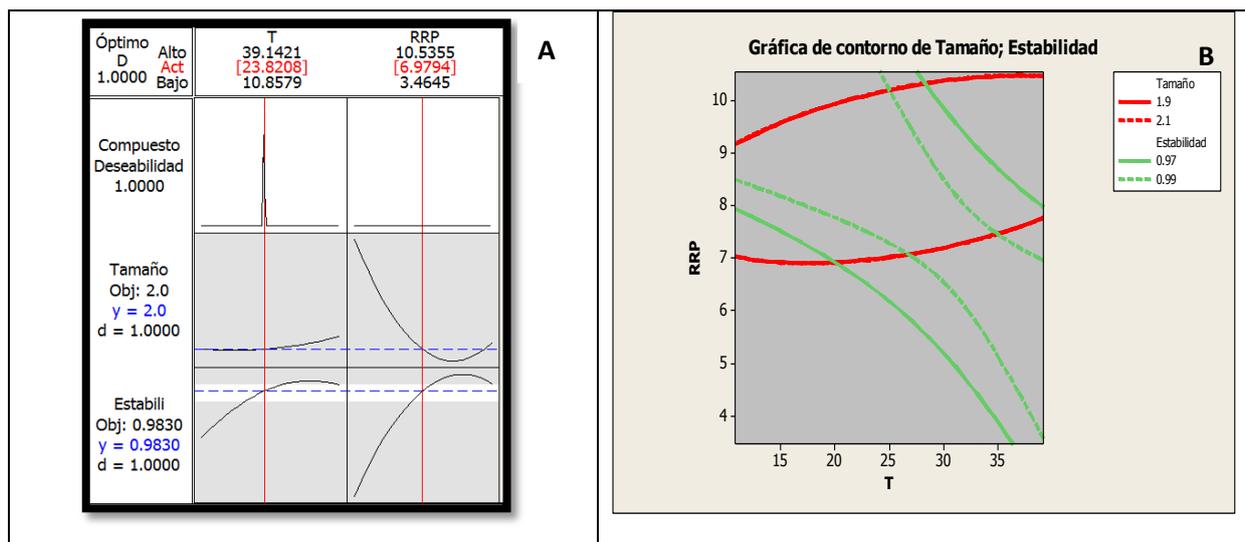


Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta, A) gráfica de optimización donde se predicen la configuración de los factores T y RRP para fabricar NPs de Au@LA de 2nm con una razón de estabilidad del 0.9830, B) Grafica de contorno para tamaño y estabilidad, predice las todas las posibles combinaciones para ontener NPs de 2nm y altamente estables.

Se realizó una corrida de confirmación, donde las NPs de Au@LA fueron fabricadas con los parámetros pronosticados por el modelo de optimización y se obtuvo NPs con tamaño de 2 nm y altamente estables; observar los resultados de caracterización por UV-Vis y DLS.

Caracterización de las NPs de Au@LA

Se fabricaron NPs de Au@LA con los parámetros pronosticados por el modelo de optimización, diseño central compuesto en la figura 5 y para validar el tamaño y estabilidad se caracterizaron las NPs por espectrofotometría UV-Vis y por DLS.

Espectrofotometro UV-Vis

La presencia de NPs fue confirmada utilizando espectrofotometría por UV-Vis

en el rango de 250 a 1000 nm. Presentando una máxima absorbancia correspondiente a la resonancia de plasmón superficial (A_{spr}) de 0.9367 con un rango de longitud de onda correspondiente a la resonancia de plasmón superficial (λ_{spr}) de 0.8786, en la figura 6 se puede observar el espectro de las NPs de Au@LA contra el espectro de las nanoparticulas después de realizar la prueba de estabilidad, se observa que el NaCl no afecta la estabilidad de las NPs, por lo que se tiene suficiente evidencia de alta estabilidad; así también se calculó el tamaño utilizando la metodología de W. Haiss y colaboradores (Haiss et al., 2007) dando como resultado un tamaño de 2 nm. El espectro que se obtuvo es similar al que se presenta en el artículo de A. Kumar y colaboradores (Kumar et al., 2012) en la fig. 2 también realizado a NPs de Au@LA con tamaño de 2 nm, igual que nosotros el autor de este artículo concluye que la absorbancia no es muy obvia cuando se tienen NPs de estos tamaños.

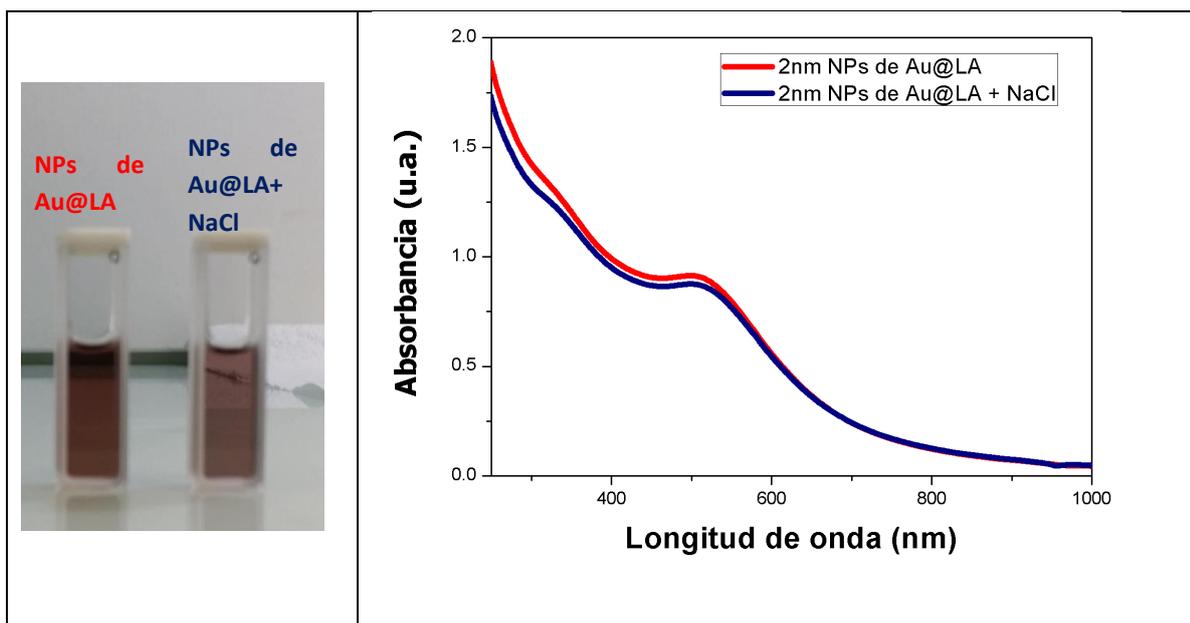
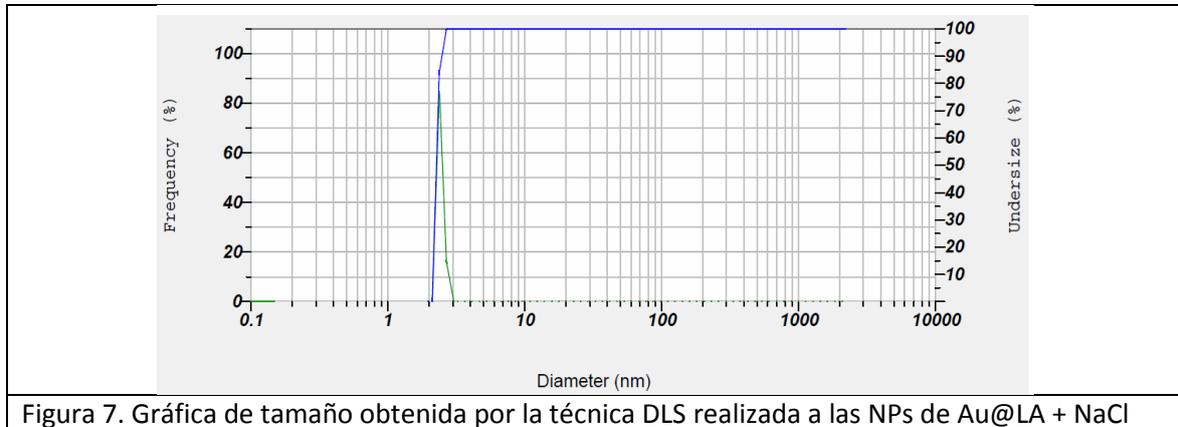
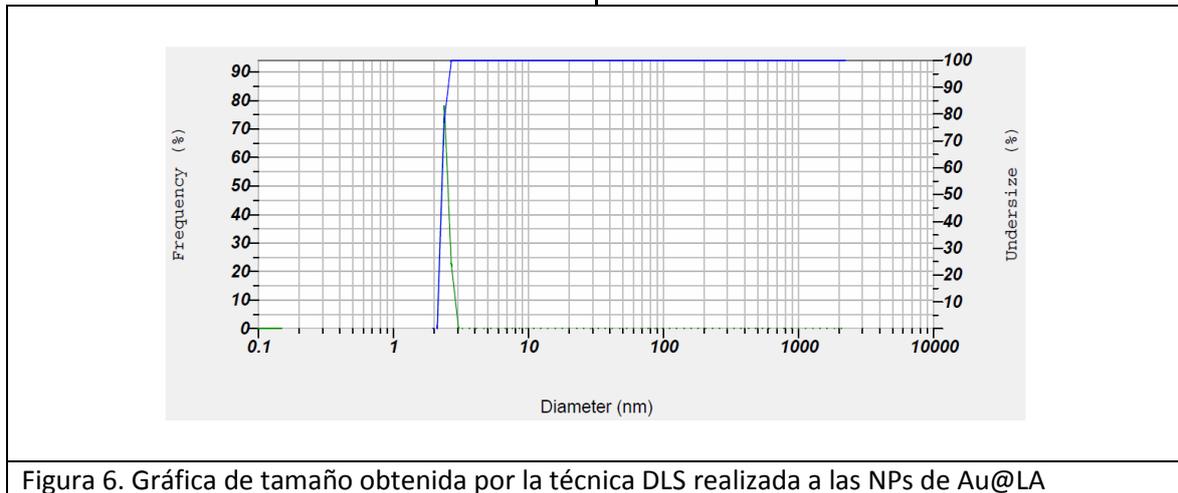


Figura 6. Espectros de absorbanza de las NPs de Au@LA y NPs de Au@LA + NaCl, la absorbanza de las nanopartículas fue detectado en 499 nm pero no es muy obvio.

Espectroscopia de correlación de fotones

Se analizaron las NPs por espectroscopia de correlación de fotones para validar el tamaño, y el tamaño obtenido tanto para

las NPs de Au@LA como para las NPs de Au@LA + NaCl es de 2.3 nm con 0.1 desviaciones estándar y una moda de 2.3 nm, los resultados se pueden visualizar en la figura 6 y 7.



Conclusiones

En este estudio, nosotros demostramos que usando Cloruro de oro como precursor, citrato de sodio como reductor y ácido lipoico como estabilizador se pueden obtener nanopartículas de oro esféricas con rangos de absorbanza máxima desde

490nm hasta 540nm equivalentes a un tamaño de NPs de (>2nm hasta 140nm); así también se demostró a través de un DOE exploratorio, que de cuatro variables del proceso de fabricación de las NPs de Au@LA solo tres tienen un efecto

significativo sobre el tamaño y la estabilidad y finalmente con base a los resultados de la caracterización de UV-Vis, DLS y pruebas de estabilidad se concluye que la respuesta pronosticada por el DOE

de optimización sobre los niveles óptimos de T y RRP para fabricar una NPs de Au@LA de 2nm y altamente estables son válidos.

Referencias

Afonso, A. S., Pérez-López, B., Faria, R. C., Mattoso, L. H. C., Hernández-Herrero, M., Roig-Sagués, A., . . . Merkoçi, A. (2013). Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, *40*(1), 121-126. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312004137>

Anand, N., Ramudu, P., Reddy, K., Rao, K., Jagadeesh, B., Babu, V., & Burri, D. (2013). Gold nanoparticles immobilized on lipoic acid functionalized SBA-15: Synthesis, characterization and catalytic applications. *Applied Catalysis A: General*, *454*, 119-126. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X13000331>

Chen, M., Cai, Y., Yan, Z., & Goodman, W. D. (2006). On the origin of the unique properties of supported Au nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(19), 6341-6346. doi:10.1021/ja0557536

Daniel, M.-C., & Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, *104*(1), 293-346. doi:10.1021/cr030698+

Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L., & Mirkin, C. A. (1997). Selective colorimetric detection of

polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, *277*(5329), 1078-1081. doi:10.1126/science.277.5329.1078

Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.*, *79*(11), 4215-4221. doi:10.1021/ac0702084

Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T., . . . Wang, P. C. (2012). Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS nano*, *6*(5), 4483-4493. doi:10.1021/nn301282m

Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine*, *2*(5), 681-693. doi:10.2217/17435889.2.5.681

Kelly, K. L., Coronado, E., & Zhao, L. L. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical ...* doi:10.1021/jp026731y

Kumar, A., Ma, H., Zhang, X., Huang, K., Jin, S., Liu, J., . . . Liang, X.-J. (2012). Gold nanoparticles functionalized with

therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*, 33(4), 1180-1189.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.058>

Montgomery, D. C. (2014). *Diseño y análisis de experimentos* (2 ed.). México: Limusa Wiley.

Nie, Z., Petukhova, A., & Kumacheva, E. (2010). Properties and emerging applications of self-assembled structures made from inorganic nanoparticles. *Nat Nano*, 5(1), 15-25. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2009.453>

Pitkethly, M. J. (2004). Nanomaterials– the driving force. *Materials Today*, 7(12), 20-29. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702104006273>

Takeuchi, N. (2009). *Nanociencia y Nanotecnología: La Construcción de un Mundo Mejor Átomo Por Átomo* (Vol. 1). Ensenada: Fondo de cultura económica.

Trejo-Durán, M., Cornejo-Monroy, D., Alvarado-Méndez, E., Olivares-Vargas, A., & Castano, V. M. (2014). *Nonlinear optical properties of Au-nanoparticles conjugated with lipoic acid in water* (Vol. 9).

Varnavski, O., Ramakrishna, G., Kim, J., Lee, D., & Goodson, T. (2009). Critical size for the observation of quantum confinement in optically excited gold clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 132(1), 16-17. doi:10.1021/ja907984r