



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

KIMIKA FAKULTATEA
FACULTAD DE QUÍMICA

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Facultad de Química/Kimika Fakultatea

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

Zilar nanopartikulen sintesia eta hauen erabilpena kaltzioa
determinatzeko irudi digital bidezko analisisian

Egilea: Sara Irastorza Apaolaza

Zuzendariak: Dra. Miren Ostra Beldarrain eta Dra. Maider Vidal Postigo

Donostia, 2021eko martxoa

LABURPENA

Lan honen helburu nagusia kaltzioaren determinazioa burutzeko metodo bat garatzea da. Horretarako bi metodo proposatzen dira, bata Ultramore-Ikusgai espektroskopia bidezkoa eta, bestea, irudi digitalen analisi bidezkoa. Kaltzioa determinatzeko, honen determinazio kolorimetricoa egin da, zilar nanopartikula, zisteina eta kaltzioaren arteko erreakzioan oinarrituz. Horretarako zilar nanopartikulak modu desberdinetara sintetizatu eta karakterizatu dira, propietate fisiki-kimikoak aztertze eta sintesi egokiena aukeratzeko. Irudi digitalen analisisian lortutako datuen tratamendua MADDI softwarea erabiliz egin da. Ultramore-Ikusgai espektroskopiarekin kaltzioa determinatzeko metodo preziso baina ez haiz zehatz bat garatu da. Irudi digitalen analisi bidez, ordea, proposatutako metodoa ez da guztiz ona izan.

ABSTRACT

The main objective of this work is to develop a method to perform the determination of calcium. For this, two methods are proposed, one by Ultraviolet-Visible spectroscopy and the other by digital image analysis. To determine the calcium concentration, a colorimetric determination has been carried out, based on the reaction between silver nanoparticles, cysteine and calcium. To analyze the physicochemical properties and select the most appropriate silver nanoparticle synthesis, they have been synthesized and characterized in different ways. Data processing has been carried out using MADDI software in digital image analysis. A precise but not accurate method has been developed for the calcium determination with Ultraviolet-Visible spectroscopy. However, with digital image analysis, the proposed method has not been entirely good.

AURKIBIDEA

| | |
|---|----|
| LABURPENA..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| AURKIBIDEA..... | 3 |
| 1. Sarrera | 5 |
| 1.1. Nanopartikulak..... | 5 |
| 1.1.1. Ezaugarriak..... | 5 |
| 1.1.2. Sintesi motak..... | 7 |
| 1.1.3. Karakterizazioa..... | 8 |
| 1.1.4. Aplikazioak | 10 |
| 1.1.5. Zilarrezko nanopartikulak | 10 |
| 1.1.5.1. Karakterizazioa: TEM..... | 10 |
| 1.1.5.2. Aplikazioak | 11 |
| 1.2. Ultramore-ikusgai espektroskopia..... | 12 |
| 1.3. Aldagai anitzeko analisisa | 15 |
| 1.4. Irudi digitalen analisisa..... | 16 |
| 2. Helburua..... | 18 |
| 3. Esperimentala..... | 19 |
| 3.1. Materiala | 19 |
| 3.2. Instrumentazioa eta softwarea..... | 19 |
| 3.3. Erreaktiboak eta disoluzioak | 19 |
| 3.4. Prozedura..... | 20 |
| 3.4.1. Zilar nanopartikulak | 20 |
| 3.4.1.1. Sintesia | 20 |
| 3.4.1.2. Karakterizazioa..... | 24 |
| 3.4.1.2.1. Ultramore-Ikusgai espektroskopia | 24 |
| 3.4.1.2.2. TEM analisisa | 24 |
| 3.4.1.2.3. Partikula tamainaren kalkulua | 25 |
| 3.4.1.3. Aldagai anitzeko analisisa | 25 |
| 3.4.2. Kaltzioaren determinazioa..... | 25 |
| 3.4.2.1. Ultramore-Ikusgai espektroskopia | 25 |
| 3.4.2.2. TEM analisisa | 26 |
| 3.4.2.3. Irudi digitalen analisisa..... | 26 |
| 3.4.2.4. Interferentzien azterketa..... | 28 |

| | | |
|----------|--|----|
| 4. | Emaitzak eta eztabaida | 28 |
| 4.1. | Zilar nanopartikulak | 28 |
| 4.1.1. | Sintesia | 28 |
| 4.1.2. | Karakterizazioa..... | 32 |
| 4.1.2.1. | UM-Ikus espektroskopia | 32 |
| 4.1.2.2. | TEM analisia | 35 |
| 4.1.2.3. | Partikula tamainaren kalkulua | 38 |
| 4.1.3. | Aldagai anitzeko analisia | 40 |
| 4.2. | Kaltzioaren determinazioa zilar nanopartikulak erabiliz..... | 43 |
| 4.2.1. | Metodoaren optimizazioa | 43 |
| 4.2.1.1. | TEM analisia eta UM-Ikus espektroskopia | 43 |
| 4.2.1.2. | Kalibrazio zuzenaren eraikuntza eta bere balidazioa | 47 |
| 4.2.2. | Irudi digitalen analisia | 53 |
| 4.2.3. | Interferentzien azterketa | 55 |
| 5. | Ondorioak/Conclusions..... | 58 |
| 6. | Bibliografia | 60 |

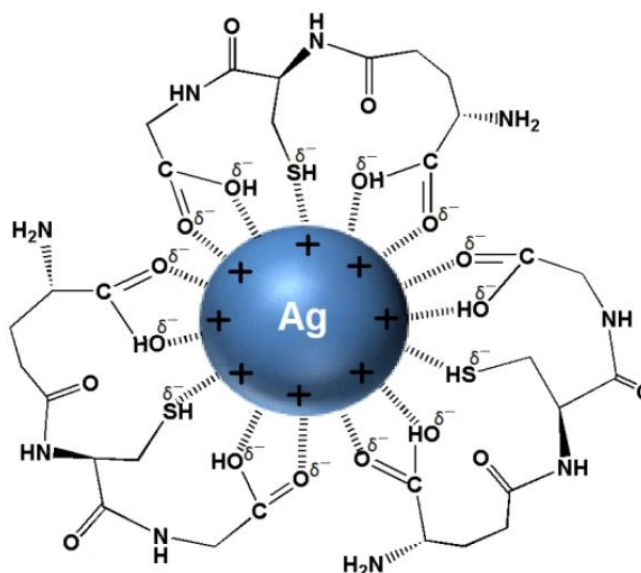
1. Sarrera

1.1. Nanopartikulak

1.1.1. Ezaugarriak

Nanopartikulak (NP) substantzia partikulatuak dituzten material mota asko dira, gutxienez 100 nm-tik beherako tamaina dutenak. NPak ez dira molekula sinpleak eta, beraz, hiru geruzaz osatzen dira¹:

- Gainazaleko geruza: molekula txiki, ioi metaliko, tentsioaktibo eta polimero ugariarekin funtzionaliza daiteke.
- Oskolaren geruza: nukleoarekin konparatuz, alderdi guztietatik begiraturaz kimikoki desberdina den materiala.
- Nukleoa: funtsean NParen erdiko zatia eta, oro har, NP berari dagokio.



1. irudia: zilar nanopartikula gainazalean zisteina aminoazidoarekin funtzionalizatua.

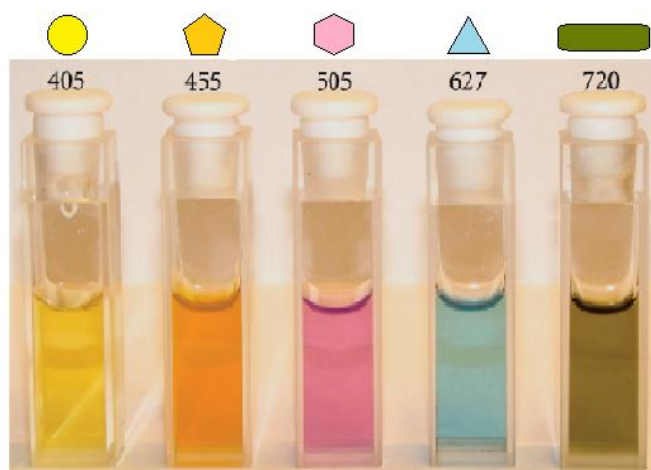
Tamainak sustantzien propietate fisiko-kimikoetan eragina izan dezaketela konturatu zirenean, material hauen garrantziaz ohartu ziren. Beraz, esan daiteke molekula hauen tamaina oso garrantzitsua dela. Partikula nanometrikoak tamaina mikroskopikoaren eta mesoskopikoaren artean daude. Nanopartikulen dimentsioa beste molekula txiki batzuekin konparatzen bada, hala nola bakterioa, azken hau handia dela esaten da, gainazalaren eta bolumenaren arteko erlazioa handia delako eta gainazaleko molekulen frakzioa handia delako².

Nanopartikulek propietate fisiko-kimiko definituak dituzte, hala nola propietate optikoa, propietate magnetikoa, propietate katalitikoa, mikrobioen aurkako propietatea nano-etapan... Azken ezaugarri horren ondorioz, erreaktibotasun kimikoa, jarduera biologikoa eta goi-mailako

Ondorengo irudietan (4. eta 5. irudietan) modu desberdinetara sintetizatu diren urre eta zilar nanopartikulak (Au NP eta Ag NP) ikus daitezke. Nanopartikulen tamaina, kontzentrazioa, morfologia eta abarren aldaketarekin, NP horiek kolore eta propietate bereizgarriak erakusten dituzte^{1,4}. Aurretik aipatutako edozein faktoreren aldaketak NP-en absortzio propietateetan eragiten dutenez, kolore desberdinetako disoluzioak lortzen dira, ondorengo irudietan ikus daitekeen bezala¹.



4. irudia: ezkerreko irudiko bialetan Au NPak daude eta eskuinekoetan Ag NPak. Disoluzioaren kolorea aldatzen da tamaina aldatzen delarik. Bi kasuetan ezkerretik eskuinera nanopartikula tamaina handitzen doa⁴.



5. irudia: zilar nanopartikulen disoluzioa ezberdinak morfologia eta tamaina ezberdinekin. Morfologiak eta tamainak aldaketa espektroskopiko handia eragiten dute. Disoluzio bakoitzak zein nm-tan absorbatzen duen azaltzen da kubeta bakoitzaren gainean⁵.

Lan honetan zilar nanopartikulak erabiliko dira, zisteinaren eta kaltzioaren presentzian dituzten propietateetan oinarrituz^{6, 7}.

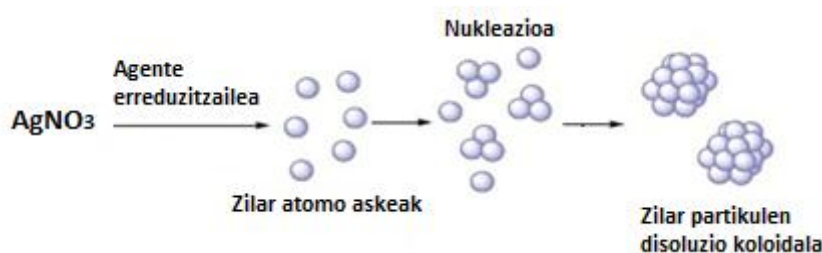
1.1.2. Sintesi motak

Normalean, ondorengo hiru metodoak erabiltzen dira zilar nanopartikulak sintetizatzeke²:

- Metodo fisikoak:
 - o Laser bidezkoa ablazioa: nanopartikula metaliko puru eta garbiak lortu daitezke⁸.

- Metodo kimikoak:
 - Erreduzio kimikoa: AgNO_3 ⁹, HAuCl_4 ¹⁰ eta $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3$ ¹¹ errektiboak erabiliz, Ag NP, Au NP eta Fe NP-ak lor daitezke. Erreaktibo horien eta agente erreduzitzaile organiko eta ez-organikoen bidez, erreduzioa ontzi bakar batean ematen da. Agente erreduzitzaileak ondorengoak izan daitezke: NaBH_4 eta sodio zitratoa.
 - Mikroemultsio teknikak¹².
 - Mikrouhin bidezkoa: mikrouhin bidezko erreduzioa¹³.
- Sintesi biologikoa (edo berdea): sintesi hauen funtsa energia eta produktu kimiko kaltegarri gutxiago erabiltzea da. Aurretik aipatutako produktu kimiko hauek ondorengo produktuekin ordezkatu daitezke: onddoak, bakterioak eta landare estraktuak:
 - Mikrobianoa¹⁴
 - Landare-extraktuen bidezkoa¹⁵

Lan honetan, metodoa kimikoa erabiliko da, zehazki, erreduzio kimikoa. 6. irudian ikus daitezke metodo kimiko horren eskema.



6. irudia: erreduzio kimiko bidezko zilar nanopartikulen sintesia. AgNO_3 eta agente erreduzitzaile bat erabiliz, zilar nanopartikulen disoluzio koloidalaren eraketa ematen da.

1.1.3. Karakterizazioa

Zenbait karakterizazio-teknika erabiltzen dira nanopartikulen hainbat propietate fisiko-kimiko aztertzeko. Ondoren teknika erabilienak aipatzen dira¹:

- Karakterizazio morfologikoak: oso interesgarriak dira, propietate gehienetan eragina baitute.
 - Elektroiaren ekortze mikroskopia (Scanning Electron Microscopy, SEM): elektroiaren ekortze-printzipioan oinarritzen da eta NPren nanoeskala mailan dagoen informazioa lortzen da. Hau dispersioa, bolumena eta matriza ezagutzeko erabiltzen da¹⁶.

- Transmisioko mikroskopia elektronikoa (*Transmission electron microscopy*, TEM): elektroien transmitantziaren printzipioan oinarritzen da. Geruzako bi edo material gehiagori buruzko informazioa ematen du, adibidez estruktura. Teknika horrekin ere NPren nanoeskala mailan dagoen informazioa lortzen da⁶.
- Karakterizazio estrukturalak: garrantzitsuak dira materialen konposizio eta naturari buruzko informazioa eman dutelako.
 - X izpien difrakzioaren analisia (*X-ray diffraction analysis*, XRD): propietate estrukturalak lortzeko oso garrantzitsua. Hau NP simple eta multifasikoentzat oso erabilgarria da, baina nanopartikula txikiekin arazoak sortzen dira.
 - X izpien fotoelektroi espektroskopia (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS): azalerarekiko sentikorra den teknika bat da eta konposizio orokorra eta sakontasunarekin ematen den konposizio-aldaketa ezagutzeko erabiltzen da.
- Partikula tamaina eta gainazaleko eremuaren karakterizazioa: hauekin tamainari buruzko informazio hobea lortu daiteke. Horretarako, TEM eta SEM mikroskopiaz gain, argiaren dispersio dinamikoaren (*Dynamic Light Scattering*, DLS) teknika erabiltzen da¹⁷.

DLSa suspentsioan dauden partikula tamainen banaketa zehazteko erabiltzen den teknika fisiko-kimikoa da. Laser argia suspentsioan dauden partikulengana iristen denean, norabide posible guztietan dispersatzen da. Norabide bat bereizten bada, partikula ezberdinek dispersatutako argi izpiek elkarren artean oztopatzen dira, eta sakabanatze intentsitate jakin bat lortzen da¹⁸.

- Karakterizazio optikoa: teknika horiek NPek duten absorbantzia, reflektantzia, lumineszentzia eta fosforeszentziari buruzko informazioa ematen dute. NP metalikoeak eta erdi-eroaleek kolore desberdinak aurkezten dituztenez, argazkigintzarekin erlazioatutako teknikak ere oso erabiliak dira.
 - Ultramore-Ikugai espektroskopia¹⁷.

Lanaren helburuen arabera, karakterizazio morfologikoak eta optikoak izango dira baliagarrienak. Horrela, nanopartikulen tamaina, absorbatzen duten uhin-luzera... jakin ahal izango ditugu. Beraz, lan honetan Ultramore-Ikugai espektroskopia eta TEM teknikak erabiliko dira nanopartikulen karakterizazioa egiteko. Horrez gain, ImageJ¹⁹ softwarea erabiliz partikula tamaina kalkulatu da eta aldagai anitzezko analisia²⁰ burutuz, Ag NPak beren ezaugarrien arabera multzokatu dira.

1.1.4. Aplikazioak

Azken denboraldian, nanopartikulak asko ikertu dira dituzten ezaugarri eta propietate fisiko-kimiko bereziengatik, eta hauek hainbat aplikazioetarako erabiltzen hasi dira. Urre nanopartikulak (Au NP) proteinen detekzioan erabiltzen dira. Platino nanopartikulak (Pt NP) toxina arriskutsuak eta beste material organiko arriskutsu batzuk suntsitzeko erabiltzen dira. Titaniano nanopartikulak (Ti NP) helburu bakterizidetarako erabiltzen dira iragazkietan, hauek errektibotasun handia baitute, bakarrik edo argi ultramorearekin argizatutaz gero²¹.

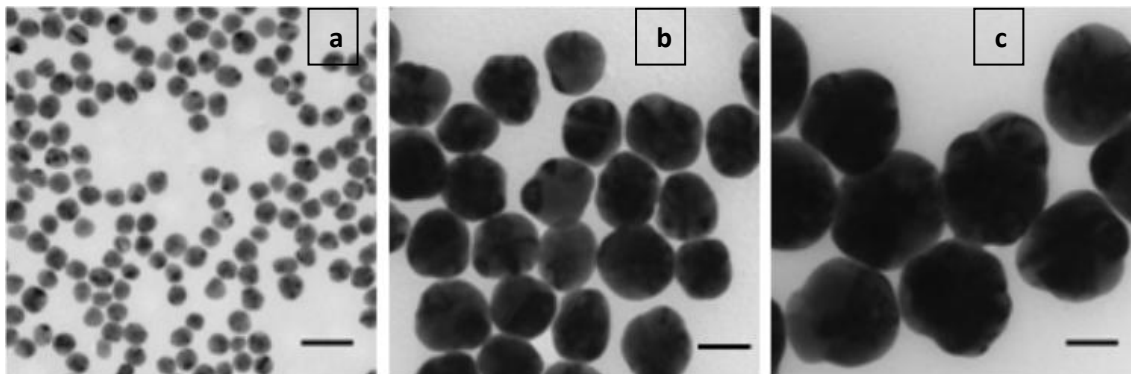
1.1.5. Zilarrezko nanopartikulak

Aurrerapen esanguratsuak lortu dira nanopartikula metalikoen erabileran, hainbat produktu kimiko detektatzeko (sentsore gisa) nahiz zenbait analito determinatzeko erabil baitaitezke, hala nola DNA, proteinak, molekula txikiak eta ioi metalikoak. Horretarako, estrategia kolorimetroak erabiltzen dira. Urrezko nanopartikulek (Au NP) eta zilarrezko nanopartikulek (Ag NP) interes handiagoarekin ikertu dira gainazaleko plasmoiaren erresonantzia (SPR), egonkortasun kimikoa eta prestatzeko erraztasunagatik. Baina, saiakuntza kolorimetroetarako, Ag NPak erabiltzeak hainbat abantaila ditu Au NPren aurrean. Ag NPak iraungitze-koefiziente handiagoak dituzte tamaina bereko Au NPekin alderatuta, eta gainera kostu txikiagoa dute Ag NPak⁶.

1.1.5.1. Karakterizazioa: TEM

Mikroskopia optikoek 300 nm inguruko erresoluzioa dutenez, ezin dira nanopartikulak bezalako molekula txikiak ikusi. Beraz, horren eta beste hainbat arrazoen ondorioz mikroskopia elektronikoak sortu dira. Mikroskopia elektronikoen artean, transmisio mikroskopia elektronikoa (TEM) eta ekortzeko mikroskopia elektronikoa (SEM) dira nagusiak. Mikroskopia elektroniko batek argi ikusgaiaren orde, elektroio sorta bat erabiltzen du lagina argitzatzeko eta irudi handitu bat sortzeko. Mikroskopia optikoek argi ikusgaia erabiltzen dutenez, gehienez 300 nm-ko erresoluzioa izan dezakete. Elektroiek, berriz, De Broglie-ren uhin-luzera dute, eta hau argi ikusgaia baino 100,000 aldiz laburragoa da, horrela, mikroskopia elektronikoek 0.05 nm-ko erresoluzioa izan dezakete. Islatutako argiaren eta transmititutako argiaren mikroskopia bezala, SEMek islatutako elektroien eta fotoien erantzuna jasotzen dute irudi bat sortzeko. TEMek, berriz, laginaren bidez transmititutako elektroio sortan oinarritzen dira nagusiki. TEMa oso tresna indartsua da materialen mikro eta nano egituren karakterizazio kualitatibo eta kuantitatiborako. SEMa oso eraginkorra da gainazal zimirtsua duten laginen irudi onak lortzeko eta horien mikroanalisisarako. Mikroanalisisan SEMak laginen konposizio kimikoa xehetasunez aztertzeko gaitasuna du x izpien analizatzaile batera konektatzen denean²².

Beraz, aipatutako arrazoiengatik zilar nanopartikulen karakterizaziorako mikroskopia optikoa ezin denez erabili, TEM erabili da. 7. irudian TEM bidez lortutako irudiak ikus daitezke. Bertan zilar nanopartikula ezberdinen TEM irudiak agertzen dira, eskala berdinarekin baina nanopartikulen diametroa desberdina izanik. Irudian ikus daiteke (a) irudiko Ag NPak hiru irudietatik diametro txikiena dutenak direla eta (c) irudikoak diametro handiena dutenak direla.



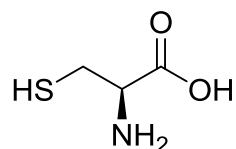
7. irudia: zilar nanopartikulen TEM irudiak 50 nm-ko eskala. Ag NP-ren diametroa 20 nm (a), 60 nm (b) eta 100 nm (c) izanik²³.

1.1.5.2. Aplikazioak

Zilar nanopartikulak hainbat aplikaziotan erabiltzen dira²³:

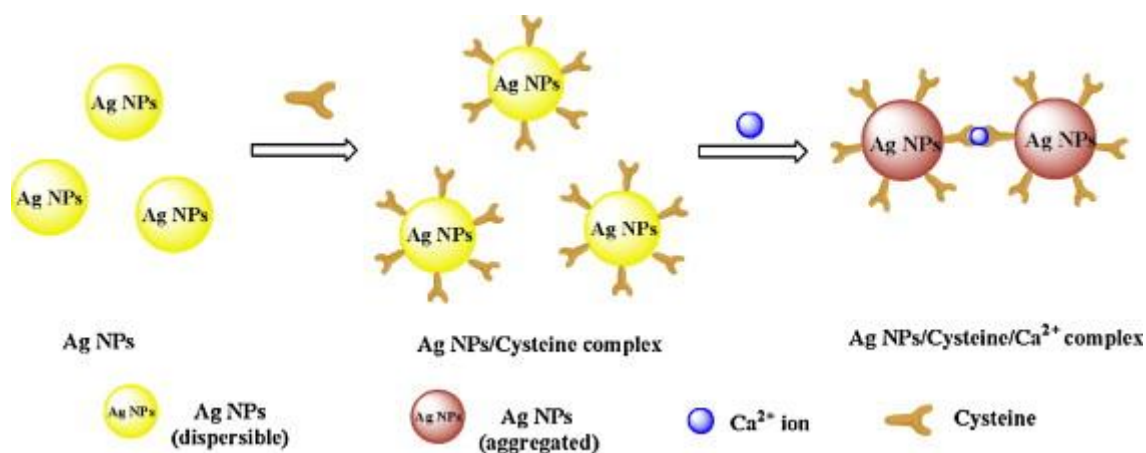
- Diagnostikorako aplikazioak: zilarrezko nanopartikulak biosentsoreetan eta saiakuntza askotan erabiltzen dira, non zilarrezko nanopartikulen materialak detekzio kuantitatiborako etiketa biologiko gisa erabil daitezkeen.
- Bakterioen aurkako aplikazioak: zilarrezko nanopartikulak arropetan, oinetakoetan, margoetan, zaurietako apailatzeetan, etxetresna elektrikoetan, kosmetikoetan eta plastikoetan sartzen dira, beren propietate antibakterialak direla eta.
- Eroaleen aplikazio: zilarrezko nanopartikulak tinta eroaleetan erabiltzen dira eta konpositeetan integratzen dira eroankortasun termikoa eta elektrikoa hobetzeko.

Nanopartikulek dituzten propietate optikoetan baliatuz, azken hamarkadatan ikerketa lan asko burutu dira NPak metodo analitiko optikoen garapenerako erabiliz. Adibidez, Ag NPak zisteina aminoazidoa detektatzeko erabil daitezke^{6, 7}. Zisteinaren tiol taldeak errektibotasun altua du zilarrarekin, eta honengatik sufre atomoaren bidez, zisteina Ag NPren gainazalean lotzen da Ag NP/zisteina konplexuak sortuz. Ikusi da zisteina modu negatiboan kargatuta dagoela baldintza esperimentaletan. Negatiboki kargatutako Ag NP/zisteina konplexuen artean aldarapen elektrostatikoa dagoenez, Ag NPren agregazioa saihesten da. Beraz, ez da inolako eraginik ikusten Ag NPei zisteina gehitzean. Bestalde, kaltzioa gehitzean, zisteina kaltzioari elkartzen zaio amino (NH_2) eta kaboxilo (COOH) taldeen bitartez⁶.



8. irudia: L-zisteinaren egitura. Bertan amino (NH₂), karboxilo (COOH) eta tiol (SH) funtzio taldeak daudelarik.

Ikertzaile batzuek adierazi dute, aminoazido neutroek Ca²⁺-ekin elkarrengaitan dutela, 1:2 konplexuak sortzeko. Zorionez, AgNPak zisteina eta Ca²⁺ -en presentzian, orientatu eta elkartu egiten dira, kate moduko agregatuak sortuz Ca²⁺ ioien koordinazio lotura bidez. Agregazio prozesu honek, partikulen arteko distantzietan aldaketak eragiten ditu, eta, ondorioz, AgNPen espektro elektromagnetikoaren uhin-luzera handiago batean absorbatzea eragiten du, kolore horitik gorriarako aldaketa bat eraginez⁶. 9. irudian prozesu hau modu eskematikoan azaldu da.

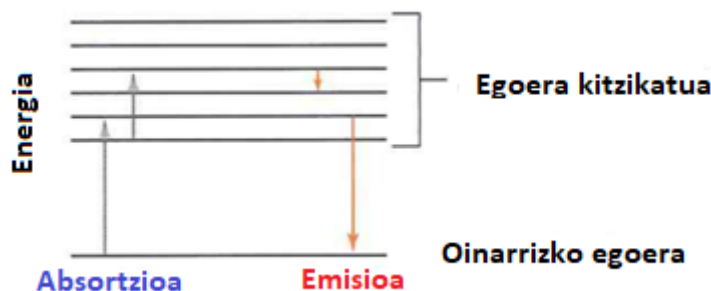


9. irudia: Ag NP erabiliz kaltzioa detektatzeko erabili den estrategiaren ilustrazio eskematikoa. Zisteina eta Ca²⁺ aldi berean gehitzean, Ca²⁺ + ioiek "kola" gisa jotzen dute, aldameneko Ag bi nanopartikulak elkartuz⁶.

Lan honetan azaldutako prozedura moldatzea proposatzen da, zisteina determinatu ordez, kaltzio determinatu ahal izateko.

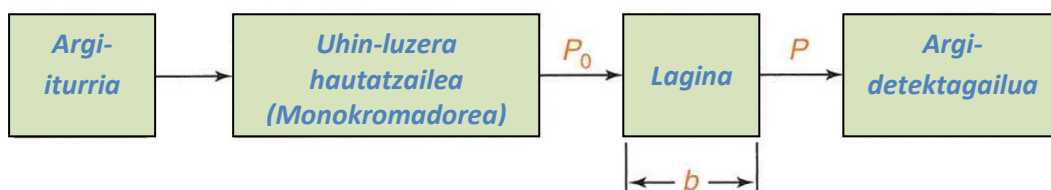
1.2. Ultramore-ikusgai espektroskopia²⁴

Esan bezala, nanopartikulek absorzio banda karakteristikoak dituzte SPR fenomenoagatik. Ezaugarri hori ondo aztertzeko Ultramore-Ikusgai espektroskopia (UM-Ikus espektroskopia) erabili da. Espektrofotometria argiaz baliatuz kontzentrazio kimikoak neurtzeko erabiltzen duten tekniken multzoa da. Molekula batek fotoi bat absorbatzen duenean, molekularen energia handitu egiten da eta molekula egoera kitzikatu batera igarotzen da. Molekula batek fotoi bat galtzen badu, berriz, kontrakoa pasatzen da, hau da, molekularen energia gutxitzen da. Atomo baten energia minimoko egoerari oinarritzeko egoera deritzo (10. irudia). Erradiazio ultramoreak eta ikusgaiak elektroiek energia handiagoko orbitaletara igarotzea eragiten dute²⁴.



10. irudia: atomo baten oinarriko egoera eta egoera kitzikatua. Atomoak fotoi bat absorbatzerakoan energia hartzen du (egoera kitzikatua) eta, fotoia askatzerakoan, energia galtzen du. Energia minimoa oinarriko egoeran lortzen da.

Espektrofotometro batek (argiaren absorbantzia neurtzeko aparatua) izan behar dituen gutxieneko zatiak 11. irudian agertzen dira. Iturri jarrai batetik datorren argia, monokromadore (prisma, difrakzio-sarea edo iragazkia) batetik igarotzen da, eta bertan, uhin-luzera bat hautatzen da, “monokromatikoa” (kolore batekoa) dena. Argi "monokromatiko" honek b bide optikoa bat zeharkatzen du, eta detektatzen den argiaren irradiantzia neurtzen du. Espektroskopia ultramorean eta ikusgaien lagin likido bat jartzen da, eta lagin hau, normalean, kubeta izeneko gelaxka batean jartzen da.



11. irudia: espektrofotometro sinple baten azalpen eskematikoa. Espektrofotometroaren zati desberdinak agertzen dira.

Transmitantzia eta absorbantzia espektrofotometriari desberdintzen diren bi magnitude dira.

- **Transmitantzia (T):** laginean zehar igarotzen den argi frakzioa da. Hau da absorbatzen ez dena. Honen balioa 0 eta 1 artean egongo da.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad 1. \text{ ekuazioa}$$

Non, P laginak xurgatu ez duen frakzioa den, eta, P_0 argi monokromatikoa den. Hau da, $P \leq P_0$ izango da, laginak argiaren zati bat xurgatuko baitu. Hau ikusita, laginak ez badu argirik xurgatzen, transmitantzia balioa 1 izango da; eta, laginak argi guztia xurgatzen badu, berriz, balioa 0 izango da.

- **Absorbantzia (A):** transmitantziaren kontrakoa da, hau da, laginak absorbatzen duen argia da. Honela defini daiteke:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T \quad 2. \text{ ekuazioa}$$

Absorbantzia oso garrantzitsua da, argia absorbatzen duen laginaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala baitelako.

$$A = \epsilon bc \quad 3. \text{ ekuazioa}$$

Lambert-Beer legea (3. ekuazioa) espektrofotometriaren oinarria da. Laginaren kontzentrazioa, C , normalean mol/L (M) unitateetan ematen da. Bide optikoa, b (11. irudia), normalean zentimetrotan adierazten da eta absorbitate molarra, ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ unitateetan ematen da. Azken magnitude honek adierazten du zenbat argi absorbatzen duen sustantzia batek uhin-luzera zehatz batean.

Analisi espektrofotometrikoan, orokorrean, absorptzio maximoko uhin-luzera aukeratzen da ondorengo bi arrazoiengatik:

1. Kurba nahiko laua izaten da maximoaren inguruan, eta, beraz, ia ez da aldatuko absorbantzia, nahiz eta monokromatzailea pixka bat desdoitzen edo aukeratutako bandazabalera zertxobait aldatzen bada.
2. Analisiaren sentikortasuna maximoa da absorbantzia maximoko unean. Hau da, analito kontzentrazio jakin baterako erantzun maximoa lortzen da.

Ultramore-Ikusgai espektroak, hurrenez hurren, 195 – 380 nm (ultramorea) eta 380 - 780 nm (ikusgaia) bitarteko uhin-luzera tartea du. Argiaren xurgapenaz arduratzen den molekularen zatiari, kromoforo deitzen zaio. Argi ikusgaia absorbatzen duen substantzia oro koloreztatuta agertzen da argia transmititu edo islatzen duenean. Materiak argi zuriaren uhin-luzera jakin batzuk absorbatzen ditu, baina gure begiek absorbatzen ez diren uhin-luzerak detektatzen ditu. Hau da, begi bistaz ikusten den koloreari, absorbatutako kolorearen osagarria deitzen zaio. Ondorengo taulak absorbatzen den uhin-luzeraren absorbatutako eta behatutako koloreak azaltzen ditu.

1. Taula: uhin luzera ezberdinetan absorbantzen den kolorea eta behatutako kolore konplementarioa.

| Absorbantzia maximoko uhin-luzera, nm | Absorbatutako kolorea | Kolore behatua |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------|
| 380-420 | Bioleta | Hori berdexka |
| 420-440 | Urdin bioleta | Horia |
| 440-470 | Urdina | Laranja |
| 470-500 | Berde urdinxka | Gorria |
| 500-520 | Berdea | Morea |
| 520-550 | Berde horixka | Bioleta |
| 550-580 | Horia | Urdin morea |
| 580-620 | Laranja | Urdina |
| 620-680 | Gorria | Berde urdinxka |
| 680-780 | Morea | Berdea |

1.3. Aldagai anitzeko analisisia

Kimimetria kimikaren zati bat da, non matematika, estatistika eta logika formalez baliatzen den honako hauek egiteko^{25, 26}:

- Prozedura esperimental optimoak diseinatu edo hautatzea.
- Informazio kimiko garrantzitsua ematea seinale analitikoaren analisietatik abiatuta.
- Sistema kimikoen ezagutza eskuratzea.

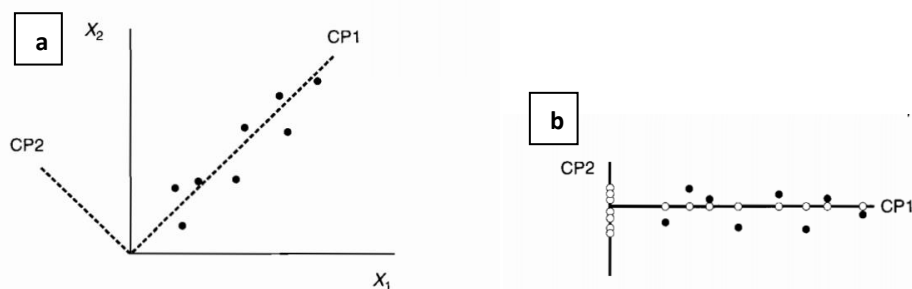
Kimimetriaren aplikazio esparruen artean esperimentuen diseinua, datuetan ereduak antzematea (*Pattern recognition*), aldagai anitzeko kalibraketa (*multivariate calibration*) edo datuen sailkapenerako metodoak daude. Aplikazio esparru hauek lantzeko hainbat algoritmo erabiltzen ditu kimimetriak eta horien artean garrantzitsu eta oinarritzkoetako bat osagai nagusi bidezko analisisia (*Principal Component Analysis, PCA*) da.

Metodo espektroskopikoek, besteak beste, lagin bakar batetik datu analitiko ugari lor ditzakete. Honelako egoeretan, lagin bakoitzarentzat hainbat aldagai neurtzen direnez, aldagai anitzeko datu matrizeak lortzen dira. Bi aldagai soilik neurtzen badira, informazioa grafikoki azaltzea erraza izango da. Baina, hiru aldagai neurtzen direnean, lortutako datuen informazioa aztertzea zailagoa bihurtuko da; eta lau aldagaietatik gora, ia ezinezkoa izango da lortutako informazioa grafikoen bidez azaltzea eta datuen arteko erlazioa ikustea. Arrazoi horrengatik, aldagai murrizketan oinarritutako metodoak garatu dira, hala nola, PCA²⁵.

Osagai Nagusi Bidezko Analisisia edo PCA, teknika erabilienetarikoa da kimimetrian, eta hau, esan bezala aldagaien murrizketan oinarritzen da. PCA informazioaren sintesirako edo dimentsioaren murrizketarako (aldagaien kopurua) estatistika-teknika bat da. Hau da, aldagai asko dituen datu-banku baten aurrean, horiek kopuru txikiago batera murriztea izango da

helburua, ahalik eta informazio gutxien galduz. Teknika honekin informazio ez-baliagarria eta zarata kendu ahal izango da. Gainera, adierazgarria den informazioa eta ez dena desberdindu ahal izango da.

Osagai nagusi (PC) edo faktore berriak jatorrizko aldagaien konbinazio lineala izango dira, hau da, aldagai berri batzuk definituko dira eta, gainera, independenteak izango dira elkarren artean. Aldagai berri edo osagai nagusi hauek (PC) lagina deskribatzeko gai izango dira. Lortzen diren aldagai berrien (PC) eta jatorrizko aldagaien kopurua berdina izango da. Baina, PCari esker aukeratuko den lehen osagai nagusia, PC1 izango dena, aldakortasun handieneko norabidea azaltzen duen osagaia izango da. Bigarren osagai nagusiak, PC2, hurrengo zatirik handiena azalduko du eta, horrela hurrenez hurren. Hau eginez, ahalik eta gehien azaltzea lortuko da, horretarako gutxieneko PC kopurua aukeratzuz²⁵. PCak beren artean beti ortogonalak izango dira (12. irudia).



12. irudia: Osagai Nagusi Bidezkoa Analisiaren *Scores* grafikoak, PC-ak ortogonalki kokatuak norabide ezberdinetan(a)(b)²⁵.

Antzekotasunak dituzten laginak (12. irudian puntuekin irudikatu direnak), bata bestearengandik gertu kokatuko dira aldagai nagusiek definitutako espazioan. Hau jakinda, lan honetan PCA teknika erabiliko da sintesi ezberdinen eta sintesi berdinen errepliken arteko antzekotasunak eta ezberdintasunak ikusteko. Baina kontutan hartu behar da teknika hau bakarrik erabiliz ezin dela ziurtasun osoz jakin aipatutako laginen arteko erlazioa.

1.4. Irudi digitalen analisisia

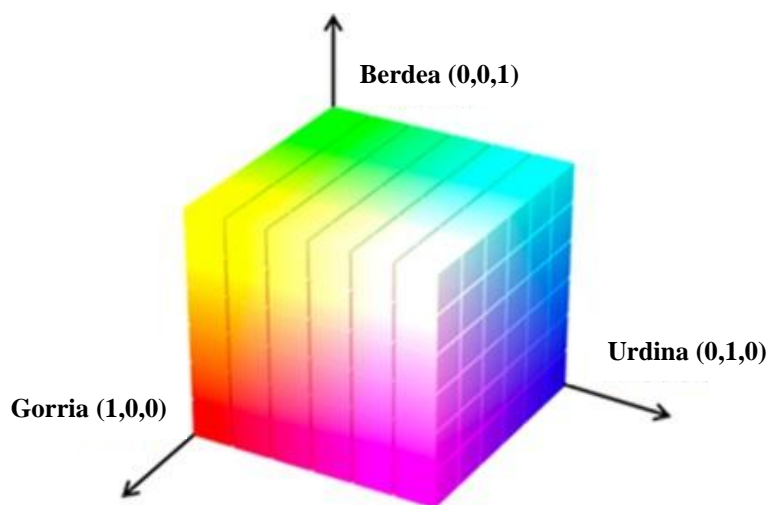
Kolorimetria gizakiaren kolorearen pertzepzioa kuantifikatzeko eta deskribatzeko erabiltzen den zientzia eta teknologia da. Tradizionalki, kolorimetria bisuala eta fotoelektrikoan bana daitezke. Kolorimetria bisualean disoluzioaren kolore-aldaketa begi hutsez ikusten da, eta sustantzien kontzentrazioa neurtzeko erabiltzen da. Zaila izaten da begi hutsez kolore-diferentzia sotilak bereiztea, eta, beraz, kolorimetria bisualaren neurtzeko zehaztasuna kolorimetria fotoelektrikoarena baino txikiagoa da. Kolorimetria fotoelektrikoak kolorimetro fotoelektrikoak

edo espektrofotometroa bezalako aparatuak erabiltzen ditu, eta modu honetara, kolorealdaketaren bereizmen hobea eta kontzentrazioa zehatzagoa lor daitezke²⁷.

Analisi kimikoetan irudien analisia nahiko berria dela esan daiteke. Gaur egun, ordenagailuen erabilerak asko errazten du irudi hauen tratamendua eta analisia. Laginei egindako irudiek, behar bezala prozesatzen badira, konposizioari buruzko informazio baliotsua eman dezakete. Irudiak eskuratzeko gailuen artean, kamera hiperespektralak oso ospetsuak bihurtzen ari dira kuantifikazio analisian. Baina hauek, sofistikatuak, garestiak eta konplexuak izaten dira²⁸.

Telefono adimendunekin edo mahai-gaineko eskanerrekin hartutako irudi digitalek, ziurrenik, aztertzen ari den sistemari buruzko informazio gutxiago ematen dute. Baina, aipatutako horiek jardura bikaina erakutsi dute hainbat aplikaziotan, datuen prozesamendua ximpleagoa izanik eta kostu txikia suposatuz²⁸. Gainera, azken urteotan, kameraren funtzioak nabarmen hobetu direnez, hauen erabilera azkar handitu da²⁷.

Detektagailu bat duten gailuetarako erabiltzen den kodifikazioa RGB izan ohi da. Horrek esan nahi du irudiak pixelen kodifikazio bat direla hiru kanaletan: gorria (*Red*), berdea (*Green*) eta urdina (*Blue*). Hauek 0 eta 255 arteko balioak izaten dituzte. RGB aldagarriak beste kolore-espazio batzuetara bihur daitezke, hala nola HVS, eta irudiak sistema hauetan ere irudika daitezke. Askotan, kubo baten bidez adierazten da eta kolore bakoitzak ardatz bakoitzari esleitzen zaio, 13. irudian adierazten den bezala. Beste modu batera esanda, ardatz bakoitzak (x, y, z) kolore kanal bati dagokio. (0,0,0) koordinatuak kolore beltzari dagozkio eta, (1,1,1) koordinatuak, berriz, kolore zuritari. Tarte horietan, dauden kolore guztiak sartzen dira. Beraz, kolore bakoitzak RGB hiru zenbaki izango ditu²⁷.



13. irudia: RGB kanalean koloreek espazioan sortzen duten kubo, kolore gorriak (1,0,0), berdeak (0,0,1) eta urdinak (0,1,0) balioak dituztelarik²⁷.

Analitoaren kontzentrazioa lortzeko, erabili den softwarea MADDI (*Microplate Analysis by Decomposition of Digital Images*) izan da²⁹.

Hainbat analito determinatu dira teknika honen bidez, hala nola elikagaien koloratzaileak (tartazina eta allura gorria²⁸). Lan honetan, irudi digitalen analisiaren bidez, zilar nanopartikulak erabiliz kaltzioa determinatzea proposatzen da, 1.1.5.2 atalean aipatu den bezala zilar nanopartikulak zisteina eta kaltzioaren presentzian kolore aldaketa ematen baitute.

2. Helburua

Lan honen helburu nagusia kaltzioaren determinazio kolorimetricoa burutzea izango da, eta hau betetzeko, hainbat azpi-helburu egongo dira. Lehenik eta behin, zilar nanopartikulak (Ag NP) sintetizatu eta erabiliko dira ondoren kaltzioaren determinazioa burutzeko. Beraz, sintetizatu diren Ag NPren karakterizaziorako teknikak ikasi eta aplikatuko dira. Karakterizatu ondoren, Ag NP sintetizatuak Ag NP erositakin konparatuko dira, Ag NP sintetizatuen baliagarritasuna aztertzeko. Azkenik, kaltzioaren determinazio espektrofotometricoa egingo da zilar nanopartikulak erabiliz, eta ondoren, irudi digitalen analisi bidez kaltzioaren determinaziorako prozedura bat proposatuko da.

Zilar nanopartikulak sintetizatzeke bost prozedura ezberdin erabili ondoren, egokiena (erositako Ag NPen hantz gehien duena) aukeratuko ahal izango da Ag NPren karakterizazioa eginez. Horretarako, propietate fisiko-kimikoak aztertuko dira Ultramore-Ikusgai espektroskopia, transmissioko mikroskopia elektronikoa (TEM) eta partikula tamainaren bidez. Gainera, taipaturako teknika horiekin ateratako ondorioak indartzeko, aldagai anitzeko analisia (osagai nagusi bidezko analisia, PCA) burutuko da.

Esan bezala, bi analisi metodo erabiliko dira kaltzio determinatzeko: Ultramore-Ikusgai espektroskopia eta irudi digitalen analisia. Azken hau metodo azkar, merke eta praktikoagoa bezala aurkezten da. Kaltzioaren determinazioa zilar nanopartikulak zisteina eta kaltzioarekin erreakzionatuz egingo da, non erreakzio horrek kolore aldaketa bat sortuko duen. Irudi digitalen analisisian datuen tratamendua MADDI softwarearen bidez egingo da.

3. **Esperimentala**

3.1. **Materiala**

- Beirazko materiala: bialak, hauspeakin ontziak eta pipetak.
- Mikropipetak (Eppendorf, Espainia).
- Kuartzozko makro kubeta (Hellma).
- Plastikozko semi-mikro kubeta.
- Mikroplakak: 96 zulodun polipropilenoazko plakak (Deltalab).

3.2. **Instrumentazioa eta softwarea**

- Metler Toledo NewClassis MS204S/01 balantza analitikoa.
- Berotze eta irabiatze plaka (Fisher brand).
- Hewlett-Packard HP8453 diodo espektrofotometroa.
- Hewlett-Packard HP Compaq dc7600 SFF ordenagailua (espektrofotometroari akoplatuta).
- Ordenagailua: Lenovo Yoga 500.
- Transmisioko mikroskopia elektronikoa, TEM (TECNAI G2 20 Twin).
- Telefono mugikorreko kamera: Huawei Mate 10.
- MADDI softwarea²⁹.
- ImageJ software librea¹⁹.
- MatLab³⁰.
- Unscrambler (CAMO, Norvegia)²⁰.
- Argi plaka (Stone TH).

3.3. **Erreaktiboak eta disoluzioak**

- Zilar nitratoa (Panreac): AgNO_3 1M.
- Sodio zitratoa (Probus): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.
- Sodio borohidruoa (Sigma-Aldrich): NaBH_4 .
- Sodio hidroxido (Panreac) 1,25 M: 2,5512 g NaOH 50 mL ur distilatuan. Benetako kontzentrazioa 1,2501 M.
- Zilar nanopartikula erosien bi lote (Sigma-Aldrich): 2020ko uztailean eta urrian erosiak.
- Kaltzio kloruro (Merck) 100 mM, 50 mM, 10 mM, 1 mM, 100 μM eta 10 μM : 0,5551 g; 0,2774 g; 0,0554 g CaCl_2 . Benetako kontzentrazioak 100,0 mM; 49,99 mM eta 9,998 mM hurrenez hurren. 9,998 mM disoluziotik 1:10 diluzioa eginez 0,9980 mM. 0,9980 mM disoluziotik 1:10 diluzioa eginez 99,80 μM . 99,80 μM disoluziotik 1:10 diluzioa eginez 9,980 μM .

- Zisteina (Fluka) 50 mM, 25 mM, 10 mM eta 1 mM: 0,3028 g, 0,1514 g; 0,0605 g eta 0,0061 g zisteina. Benetako kontzentrazioak 49,98 mM; 24,99 mM, 9,987 mM eta 1,007 mM hurrenez hurren.

- Ioi metalikoen disoluzioak:

Ondoren aipatzen diren ioi metaliko bakoitzetik 5 mL prestatu dira.

- LiCl (Panreac) 5,19 mM.
- NaNO₃ (Probus) 3,04 mM.
- KNO₃ (Panreac) 3,76 mM.
- Mg(NO₃)₂ · 4H₂O (Panreac) 2,57 mM.
- Ca(NO₃)₂ · 6H₂O (Panreac) 2,88 mM.
- Sr(NO₃)₂ (Merck) 2,36 mM.
- Ba(NO₃)₂ (Probus) 2,68 mM.
- Mn(NO₃)₂ · 4H₂O (Panreac) 3,98 mM
- Cd(NO₃)₂ · 4H₂O (Panreac) 2,20 mM
- Co(NO₃)₂ · 6H₂O (Merck) 2,54 mM.
- Zn(NO₃)₂ · 6H₂O (Panreac) 2,48 mM.
- Ni(NO₃)₂ · 6H₂O (Panreac) 2,08 mM.
- Hg(NO₃)₂ (Merck) 4,80 mM.
- Pb(NO₃)₂ (Probus) 2,66 mM.

3.4. Prozedura

3.4.1. Zilar nanopartikulak

3.4.1.1. Sintesia

Zilar nanopartikulak eginik erostea laborategian sintetizatzea baino garestiagoa izanik, kasu askotan ikerketa taldeek NPak sintetizatzen dituzte. Gainera, sintesia egiteak NPak aplikazio zehatzetarako funtzionalitatezko aukera ematen du. Kasu honetan zilar nanopartikulak sintetizatzeke bost prozedura ezberdin jarraitu dira eta lortutako emaitzak erositako zilar nanopartikulekin (E0 eta E1) konparatu dira.

Aipatu bezala, sintesiak egiteko bost prozedura ezberdin jarraitu dira eta bakoitzari izen bat eman zaio: lehenengo sintesiari S0⁶, bigarrenari S1⁹, hirugarrenari S2³¹, laugarrenari S3³² eta bosgarrenari S4³². Ondoren, prozedura bakoitza azalduko da. Egindako sintesien ezaugarriak eta lortutako laginen izenak 2. taulan laburtu dira.

S0: Sintesi honetan erabili diren erreaktiboak 0,3 mM AgNO₃ (100 mL), % 1 sodio zitrato (2 mL) eta 1 mM NaBH₄ (5 mL) izan dira. Zilar nanopartikulak sintetizatzeke, 200 mL-ko

hauspeakin ontzian jarri den zilar nitratoari zitratoa tantaz tanta gehitu zaio. 5 minutu irabiatzen eduki ondoren, NaBH_4 gehitu zaio tantaz tanta. Azkenik, 2 orduz irabiatu da eta bukatzean 4°C -tan dagoen hozkailuan gorde da.

S1: bigarren sintesi honetan bi errektibo erabili dira: 1 mM AgNO_3 (10 mL) eta 2 mM NaBH_4 (30 mL). Zilar nanopartikulak lortzeko 100 mL-ko hauspeakin ontzian eta izotz bainuan egon den NaBH_4 -ari zilar nitratoa gehitu zaio tantaz tanta. Bukatzeko 3 minutuz irabiatu da.

S2: hirugarren sintesia egiteko erabili diren errektiboak ondorengoak izan dira: 0,001 M AgNO_3 (50 mL) eta % 1 sodio zitrato (5 mL). Nanopartikulak sintetizatzeko zilar nitratoa irakiten jarri da 100 mL-ko hauspeakin ontzian. Jarraitzeko, zitratoa tantaz tanta gehitu eta berotzen jarraitu da kolore aldaketa eman arte, hau da, horia jarri arte. Azkenik, bero-iturritik kendu eta irabiatu egin da giro-tenperatura lortu arte.

S3: kasu honetan sintesia burutzeko bi errektibo erabili dira: 0,05 M AgNO_3 (5 mL) eta 0,05 M sodio zitrato (5 mL). Lehenengo zilar nitratoa 185 mL uretara gehitu da 250 mL-ko hauspeakin ontzi batean eta 3 minutuz irabiatu da (3000 rpm) izotz bainuan. Azkenik, zitratoa gehitu da tantaz tanta eta irabiatzen jarraitu da kolore aldaketa eman arte.

S4: sintesi hau aurrekoaren (S3) oso antzekoa da, baina artikuluan aipatzen da zilar nanopartikulak lortzeko egoera optimoa ondorengoa dela: 0,06 M AgNO_3 (5 mL); 0,01 M sodio zitrato (5 mL); 0,01 M NaBH_4 (5 mL) eta pH 8. Lehenengo zilar nitratoa eta sodio zitratoa 185 mL uretara gehitu eta 3 minutuz irabiatu da (3000 rpm) izotz bainuan. Azkenik NaBH_4 gehitu da tantaz tanta eta irabiatzen jarraitu da kolore aldaketa eman arte. pH- 8ra doitzeko, NaOH 1,25 M bi tanta gehitu zaizkio.

Aipatu behar da kasu guztietan zilar nitratoa papera erabiliz estali dela argi gutxiago jaso dadin, argiarekin AgNO_3 degradatu egiten baita.

2. taula: Ag NPak lortzeko prozedura ezberdinak, prozedura ezberdinekin sintetizatu diren nanopartikula guztien errepikapenak eta bakoitzari eman zaion izena.

*: S1 disoluzioak egindako momentuan, kolore aldaketa (marroira) eman baino lehen.

| Izena | Erreaktiboak | Prozedura | Errepikapenak | erreferentzia |
|-------|---|--|---|---------------|
| S0 | 0.3 mM AgNO ₃ , 100 mL % 1 Sodio zitrato, 2 mL 1 mM NaBH ₄ , 5 mL | <ul style="list-style-type: none"> - Zitratoa AgNO₃-ari eghitu tantaz tanta, 5 min irabiatzen. - NaBH₄ tantaz tanta. - 2 orduz irabiatu - 4°Ctan gorde | Urriak 5: S0.0 Urriak 27: S0.1 Denboraren eragina: S0.0 <ul style="list-style-type: none"> - 28 egunetara: S0.0.0 - 35 egunetara: S0.0.1 | 6 |
| S1 | 1 mM AgNO ₃ , 10 mL 2 mM NaBH ₄ , 30 mL | <ul style="list-style-type: none"> - AgNO₃ tantaz tanta gehitu NaBH₄-ari. - 3 minutuz irabiatu. | Irailak 11: S1.0* <ul style="list-style-type: none"> - Egun batzuetara: S1.0 Urriak 2: S1.1* <ul style="list-style-type: none"> - Egun batzuetara: S1.1 | 9 |
| S2 | 0.001 M AgNO ₃ , 50 mL % 1 Sodio zitrato, 5 mL | <ul style="list-style-type: none"> - AgNO₃ irakiten jarri, zitratoa tantaz tanta gehitu. - Kolore aldaketa ondoren, giro-tenperaturara eramán. | Urriak 5: S2.0 Urriak 27: S2.1 Urriak 27: S2.2 Urriak 28: S2.3 Urriak 28: S2.4 Argiaren eragina: S2.1 <ul style="list-style-type: none"> - Bial gardena, kanpoan: S2.1.0 - Anbar biala, kanpoan: S2.1.1 - Bial gardena, armairuan: S2.1.2 | 31 |
| S3 | 0,05 M AgNO ₃ , 5 mL 0,05 M Sodio zitrato, 5 mL 185 mL ur | <ul style="list-style-type: none"> - AgNO₃ eta ura 3 minutuz izotz bainuan irabiatzen utzi. - Zitratoa gehitu tantaz tanta. | Irailak 15: S3.0 | 32 |
| S4 | 0.06 M AgNO ₃ , 5 mL 0.01 M Sodio zitrato, 5 mL 0.01 M NaBH ₄ , 5 mL Ura -S4.0: 185 mL ur, pH ez da doitu. -S4.1: 185 mL ur orde, 92 mL ur eta bi tanta NaOH 1,25 M pH doitzeko. | <ul style="list-style-type: none"> - AgNO₃, zitratoa eta ura 3 minutuz izotz bainuan irabiatzen utzi. - NaBH₄ gehitu tantaz tanta. - S4.1: NaOH 2 tanta gehitu. | Irailak 15: S4.0 Urriak 27: S4.1 | 32 |

Errepikakortasuna

Sintesi bakoitza hainbat aldiz errepikatu da, behin eta berriz errepikatzean emaitza berdinak lortzen diren ziurtatzeko.

Lehen sintesia (S0) bi aldiz errepikatu da, lehen aldiz 2020ko urriaren 5ean (S0.0) eta bigarren aldiz 2020eko urriaren 27an (S0.1).

Bigarren sintesia (S1) ere, bi aldiz egin da 2020eko irailaren 11n (S1.0*) eta 2020ko urriaren 2an (S1.1*).

Hirugarren sintesiaren kasuan (S2), bost froga egin dira:

- Urriak 5 (S2.0): 10 minutu utzi da berotzen kolore aldaketa eman arte.
- Urriak 27.1 (S2.1): 5 minutu utzi da berotzen kolore aldaketa eman arte.
- Urriak 27.2 (S2.2): 3 minutu utzi da berotzen kolore aldaketa eman arte.
- Urriak 28.1 (S2.3): 5 minutu utzi da berotzen kolore aldaketa eman arte.
- Urriak 28.2 (S2.4): 15 minutu utzi da berotzen kolore aldaketa eman arte.

Laugarren sintesia (S3) behin egin da 2020ko irailaren 15ean (S3.0).

Bosgarren sintesi (S4) hau bi aldiz errepikatu da: 2020ko irailaren 15ean (S4.0) eta 2020ko urriaren 27an (S4.1). Aipatu behar da, 2. taulan agertzen den bezala, lehenengo errepikapenaren kasuan (S4.0) 185 mL ur erabili direla eta pHa ez dela doitu; eta bigarren errepikapenean (S4.1) 92 mL ur erabili direla eta pH NaOH-rekin doitu dela.

Beraz, guztira 12 Ag NP disoluzio egin dira. 2. taulan laburbildu dira egindako errepikapenak eta lortutako laginen izenak.

Denboraren eragina

Ag NPak denborarekin degradatu egin daitezke. Denboraren eragina zilar nanopartikuletan ikusteko, disoluzio bakoitzari espektrofotometroarekin 3 neurketa zaizkie egun desberdinetan:

- Lehen neurketa irailaren 11n (S1.0): bigarren neurketa 52 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 59 egunetara.
- Lehen neurketa irailaren 15ean (S3.0 eta S4.0): bigarren neurketa 48 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 55 egunetara.
- Lehen neurketa urriaren 2an (S1.1): bigarren neurketa 31 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 38 egunetara.
- Lehen neurketa urriaren 5ean (S0.0 eta S2.0): bigarren neurketa 28 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 35 egunetara.

- Lehen neurketa urriaren 27an (S0.1, S2.1, S2.2 eta S4.1): bigarren neurketa 6 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 13 egunetara.
- Lehen neurketa urriaren 28an (S2.3 eta S2.4): bigarren neurketa 5 egunetara eta hirugarrena lehen neurketatik 12 egunetara.

Argiaren eragina

Zilar nanopartikulak sortzean, erreakzionatzen ez duen zilar nitratoa aske geratzen da, eta hau, argiarekiko oso sentikorra da. Horrek esan nahi du argitan jartzen denean erreakzionatu egiten duela. Beraz, hau eguzkiaren argitan edo edozein argi distiratsutan jartzen bada, hidrolizatzen hasiko da. Honek kolore beltz edo marroiko zilar oxidoa eta azido nitrikoa sortzea ekarriko du³³.

Zilar nanopartikuletan argiak duen eragin ikusteko, hirugarren sintesiarekin lortutako nanopartikula disoluzioari, zehazki S2.1-ari, froga desberdinak egin zaizkio. Disoluzioa hiru bialean jarri da: lehenengo biala, kolorega eta gardena, kanpoan utzi da (S2.1.0); bigarrena ere, anbar kolorekoa, kanpoan utzi da (S2.1.1) eta azkena, kolorega eta gardena, armairu barruan gorde da (S2.1.2). Hiru bialak 24 ordu egon dira esandako egoeran.

Espektrofotometroarekin espektroak neurtu dira 12 ordu eta 24 ordu pasa ondoren.

3.4.1.2. Karakterizazioa

3.4.1.2.1. Ultramore-Ikusgai espektroskopia

Esan bezala, zilar nanopartikulak 5 modu desberdinetan sintetizatu dira, sintesiak hainbat alditan errepikatuz. Lortutako nanopartikula guztiak UM-Ikusgai espektroskopia bidez analizatu dira, absortzio espektroak lortzeko eta absortzio maximoa identifikatzeko, ondoren NP guztiak konparatu ahal izateko. Horretarako 3,5 mL-ko kapazitatea daukan kuartzozko makro kubeta erabili da. Espektroak lagina zuzenean gehituta eta 1:2 diluzioa burututa eskuratu dira.

3.4.1.2.2. TEM analisia

Laginetako batzuetan TEM analisia burutu da, izan ere, transmisioko mikroskopia elektronikoak zilar nanopartikulen forma, agregazioa eta tamaina ikusteko aukera ematen baitu. Hortaz, atera diren irudiak ondorengo zilar nanopartikulenak izan dira: E1, S0.0, S1.1 eta S4.1. Irudiak eskala ezberdinarekin eta zati ezberdinetatik atera dira.

TEM analisia TECNAI G2 20 Twin ekipoarekin egin da, horretarako 200 kV eta LaB₆ filamentua erabiliz. Laginaren tanta bat karbono puruzko film batek estalitako kobrezko sareta batean (300 Mesh motakoa) zabaldu da, eta ondoren giro-tenperaturan lehortu da.

3.4.1.2.3. Partikula tamainaren kalkulua

Aurretik lortutako TEM irudiak erabiliz, sintesi bakoitzean sortu diren nanopartikulen partikula tamaina lortu da ImageJ software librea erabiliz. Aplikazio honekin nanopartikula bakoitzaren tamaina banan-banan neurtzen da disoluzioaren batez besteko nanopartikula tamaina zein den jakiteko.

Neurtu diren nanopartikulak ondorengo disoluzioenak izan dira: E1, S0.0 eta S1.1. Esan behar da nahiz eta S4.1 disoluzioaren TEM irudia izan, ezin izan dela partikula tamaina lortu, irudian ez baitira nanopartikula esferikoak ikusten, aurrerago 4.1.2.2 atalean ikusiko den bezala.

3.4.1.3. Aldagai anitzeko analisisa

Hainbat sintesi ezberdin egin direnez, hauen antzekotasun eta ezberdintasunak ikusteko, PCA egin da. Modu horretara ikusi ahal izan da prozedura berdinarekin sintetizatu diren NPak multzokatzen diren, bata besteengandik hurbil edo urrun dauden eta NP erosiengana gehien zein hurbiltzen den. Aldagai anitzeko analisisa “The Unscrambler” (CAMO, Norvegia) programarekin egin da.

3.4.2. Kaltzioaren determinazioa

3.4.2.1. Ultramore-Ikusgai espektroskopia

Sarreran aipatu bezala, zilar nanopartikulei zisteina eta kaltzioa gehitzean, kolore aldaketa ematen da. Ag NPek kolore horia dute, baina zisteina eta kaltzioa gehitzean, kolorea horitik morera aldatzen da. Geroz eta kaltzio eta zisteina kontzentrazioa altuagoa izan, kolore aldaketa handiagoa izango da⁶. Kolore aldaketa horretaz baliatuz, kaltzioa determinatuko ahal izango da. Gertatzen den kolore aldaketa ez da denboran konstantea, beraz, hau aztertzeko denboran zeharreko neurketak egin dira espektrofotometroan. Neurketa zinetiko hauek 20 minutukoak izan dira eta 30 segundoro espektro osoak pilatzen joan dira. Maximoak 393 nm (kolore horia) eta 545 nm (kolore morea) inguruan daude. Neurketa horiek plastikozko semi-mikro kubeta batean egin dira, eta honen bolumen totala 1000 µL da.

Kalibrazio zuzena lortzeko Ca²⁺/zisteina erlazio desberdinekin frogatu da, ikusteko ea zeinekin lortzen den zuzenik hoberena. Zisteina kontzentrazioa berdin mantentzen da, kaltzio kontzentrazioa aldatzen joaten delarik. Ag NP erosiak eta sintetizatuak 1:2 diluzioa egin ondoren erabili dira eta guztietan 800 µL Ag NP gehitu dira kubetan. Lehenengo egindako frogak zilar nanopartikula erosiak izan dira. Behin NP erosiak kalibraketa on bat lortzean, nanopartikula sintetizatuekin egin dira frogak, emaitza berdinak lortzen diren ikusteko.

Ultramore-Ikusgai espektroak eta TEM irudiak ikusiz (4.1.2 atalean), aukeratu diren nanopartikula sintetizatuak S0.0 izan dira.

Ag NP erosiakin bi saiakera burutu dira:

1. saiakera: Ag NPei 100 μ L zisteina 25 mM gehitu zaie, zisteinaren kontzentrazioa 2,5 mM izateko. Kaltzio patroia disoluzioetatik bolumen ezberdinak gehitu dira Ca^{2+} 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM, 1 mM; 1,5 mM; 2 mM eta 2,5 mM kontzentrazioak izateko. Erabili diren Ca^{2+} patroia disoluzioak 1, 10 eta 50 mM izan dira.

2. saiakera: bigarren froga hau berdin burutu da, baina zisteina eta kaltzio kontzentrazioak aldatu egin dira: 100 μ L zisteina 10 mM gehitu dira, zisteina kontzentrazioa 1 mM izateko eta 10 mM kaltzio patroia disoluziotik bolumen ezberdinak gehituz ondorengo kontzentrazioak lortu dira: 0,1 mM; 0,18 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM eta 1 mM.

Kaltzio kontzentrazio bakoitzarekin UM-Ikus zinetikak eginez, kolore aldaketaren progresioa neurtu ahal izan da denbora ezberdinetan.

Ondoren, Ag NP erosiakin lortutako emaitzak ikusita, NP sintetizatuekin (S0.0) erosiakin egin den bigarren froga burutu da, zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM eta 1 mM gehituz.

3.4.2.2. TEM analisia

Transmisioko mikroskopia elektronikoarekin ere, Ag NPei zisteina eta kaltzio gehitzean nanopartikuletan ematen den aldaketa ikus daiteke. Ag NP erosiakin irudi bakarra ateratu zaie, zisteina 1 mM eta kaltzioa 0,5 mM gehituz. Eta NP sintetizatuen kasua bi irudi ateratu dira, bata S0.0 nanopartikulei zisteina 1 mM bakarrik gehituz eta bestea S0.0 nanopartikulei zisteina 1 mM eta kaltzioa 0,5 mM gehituz.

3.4.2.3. Irudi digitalen analisia

Irudi digitalen analisia burutzeko 400 μ L ko bolumenak gehitu dira mikroplaketan. Analisi hau zilar nanopartikula sintetizatuekin soilik egin da. Orain arte egin diren neurketak guztietan bezala, hemen ere S0.0 Ag NP sintetizatuak erabili dira. Kasu honetan irudiak telefono mugikorrarekin egin dira, ondoren MADDI softwarean prozesatu ahal izateko.

Aurreko froga guztietan bezala, Ag NPak 1:2 diluzioa egin ondoren erabili dira. 320 μ L zilar nanopartikula gehitu dira putzu guztietan, bolumen totala 400 μ L izanik. Tarte lineala lortzeko, bi saiakera egin dira:

1. saiakera: putzu guztietan 320 μL Ag NP % 50 eta 40 μL zisteina 50 mM gehitu dira, zisteina kontzentrazioa 5 mM izan dadin. Ondoren lehen putzuan izan ezik, Ca^{2+} bolumen ezberdinak gehitu dira patroi disoluzio ezberdinetatik 0-10 mM kontzentrazio tartea osatzeko. Erabili diren Ca^{2+} patroi disoluzioak 10, 50 eta 100 mM izan dira.

3. taula: Mikroplaketan egin den lehen saiakera Ag NP erosiekin, zisteina 5 mM eta kaltzio 0-10 mM kontzentrazio tartean.

| | | Zutabea | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|---------|-----|------|-----|---|------|-----|---|-----|----|
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| [Ca ²⁺], mM | | 0 | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 1,75 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |

2. saiakera: putzu guztietan 320 μL Ag NP % 50 gehitu dira. Lehen eta bigarren ilaretan, bigarren putzutik aurrera zisteina kontzentrazio berdinak gehitu dira ilara bakoitzean: lehenengo ilaran 20 μL zisteina 1 mM eta bigarreanean 40 μL zisteina 1mM, zisteina kontzentrazioa 50 eta 100 μM izanik hurrenez hurren. Ondoren lehen bi putzuetan izan ezik, Ca^{2+} bolumen ezberdinak gehitu dira patroi disoluzio ezberdinetatik 0-10 μM kontzentrazio tartea osatzeko. Erabili diren Ca^{2+} patroi disoluzioak 10 eta 100 μM izan dira. Hirugarren ilaran, aldiz, bigarren putzutik aurrera 20 μL zisteina 10 mM gehitu dira, zisteina 500 μM izateko. Hirugarren putzutik aurrera, Ca^{2+} bolumen ezberdinak gehitu dira 10 mM patroi disoluziotik, 0-500 μM kontzentrazio tartea osatzeko. 4. taulan mikroplakan gehitutako errektiboaren eskema agertzen da.

4. taula: Mikroplaketan egin den bigarren saiakera Ag NP erosiekin, zisteina 50, 100 eta 500 μM eta kaltzio kontzentrazio ezberdinekin.

| | | | Zutabea | | | | | | | | | |
|--------|---|--------------------------------------|---------|---|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Lerroa | 1 | [Ca ²⁺] μM | 0 | 0 | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | |
| | 2 | [Ca ²⁺] μM | 0 | 0 | 0,1 | 0,5 | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | |
| | 3 | [Ca ²⁺] μM | - | 0 | 0 | 1 | 10 | 25 | 100 | 250 | 500 | |

Aurretik aipatu bezala, Ag NPei zisteina eta kaltzioa gehitzean, kolore aldaketa denborarekin aldatzen joaten da. Beraz, lerro bakoitzari Ag NPak, zisteina eta kaltzioa gehitu bezain bizkor,

irudiak atera dira. Kolore aldaketa denboran zehar ikusteko, irudiak momentuan, 5 minutu, 10 minutu eta 20 minutu pasa ondoren atera dira.

Irudiak altuera berdinetik eta gelako argiztapen berdinarekin atera dira erroreak saihesteko. Koloreak hobeto ikusteko, argi plaka erabili da.



14. irudia: disoluzioak mikroplakan jarriak eta mikroplaka argi plakan kokatua.

3.4.2.4. Interferentzien azterketa

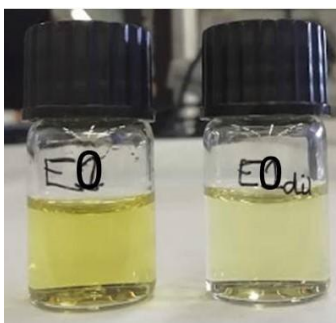
Kaltzioa sistema biologikoan dagoen metal kationiko garrantzitsua eta ugaria da, eta hau erraztasun handiz elkartzen da aminoazidoei. Kaltzioak eta zisteinak sortzen duten kolore aldaketan oinarrituz, ikusi nahi da ea beste metalak ere kolore aldaketa hau emateko gai diren. Erabilitako metalak ondorengoak izan dira: Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} eta Pb^{2+} . Ikerketa batean ikusi da kaltzioak kolore aldaketa sortzen duela, baina beste metalek, ordea, ez dute aldaketarik eman⁶.

4. Emaitzak eta eztabaida

4.1. Zilar nanopartikulak

4.1.1. Sintesia

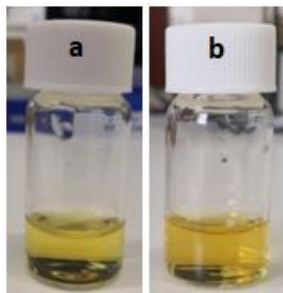
Aurretik aipatu bezala, Ag NPak sintetizatzeko bost prozedura ezberdin erabili dira eta prozedura bakoitza hainbat aldiz errepikatu da. Disoluzio bakoitzari argazkia atera zaio, Ag NP erosiak kolorea konparatu ahal izateko.



15. irudia: zilar nanopartikula erosiak. Ezkerreko disoluzioa diluitu gabea dago, eta eskuinekoa erdira (1:2) diluitua.

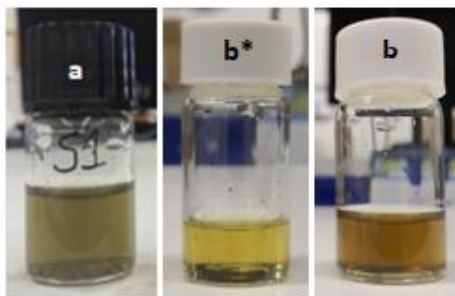
Ondoren agertuko diren disoluzioen argazkiak, diluitu gabeko Ag NP desberdinenak izango dira.

Lehen sintesiaren kasuan, S0, S0.0 sintesiarekin lortu den nanopartikula kolorea hori distiratsua izan da, begi-bistaz NP erosien oso antzekoa. S0.1 disoluzioak kolore ilunagoa du, baina ez da erosien oso ezberdina.



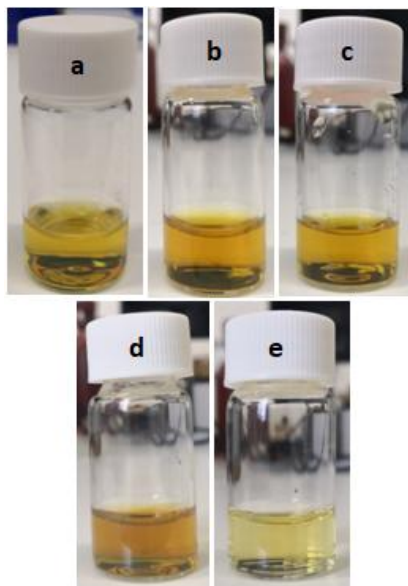
16. irudia: S0 prozedurarekin sintetizatutako bi Ag NP disoluzioak: S0.0 (a) eta S0.1 (b).

Bigarren sintesiarekin, S1, lortu den disoluzio kolorea hori distiratsu izan da (17. irudia, b*) hasiera batean, baina denbora pasatzen joan den heinean marroixka jartzen hasi da (a, b). Hala ere, esan behar da ez dela guttiz marroia jarri eta egun batzuetara kolorea egonkortu egin dela. Beraz, prozedura honekin sintetizatutako NPren disoluzioen koloreak Ag NP erositatik aldentzen dira.



17. irudia: S1 prozedurarekin sintetizatutako Ag NP-ak: S1.0 (a), S1.1* (b*) eta S1.1 (b) Ikusten da denboraren poderioz Ag NP disoluzioa kolorez aldatu dela, baina kolorea egonkortu egin da.

Hirugarren sintesiaren kasuan, S2, erreferentzian ez da zehazten noiz gehitu behar den zitratoa, burbuila txikiak sortzen hasten direnean edo guttiz irakiten dagoenean³¹. Beraz, hau arazo bat bihurtzen da eta oso nabaria da, beheko irudien koloreetan ikus daitekeen bezala, sintesia errepikatzen denean. Berotan dagoen denboraren arabera kolore hori iluna, hori indartsua edo argiagoa lortzen da, eta ez denez zehazten zenbat denboraz egon behar den, S2.0, S2.1 eta S2.2 disoluzioek kolore hori indartsua dute, S2.3-ak hori iluna du eta S2.4-ak hori argia. Orokorrean, NP erosiek duten kolorea baino ilunagoa dute, S2.4 disoluzioak izan ezik, argiagoa baita.



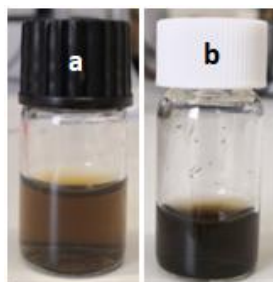
18. irudia: S2 prozedurarekin lortutako Ag NP disoluzioak: S2.0 (a), S2.1 (b), S2.2 (c), S2.3 (d) eta S2.4 (e).

Laugarren sintesia (S3) burutzean, lortu den kolore aldaketa oso txikia izan da; hau da, hori oso argia lortu da. NP erosiakin konparatzen bada, hori argiegia da, ia kolorgea.

















19. irudia: S3 prozedurarekin sintetizatutako Ag NP disoluzioa: S3.0.

Laugarren sintesiarekin, S4, NaBH_4 gehitzean, botatako lehen tantarekin disoluzioak kolore marroia hartzen du segituan. Esan bezala, S4.0 disoluzioan 185 mL ur gehitu direnez eta S4.1 disoluzioan 92 mL, lehen disoluzioa diluituagoa dagoela ikusten da. Hala ere, bi kasuetan kolore marroiko disoluzioak lortu dira, beraz, disoluzioak hauek dira Ag NP erosiaren koloretik gehien urruntzen direnak.



20. irudia: S4 prozedurarekin sintetizatutako Ag NP-ak: S4.0 (a) eta S4.1 (b).

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| <p>E0/E1</p>  | | | | |
| <p>S0.0</p>  | <p>S0.1</p>  | | | |
| <p>S1.0</p>  | <p>S1.1*</p>  | <p>S1.1</p>  | | |
| <p>S2.0</p>  | <p>S2.1</p>  | <p>S2.2</p>  | <p>S2.3</p>  | <p>S2.4</p>  |
| <p>S3.0</p>  | | | | |
| <p>S4.1</p>  | <p>S4.1</p>  | | | |

21. irudia. Erositako eta sintetizatutako nanopartikulen argazkiak (izenen kodigoak 2. taulan, 22. orrialdean)

4.1.2. Karakterizazioa

4.1.2.1. UM-Ikus espektroskopia

NP-en ezaugarri nabarmenetako bat NP disoluzioen kolorea izanik, disoluzioen UM-Ikus espektroskopia erabili da lortutako NPen arteko antzekotasun/ezberdintasunak aztertzeko asmoz. Horretarako, erositako bi NP loteen (E0 eta E1) eta sintetizatutako NPren absortzio espektroak neurtu dira 250-650 nm artean. Kasu guztietan Ag NPei 1:2 diluzioa egin ondoren neurtu dira absortzio espektroak.

E0 eta E1 NP erosiaren absortzio espektroetan ikusi da bi espektroak gainezari egiten direla. Beraz, esan daiteke bi disoluzioak oso antzekoak direla. Sintesi ezberdinekin egindako NP disoluzioen espektroak NP erosiarekin konparatzeko, E0 NP erabili da.

Prozedura ezberdinekin sintetizatutako NP disoluzioekin lortu diren espektro guztiak 22. irudian irudikatu dira.

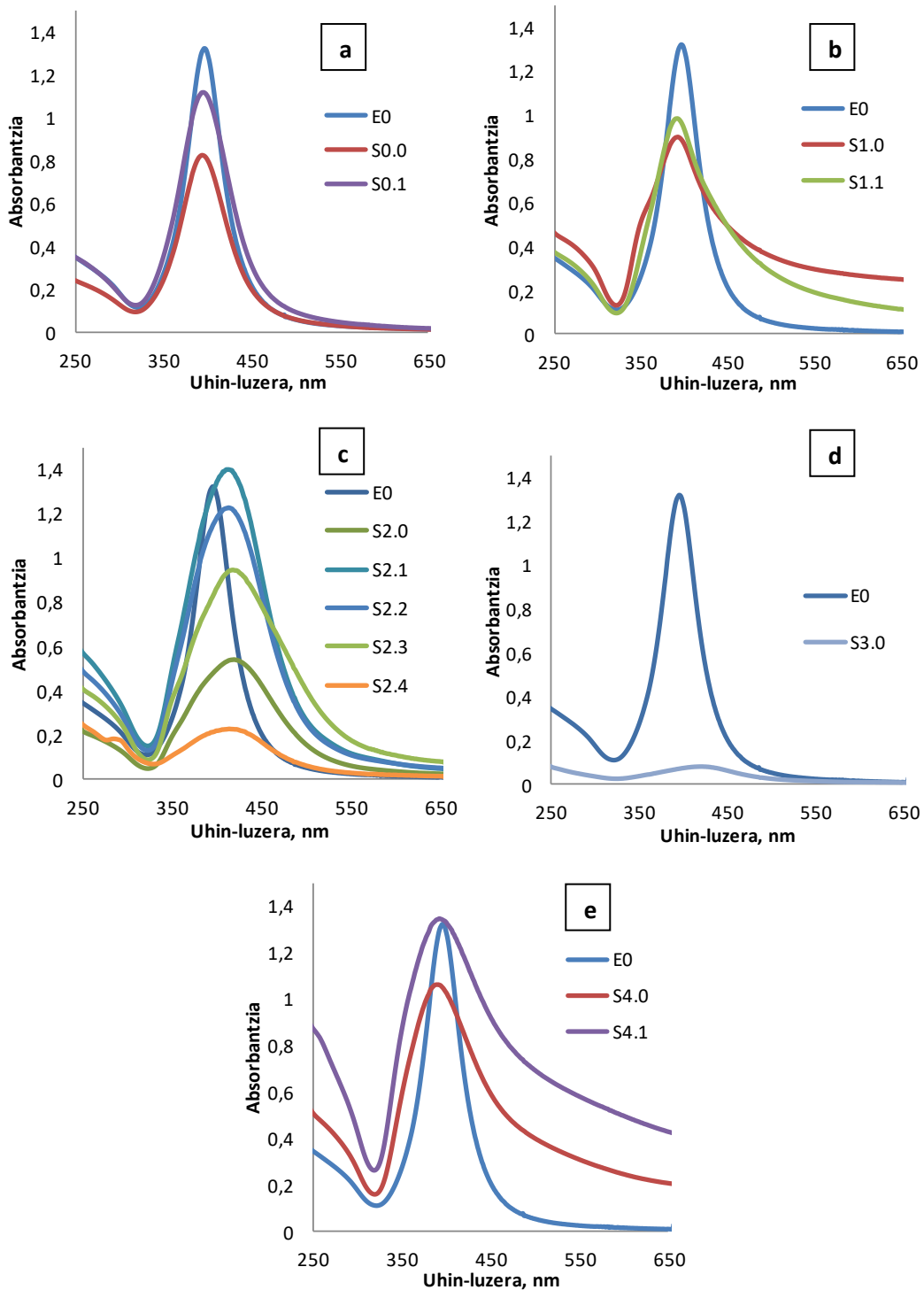
Espektroei begiratu, ikusten da erosiarekin gehien hurbiltzen zaien Ag NP disoluzioa S0 prozedurarekin egindako bi sintesiak direla: S0.0 eta S0.1. Nahiz eta bi hauen intentsitatea erosiarena baino txikiagoa izan, espektroen formak oso antzekoak dira.

S1 disoluzioen espektroetan ikusten da, erosiarekin konparatu, espektroen formak ezberdinak direla. Nahiz eta S1 sintetizatuen intentsitatea txikiagoa izan, bandaren forma ere desberdina da, hau da, sintetizatuen espektroek banda zabalagoak dituzte. Gainera, S1-en espektroetan 360 nm inguruan igoera bat dago eta 430 nm tik aurrera banda zabaltzen doa, erositan gertatzen ez dena.

S2 sintesiarekin lortutako disoluzioen espektroetan ikusten da espektroak bi taldeetan banatzen direla, alde batetik S2.0, S2.3 eta S2.4 eta bestetik S2.1 eta S2.2. Horietan ikus daiteke espektroen formak oso antzekoak direla, nahiz eta intentsitate ezberdina izan. Sintetizatutako prozedura honekin argi ikusten da sintesi bera berdin errepikatzea zaila dela, espektroak beraien artean desberdinak baitira. NP erosiaren espektroekin konparatzen badira, ikusten da kasu guztietan erosiaren banda estuagoa dela S2 sintetizatuen baino.

S3 prozedurarekin lortutako espektroari eta NP erosiaren espektroari begiratu, ikus daiteke intentsitatean eta forman erabat desberdinak direla. S3.0 sintetizatuen intentsitatea oso baxua da erosiarekin konparatzen bada, hortaz, esan daiteke sintetizatutako NP guztietatik intentsitate baxuena duena disoluzioa S3.0 dela.

Azken sintetizatuen kasuan (S4), espektroei erreparatzen badiegu, ikusten da intentsitate antzekoak dituztela, baina espektroko bandaren forma ez dela erosien berdina. Sintetizatuen espektroen banda absortzio maximora iristean, espektroa asko zabaltzen da, erosiakin gertatzen ez dena.



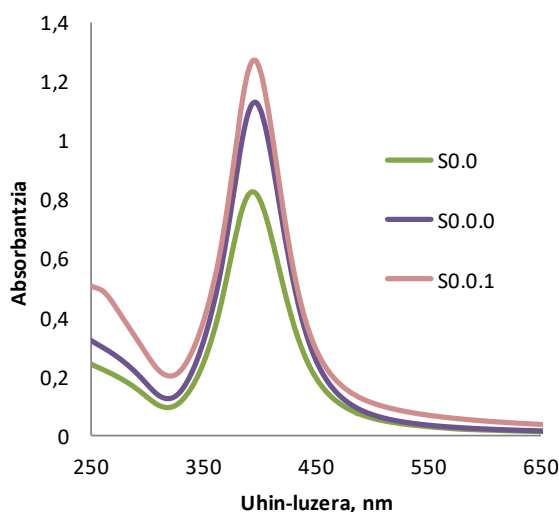
22. irudia: Prozedura ezberdinekin sintetizatutako Ag NP-ren eta Ag NP erosien UM-Ikus absortzio espektroak, 250-650 nm tartean. Lehen sintesiaren S0 (a), bigarren sintesia S1 (b), hirugarren sintesia S2 (c), laugarren sintesiaren S3 (d) eta bosgarren sintesiaren S4 (e) errepikapen ezberdinen absortzio espektroak.

Orokorrean, ikusten da sintesi berdinarekin sortutako Ag NPren absorzio espektroak oso antzekoak direla nahiz eta intentsitatea alda daitekeen batetik bestera. Pentsa daiteke disoluzio batzuk kontzentratuagoak daudela beste batzuk baino, horregatik intentsitate desberdintasuna. S3-ren kasuan ez da lortu sintesia berriz errepikatzea eta S2-ren kasuan, aurretik aipatutako prozedura arazoengatik, argi ikusten da disoluzioak desberdinak direla.

Denboraren eragina

Sintetizatutako S0.0 nanopartikulei 3 neurketa egin zaizkie espektrofotometroarekin 3 egun desberdinetan: lehenengo neurketa urriaren 5ean izan zen (S0.0), bigarren neurketa 28 egun ondoren (S0.0.0) eta hirugarren neurketa lehen neurketa eta 35 egunetara (S0.0.1). Horrela, nanopartikuletan denboraren eragina ikusi ahal izango da. Denbora horretan zehar NP horiek hozkailuan gordeta egon dira.

Ondorengo irudian (24. irudia) ikusten da denborarekin absorzio espektroaren forma ez dela aldatu, baina absorbantziaren intentsitatea denbora gehiago pasatu ahala, handitzen joan dela. Beraz, nanopartikulen ezaugarriak edota portaera aldatu egingo dira denborarekin.



24. irudia: S0.0 Ag NP disoluzioen absorzio espektroak, egindako unean, egin eta 28 egunetara (S0.0.0) eta egin eta 35 egunetara (S0.0.1).

Argiaren eragina

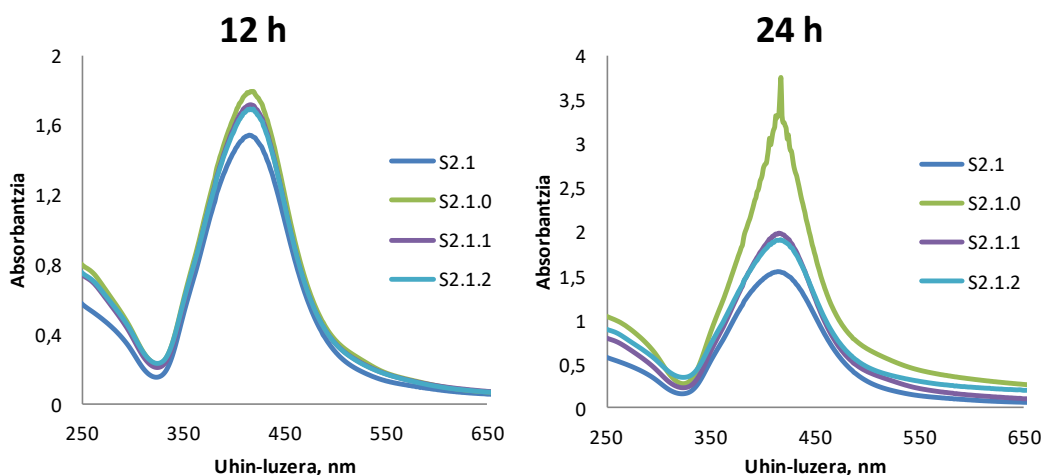
S2.1-ari froga desberdinak egin zaizkio argiaren eragina ikusteko. Disoluzioa hiru bialeetan jarri da:

- Lehenengo biala, kolorega eta gardena, kanpoan utzi da (S2.1.0).
- Bigarrena, anbar kolorekoa, kanpoan utzi da (S2.1.1).

- Azkena, kolorega eta gardena, armairu barruan gorde da (S2.1.2).

S2.1 Ag NP disoluzioa aipatutako moduan bialean jarri ondoren, espektrofotometroarekin espektroak neurtu dira 12 ordu eta 24 ordu pasa ondoren. S2.1 Ag NP disoluzioaren lehen neurketa azaroaren 2an egin da eta bialean dauden disoluzioen neurketak azaroak 3 eta 4 bitartean egin dira.

S2.1 disoluzioaren lehen neurketaren eta 12 ordu ondoren lortutako absortzio espektroei begiratzuz, 23. irudian ikusten da hiru bialeako disoluzioen absortzio intentsitatea handitu egin dela. Disoluzioaren lehen neurketarekiko desberdintasuna asko nabarmentzen da, pote gardenean eta kanpoan (S2.1.0) dauden nanopartikulek 24 orduz argiaren presentzia jarraitzean dutenean. Aipatutako horren intentsitatea asko handitu da; beste bi bialen espektroak aitzitik, ia ez dira aldatu.



23. irudia: S2.1 Ag NP-ren hiru bialen UM-Ikus absortzio espektroak. Ezkerrean espektroak 12 h ondoren neurtuak eta eskuinean 24 h ondoren. S2.1 azaroaren 2an nerutua, S2.1.0 kanpoan egon den bial kolorega eta gardena, S2.1.1 kanpoan egon den anbar koloreko biala eta S2.1.2 armairu barruan egon den bial kolorega eta gardena.

Laburbilduz, pote gardenean eta kanpoan uzten badira Ag NPak, espektroaren intentsitatea asko handitzen da, NPak degradatu egin baitira denborarekin. Beraz, hasierako nanoprtikuletara gehien gerturaten diren NPak, armairu barruan egon diren Ag NPak izan dira eta, gehien aldatu direnak, berriz, pote gardenean eta kanpoan egon direnak izan dira.

4.1.2.2. TEM analisia

Zilar nanopartikulen tamaina eta morfologia transmisioko mikroskopia elektronikoaren (TEM) bidez egiaztatu dira. Lehenik, Ag NP erosien irudiak lortu dira, ondoren sintetizatutako NPren irudiekin konparatu ahal izateko (24. irudia). Aurreko atalean ikusitako UM-Ikus absortzio espektroak begiratzuz, erabaki da S0.0, S1.1 eta S4.1 nanoparikulen TEM irudiak ateratzea. Esan

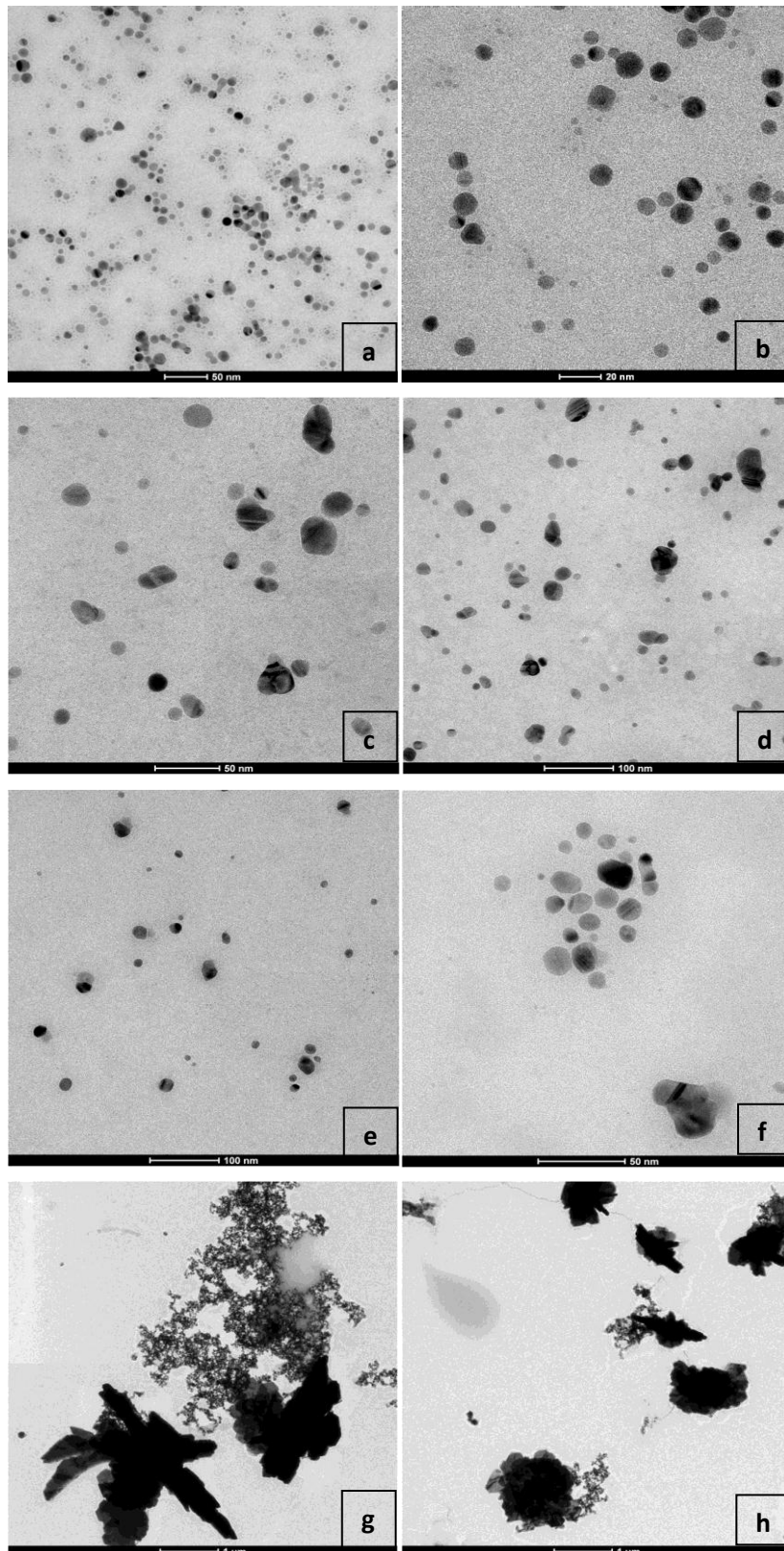
bezala S0.0 izan da NP-erosiei gehien gerturatu zaien disoluzioa, koloreari eta UM-Ikus espektroiei begiratuz. S1.1 nanopartikulei ere TEM irudia atera zaie S0.0-rekin konparaketa egiteko. Eta azkenik S4.1 NPei ere atera zaie irudia, hauek baitira ezberdinenak diren nanopartikulak, koloreari eta UM-Ikus espektroei erreparatzen bazaie.

24. irudian ikusten da NP erosien nanopartikulen tamaina guztiak antzekoak direla eta ia ez dagoela NPren arteko agregaziorik, hau da monodispersatuak daude.

S0.0 nanopartikuletan, antzematen da partikula tamaina orokorrean ez dela berdina, baina ez da horrenbeste aldatzen. NPren forma ere ez da erosiak bezain esferikoa. Ikusten da erosien nanopartikulak baino handiagoak direla S0 nanopartikulak, eta, NPren artean agregazio pixka bat dagoela nabari da.

S1.1 NPren kasuan ere, begi-bistaz ikusten da NPak ez direla guztiz esferikoak eta partikula tamaina, orokorrean, ez dela horren berdina, baina ez da horrenbeste aldatzen. 24. irudian ikusten da nanopartikula hauek (S1.1) erosiekin alderatuz pixka bat handiagoak direla eta, gainera, nanopartikulen artean agregazio pixka bat dagoela, S0.0-rekin gertatu den berdina.

S4 sintesiarekin TEM irudietan argi ikusten da sortu diren nanopartikulak ez direla esferikoak eta tamaina handiko egiturak sortu direla. Beraz, sintesi honekin ez dira espero diren zilar nanopartikulak lortzen.



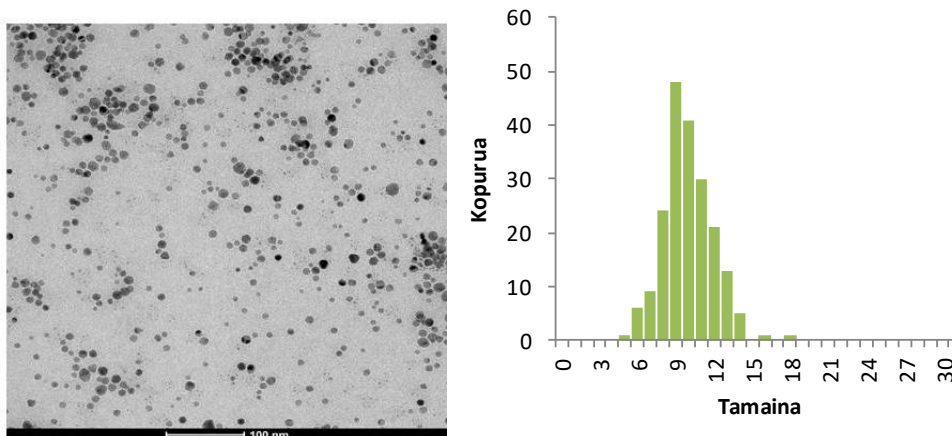
24. irudia: NP erosien TEM irudiak , 20 nm-ko (a) eta 50 nm-ko (b) eskalan. S0.0 Ag NP-ren TEM irudiak , 50 nm-ko (c) eta 100 nm-ko (d) eskalan. S1.1 Ag NP-ren TEM irudiak , 100 nm-ko (e) eta eskuinean 50 nm-ko (f) eskalan.

S4.1 Ag NP-ren TEM irudiak, 1 μm-ko (g,h) eskalan. Irudiak disoluzio bereko zona ezberdinetan atera dira.

4.1.2.3. Partikula tamainaren kalkulua

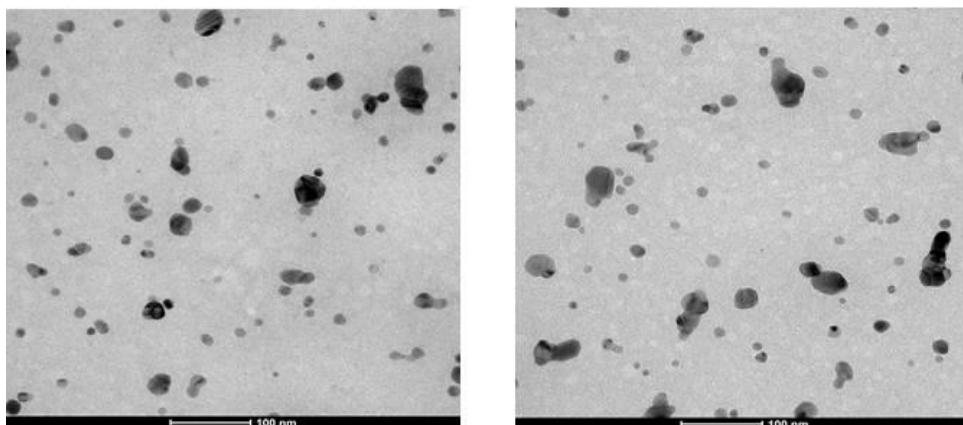
Aurreko atakean lortutako TEM irudiekin, ImageJ software libre erabiliz partikula tamainaren kalkulua egin da.

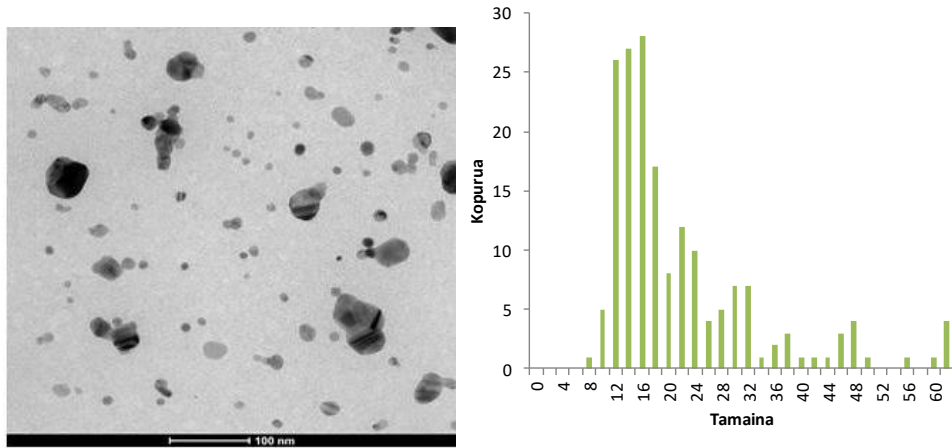
Zilar nanopartikula erosien (E1) partikula tamaina, irudi bakarrarekin kalkulatu da. Kasu honetan 200 nanopartikula desberdin neurtu dira 100 nm-tako eskalan. Lortutako NP tamainaren batez bestekoa 9 ± 2 nm izan da.



25. irudia: Partikula tamainaren kalkulurako erabili den Ag NP erosien TEM irudia 100 nm-ko eskalan eta partikula tamainaren grafikoa, X ardatzean partikula tamaina eta Y ardatzean partikula kopurua daudelarik.

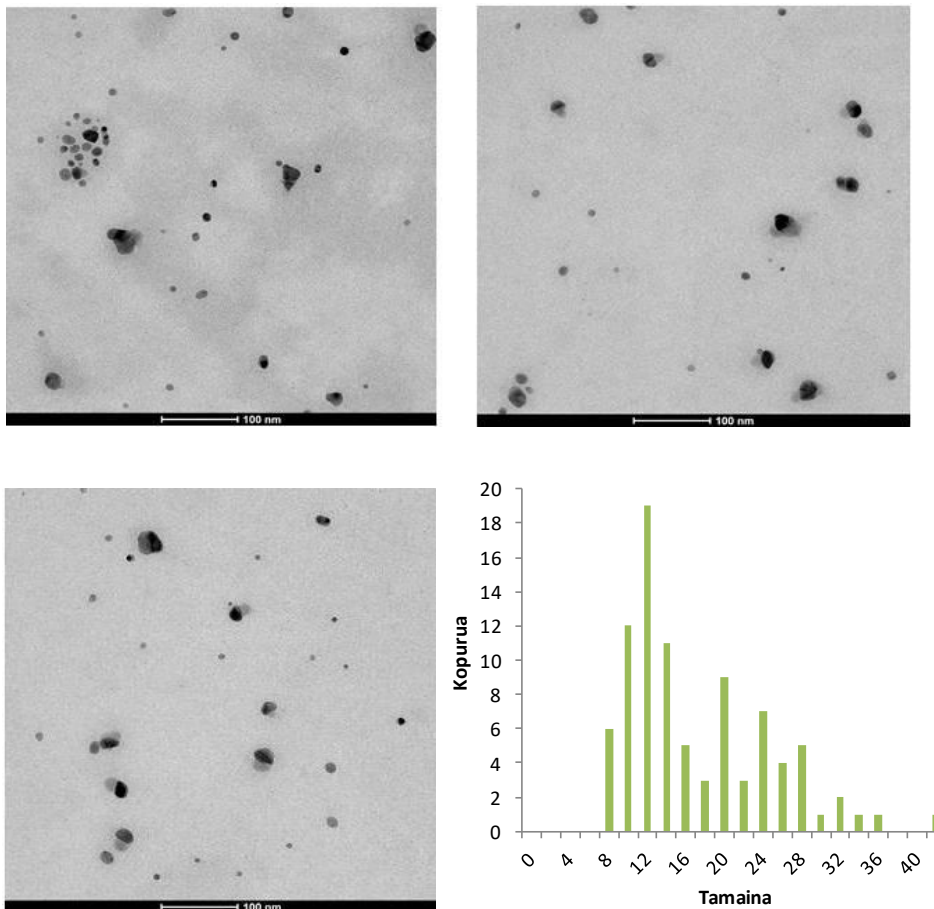
Lehenengo sintesiarekin lortutako nanopartikulen (S0.0) partikula tamaina hiru irudiekin kalkulatu da. Bigarren disoluzio honetan hiru irudi horietako 180 nanopartikula neurtu dira 100 nm-tako eskalan. Kasu horretan, NPren batez besteko tamaina 21 ± 12 nm izan da.





26. irudia: S0.0 Ag NP-en partikula tamaina lortzeko erabilitako 3 TEM irudiak 100 nm-ko eskalan eta partikula tamainaren grafikoa, X ardatzean partikula tamaina eta Y ardatzean partikula kopurua daudelarik.

Bigarren sintesiaren egindako nanopartikulen (S1.1) kasuan ere partikula tamaina hiru irudiekin kalkulatu da. Bigarren disoluzio honetan hiru irudi horietako 90 nanopartikula neurtu dira 100 nm-tako eskalan. Lortutako NP tamainaren batez bestekoa 16 ± 8 nm-takoa da.



27. irudia: S1.1 Ag NP-en partikula tamaina lortzeko erabilitako 3 TEM irudiak 100 nm-ko eskala eta partikula tamainaren grafikoa, X ardatzean partikula tamaina eta Y ardatzean partikula kopurua daudelarik.

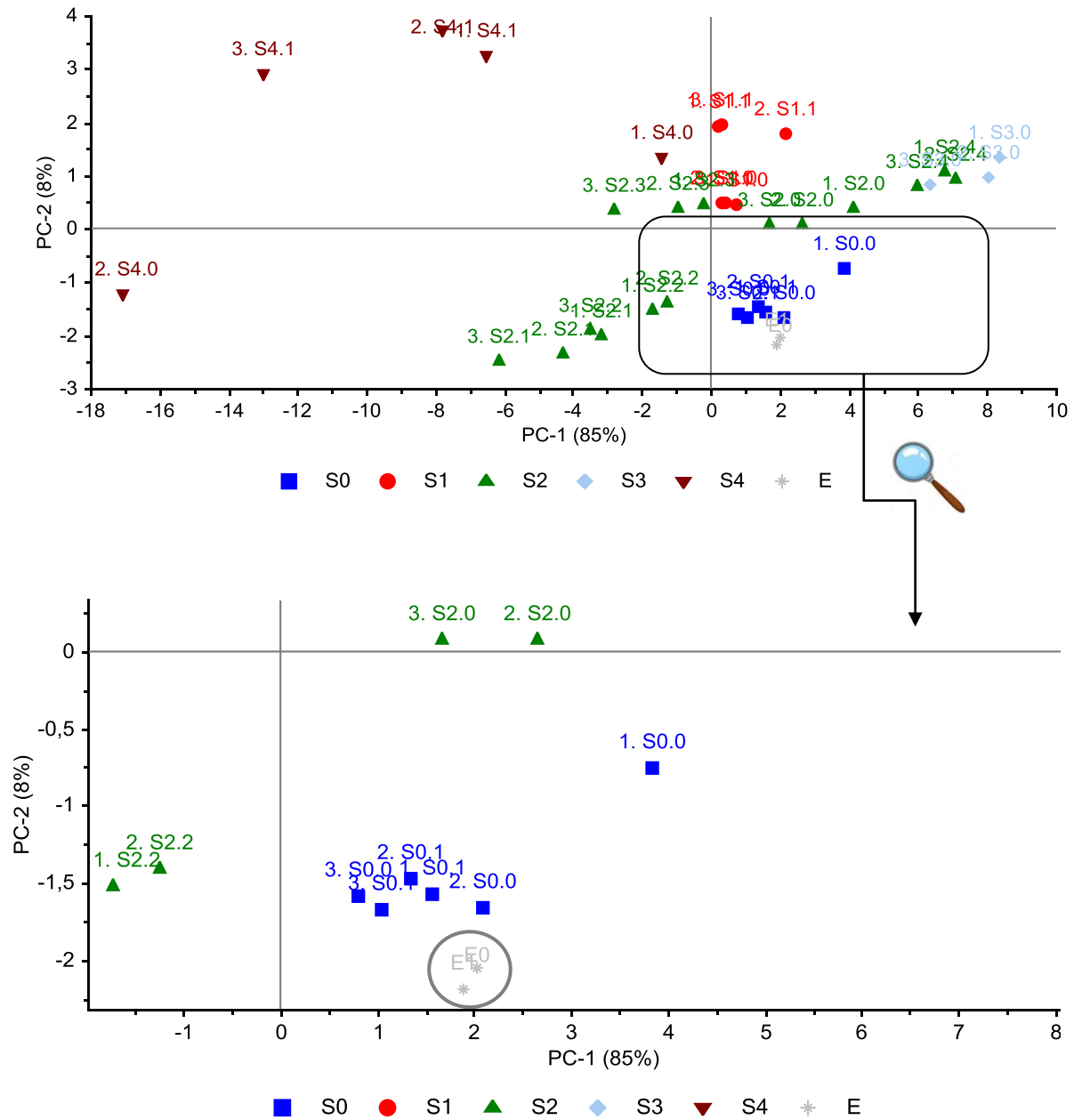
TEM irudiak erabiliz, lortutako batezbesteko partikula tamaina eta tamainen banaketari erreparatuz, esan daiteke erositako Ag NP eta sintetizatutako NPren tamainak ezberdinak direla, baita hauen homegeneitatea ere. Gainera, laborategian sintateizatutako partikula tamainaren desbideratze estandarra handiagoa da erositakoena baino.

4.1.3. Aldagai anitzeko analisisia

PCAk laginak beren artean antzekoak edo ezberdinak direnaren hurbilketa bat ematen du. Hau da, laginak multzokatuak eta gertu agertzen badira, antzekoak direla adierazten du, eta oso sakabanatuak badaude, berriz, ezberdinak direla esaten du. Aldagaiekin, ordea, guztietatik pisu gehien duten aldagaiek zien diren jakin daiteke, hau da garrantzi gehien izango duten aldagaiak.

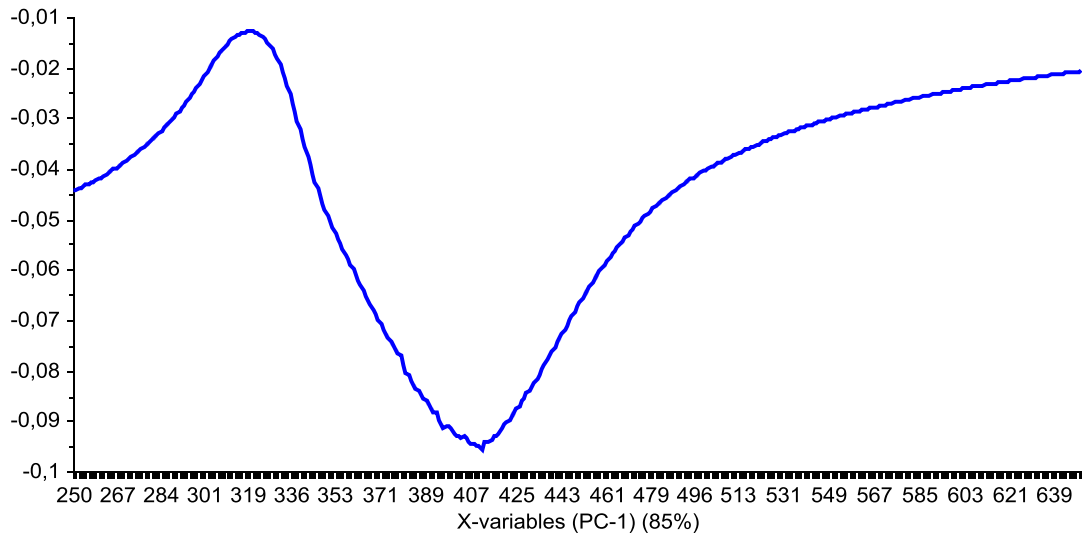
PCA lortutako sintesi guztiekin eta sintesi bakoitzarekin denboran zehar egindako 3 neurketekin osatu da, laginak Ag NP disoluzio ezberdinak izanik eta aldagaiak absortzio espektroaren uhinluzerak (250–650 nm bitartekoak) izanik. Disoluzio bakoitzaren lehen neurketari 1 zenbakia jarri zaio aurretik, bigarren neurketari 2 zenbakia eta hirugarren neurketari 3 zenbakia.

Laginetan ikusten da (28. irudia) S4 prozedurarekin eginiko sintesi guztiak besteengandik nahiko aldentuta daudela. S2-ak oso sakabanatuak daude beren artean, beraz, horrek adierazten du beren artean desberdinak direla. S1 eta S0-ak multzokatuak ikusten dira, baina erosiengandik hurbilen dauden sintesiak S0 dira.



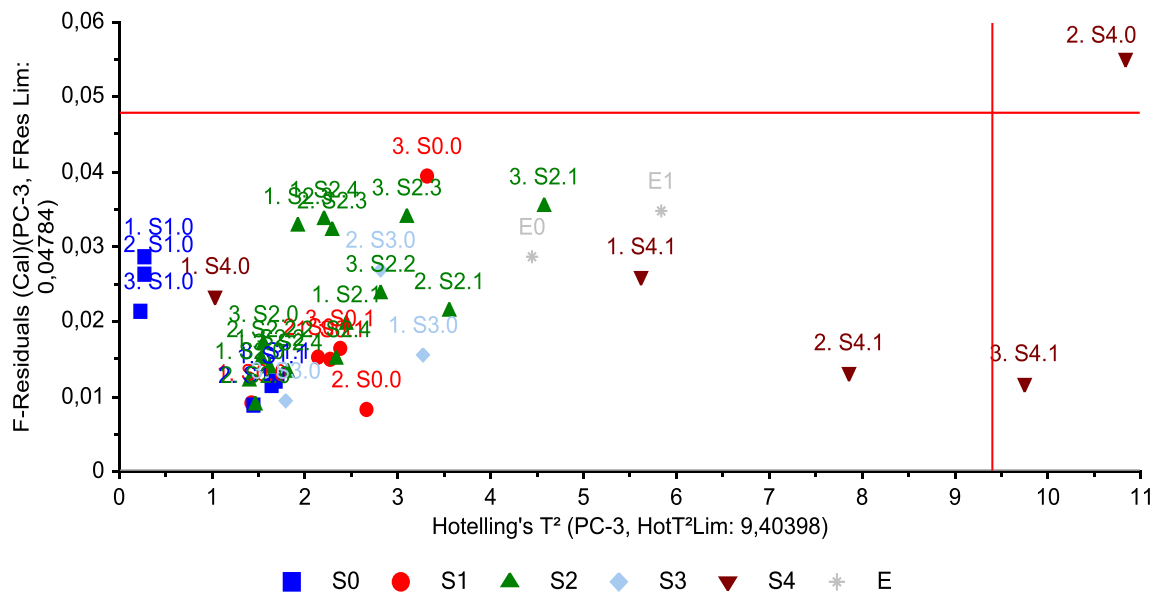
28. irudia: PCA Scores (laginak) grafikoak. Goikoa, lagin guztiak agertzen diren grafikoa. Behekoa, Ag NP erosien ondoan aurkitzen diren laginen grafikoa, zoomarekin.

Loadings irudian (29. irudia) aldagaiei begiratzeko bazea, ikusten da pisu gehien duten uhin-luzerak 410 nm inguruan daudenak direla. Hain zuzen ere, argi horia absorbantzen den uhin-luzera.



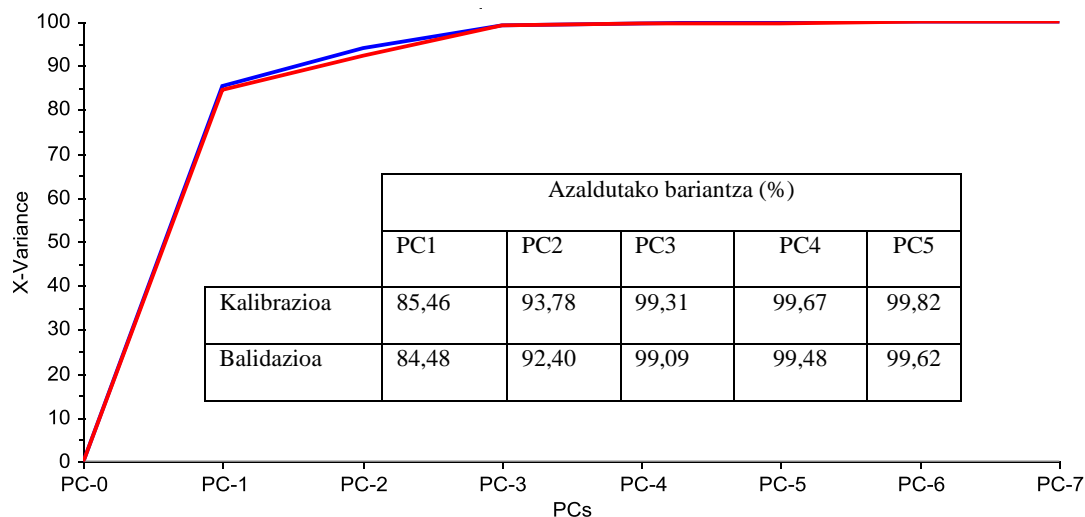
29. irudia: PCA loadings (aldagaiak) grafikoa, 250-650 nm bitartekoa.

Bi outlier daudela antzeman daiteke 30. irudian, baina denak S4 prozedurarekin burututako sintesiei dagozkie. Esan bezala, S4 sintesiak NP erosiei gehien aldetzen zaizkien sintesiak dira kolorean , absorzio espektroetan eta nanopartikulen itxuran (TEM irudietan).



30. irudia: PCA influence grafikoa, S4 eta S2 outlier-ak azaltzen direlarik.

Azaldutako bariantzari buruz, esan daiteke PC bakar batekin % 85,46 azaltzen dela, bi PC-rekin % 93,78 eta hiru PC-rekin jada % 99,31 azaltzen dela.

31. irudia: PCA *Explained Variance*-ren (azaldutako bariantza) taula eta grafikoa.

4.2. Kaltzioaren determinazioa zilar nanopartikulak erabiliz

4.2.1. Metodoaren optimizazioa

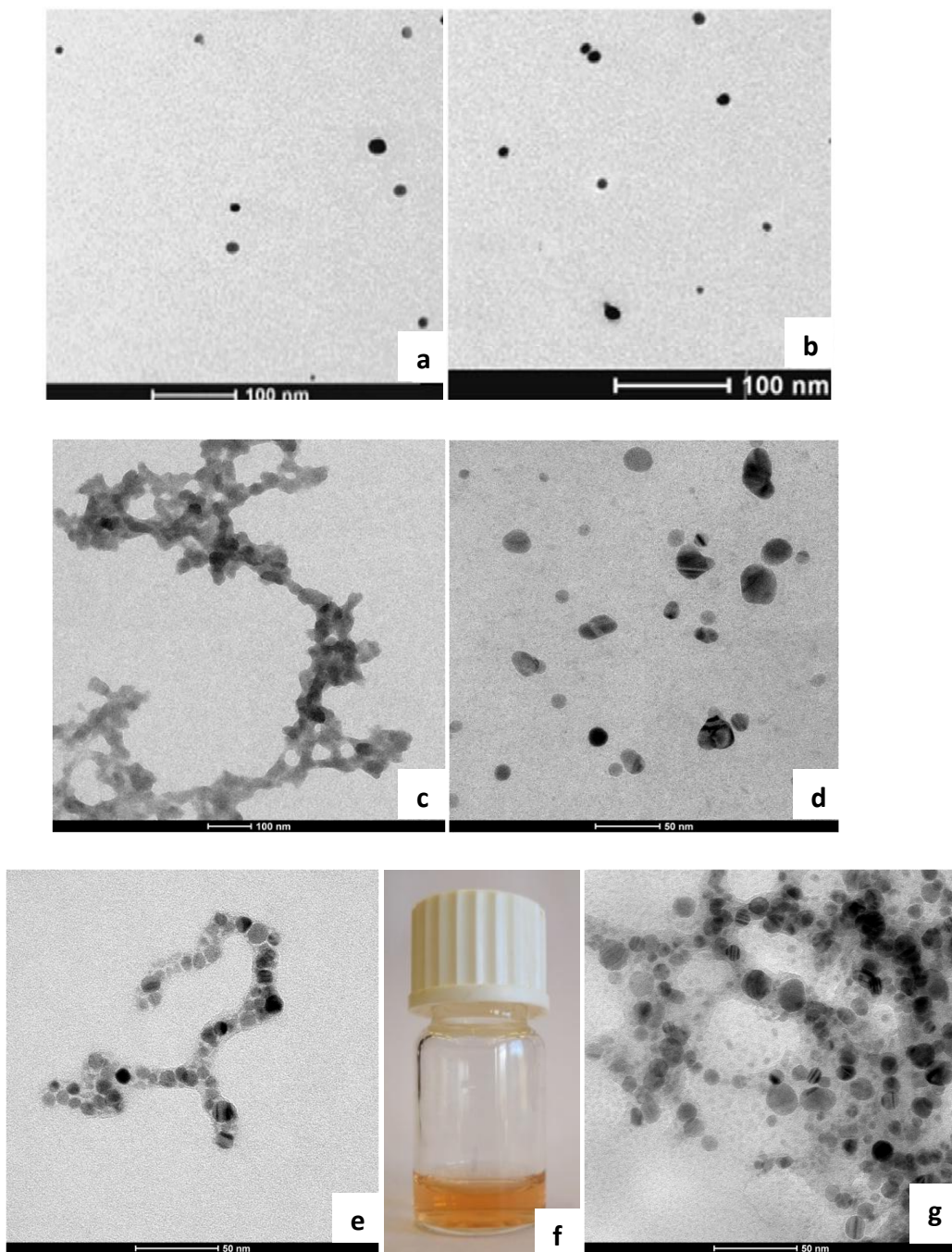
4.2.1.1. TEM analisisia eta UM-Ikus espektroskopia

Bibliografian aurki daitezkeen ikerketa lanen arabera, zilar nanopartikulei kaltzioa eta zisteina gehitzean kolore aldaketa ematen da, Ag NPak agregatu egiten direlako^{6,7}. Lan honetan kaltzio ioien determinazioa egiteko aukera ikertu da, bai erositako NPak erabiliz eta baita laborategian sintetizatutako S0.0 nanopartikulak erabiliz. Determinazio honen lehen pausoa NP ezberdinen TEM irudien arteko konparaketa egitea izanda. Irudi horietan nanopartikuletan ematen den aldaketa ikus daiteke zisteina edota kaltzioa gehitzen direnean.

TEM irudiak aurrerago dagoen 35. irudian lortutako tarte linealaren arabera atera dira. Ag NP erosiei zisteina 1mM eta Ca^{2+} 0,5 mM gehitu zaie. Ag NP sintetizatuekin, berriz, zisteina 1 mM soilik eta zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,5 mM gehitu zaie. NP erosiei zisteina soilik gehitutako irudirik ez denez atera, erreferentzia batetik lortu dira irudi horiek: Ag NP soilik eta Ag NPari zisteina 0,5 mM gehituz⁶. Horrela aipatutako NP horiek eta S0.0 NP sintetizatuek zisteina gehitzean duten portaera konparatu ahal izan da.

32. irudiari erreparatzen badiogu, ikusten da Ag NP erosietan zisteina soilik gehitzean (32. irudia (b)), ez dela agregaziorik ematen, hau da nanopartikulak monodispersatuak egoten jarraitze dute, lehen TEM irudian (a) ikusten den bezala. Gainera, aurrerago dagoen 33. irudian ikus daiteke zisteina soilik gehitzean, absortzio espektroan ez dela aldaketa handirik nabaritzen, soilik intentsitatea txikitzen da. Baina, zisteina eta kaltzioa gehitzean (32. irudia (c)), aldaketa handia ematen da, kate moduko agregazioak sortzen baitira. 33. irudiari erreparatzen badiogu

berriz, kasu honetan ikusten da aldaketa handia nabaritzen dela, 393 nm inguruko absorbantzia txikitzen dalako (kolore horia) eta 545 nm ingurukoa handitu egiten delako (kolore morea).



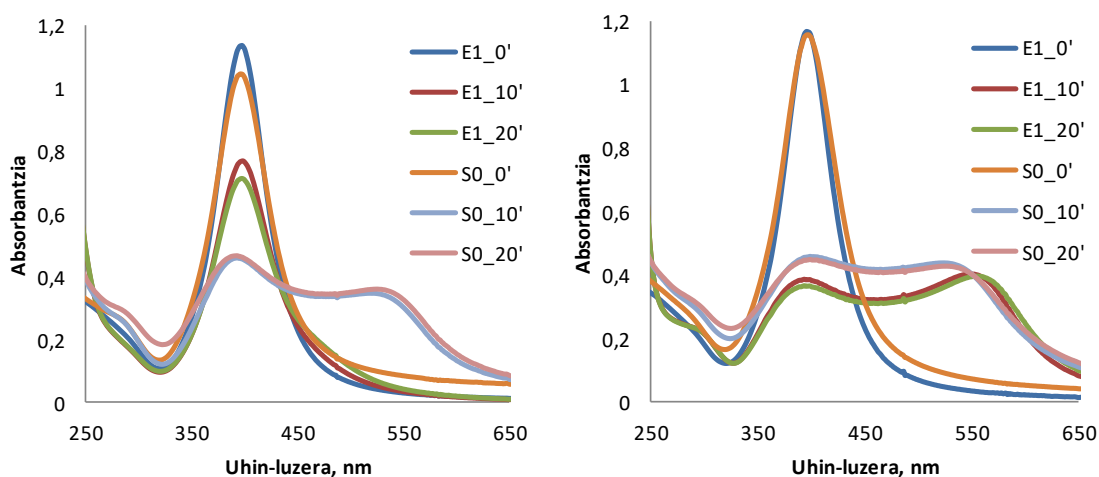
32. irudia: Ag NP-ren TEM irudiak zisteina edota kaltzioa gehitzean. Ag NP bakarrik (a)⁶, Ag NP + zisteina 0,5 mM (b)⁶, Ag NP erosiak + zisteina 1 mM + Ca²⁺ 0,5 mM (c), S0.0 sintetizatutako Ag NP bakarrik (d), S0.0 Ag NP eta zisteina 1 mM (e), Ag NP % 50 eta zisteina 1 mM disoluzioa bialean (f) eta S0.0 Ag NP, zisteina 1 mM eta Ca²⁺ 0,5 mM (g).

Sintetizatuen kasuan, ez da erosiekin gertatzen den gauza bera ikusten. Zisteina bakarrik gehitzean (32. irudia (e)), nanopartikulen agregazio pixka bat ikusten da, jada NPak ez dira monodispersatuak. Gainera, kolore aldaketa bat ikusten da (32. irudia (f)), erosieta gertatzen

ez dena eta teorikoki ere gertatu beharko ez zena⁶. 33. irudiari erreparatzen badiogu, S0.0 nanopartikulei zisteina gehitzean, 393 nm inguruko absorbantzia txikitu egiten da eta 545 nm inguruko absorbantzia handitu egiten da, kaltzioa gehitzean soilik gertatu beharko zena. Zisteina eta kaltzioa gehitzean (32. irudia (g)), aldiz, agregazioa handiagoa dela antzematen da, eta erosiekin bezala kate moduko agregatu handiak sortzen dira.

Horrela, NP sintetizatuen jokaera NP erosiekiko oso desberdina dela frogatu da.

Zisteina edota kaltzioa gehitzean Ag NP erosien eta sintetizatuen portaera ikusteko, TEM irudiez gain UM-Ikus absorzio espektroak egin daitezke. Aurreko atalean ikusi den bezala, Ag NP sintetizatuei zisteina gehitzean kolore aldaketa bat ematen da. Hau argi ikusten da 33. irudian NP sintetizatuei zisteina gehitzean, absorzio espektroa aldatu egiten delako, 545 nm inguruan gehiago absorbatzen baitu. Ez da berdina gertatzen NP erosiekin, zisteina soilik gehituz ez baita kolore aldaketa eman behar⁶. Zisteina eta kaltzioa gehitzean, berriz, bi nanopartikulek 545 nm inguruan absorbatzen dute, teorikoki gertatu behar den bezala⁶.



33. irudia: Ag NP erosi eta S0.0 sintetizatuak soilik zisteina 5 mM-ekin ezkerrean. Ag NP erosi eta S0.0 sintetizatuak zisteina 5 mM eta Ca²⁺ 2,5 mM-ekin eskuinean.

Zisteinarekin kolore aldaketa emateak sintetizatutako nanopartikuletan arazoak ekar ditzake kaltzioa determinatzeko, neurtzen den kolore aldaketa osoa ez baita izango soilik kaltzioak sortutakoa.

Zisteina bakarrik gehitzearen eragina kontuan hartuta eta kalibrazio zuzena eraikitze asmotan, saiakera desberdinak egin dira.





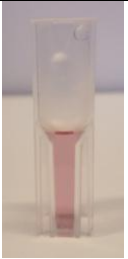


Kaltzio kontzentrazio bakoitzarekin UV-Ikus absorbantzia espektroen zinetikak eginez, kolore aldaketaren progresioa neurtu ahal izan da denbora ezberdinetan.

Erosiekin bi saiakera burutu dira:

- **1. saiakera**

Zisteina 2,5 mM izateko, 100 µL zisteina 25 mM gehitu dira. Ca²⁺ kontzentrazioak 0,1-2,5 mM tartekoak izateko, eta erabilitako kaltzio patroiz disoluzioak 1, 10 eta 50 mM izan dira.

5. taula: Ag NP erosiakin burututako lehen saiakera, zisteina 2,5 mM eta kaltzio 0,1-2,5 mM kontzentrazio tartean




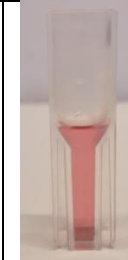

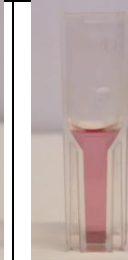
| | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|--|---|---|
| [Zis], mM | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| [Ca ²⁺], mM | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 |
| Kolorea |  |  |  |  |  |  |  |

5. taulako irudiak begiratzen badira, baliteke kolore progresio bat ikustea kaltzio kontzentrazio baxuenetan. Baina kaltzio kontzentrazioa handitzen doan heinean, kolorearen aldaketa geroz eta gutxiago nabari da.

- **2. saiakera**

Zisteina 1 mM izateko, 100 µL zisteina 10 mM gehitu dira. Ca²⁺ kontzentrazioak 0,1-1 mM tartekoak izateko, 10 mM kaltzio patroiz disoluzioa erabili da bolumen ezberdinetan.



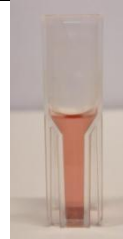


6. taula: Ag NP erosiakin burututako bigarren saiakera, zisteina 1 mM eta kaltzio 0,1-1 mM kontzentrazio tartean.

| | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|--|---|---|
| [Zis], mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| [Ca ²⁺], mM | 0,1 | 0,18 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
| Kolorea |  |  |  |  |  |  |

Kasu honetan, 6. taula begiratzuz ikusten da hasierako hiru kaltzio kontzentrazioek (0,1; 0,18 eta 0,25 mM) antzeko kolore laranja dutela eta azken hiru kontzentrazioek ere (0,5; 0,75 eta 1 mM) antzeko kolore morea dutela.

S0.0 sintetizatuekin, aldiz, saiakera bakarria egin da: zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,1-1 mM bitartean.

7. taula: S0 urriak 5 Ag NP sintetizatuekin burututako saiakera, zisteina 1 mM eta kaltzio 0,1-1 mM kontzentrazio tartean.

| | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|--|---|
| [Zis], mM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| [Ca^{2+}], mM | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 |
| Kolorea |  |  |  |  |  |

Azken froga honetan, begi-bistakoa da ia kolore aldaketarik ez dagoela. Lehen eta azken kaltzio kontzentrazioei begiratzuz (0,1 eta 1 mM), kolore aldaketa handiagoa ikusten da, baina tarteko kaltzio kontzentrazioen koloreak antzekoak dira.

4.2.1.2. Kalibrazio zuzenaren eraikuntza eta bere balidazioa²⁴

Metodo baten balidazioak azaltzen du ea erabili den metodo analitikoak egokia den bete nahi den helbururako. Horretarako hainbat parametro erabiltzen dira, hala nola linealtasuna, detekzio eta kuantifikazio muga eta zehaztasuna.

- Linealtasuna

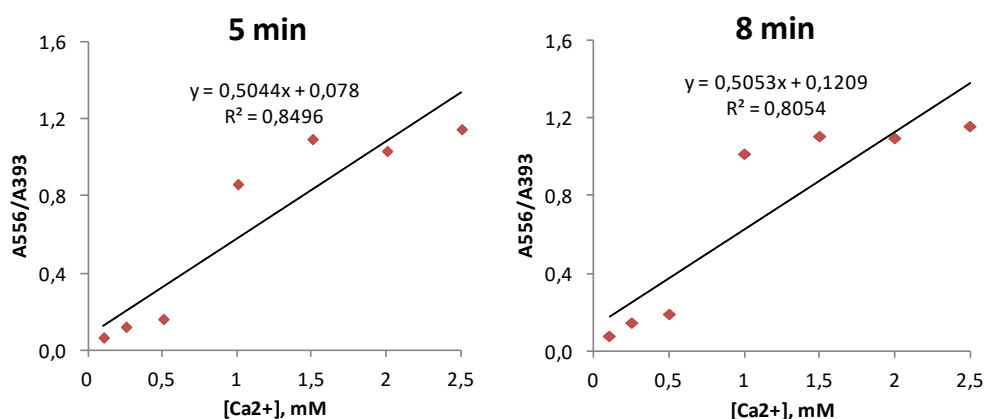
Parametro honek kalibrazio zuzen bat zein ondo egokitzen den lerro zuzen batera neurtzen du. Gainera, kontzentrazio tarte batean, kalibrazio zuzenetik lortzen den erantzuna analito kantitatearen proportzionala izan behar dela adierazten du.

Linealtasunaren azaltzeko modu bat, oso ohikoa dena, korrelazio-koefizientearen (R^2) karratua da. R^2 -ak 1 baliotik oso gertu egon behar du doikuntza lineal bat irudikatzeko, hau da, geroz eta balioa 1etik gertuago egon, hobe izango da kalibrazio zuzena. Orokorrean, R^2 -ren balioak egokiak izango dira 0,995 edo altuagoak direnean.

Hau aztertzeko, bi absorbantzien arteko erlazioa kaltzio kontzentrazioaren aurrean irudikatu da. Absorbantzia hauek absorptzio espektroen maximoei begiratzuz aukeratu dira. Ag NPak duten

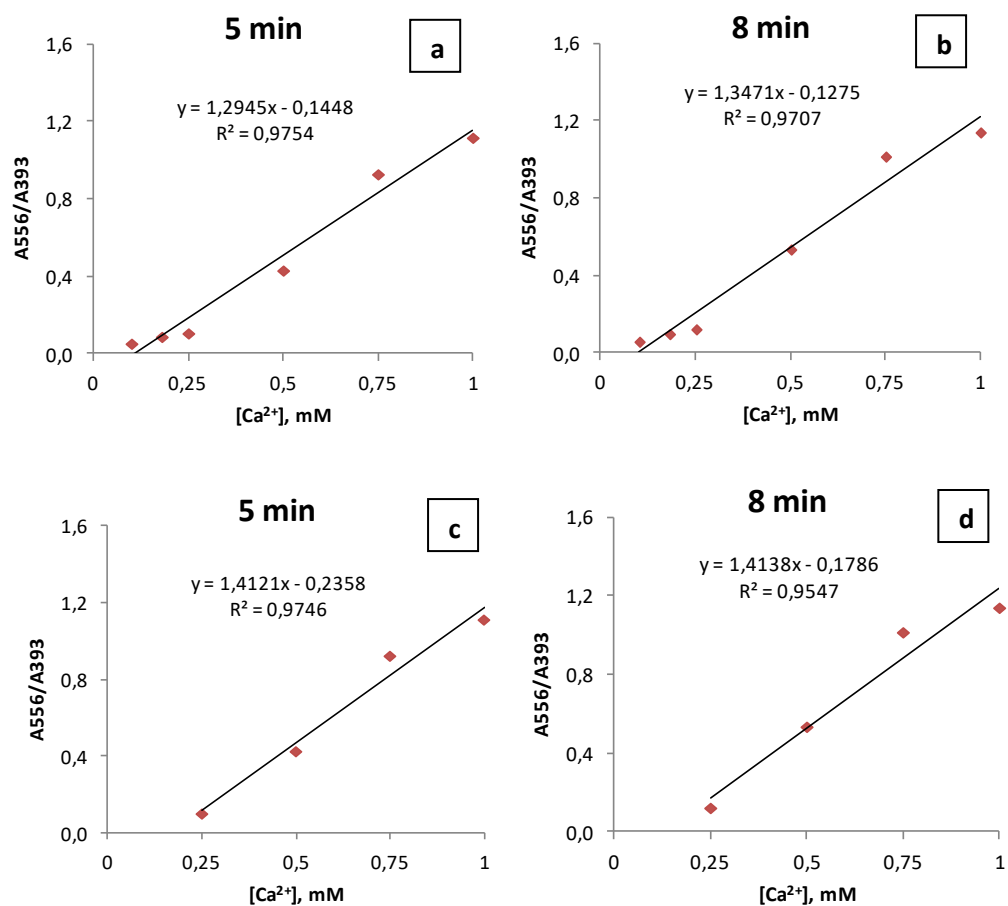
kolore horiak 393 nm inguruan absorbatzen du, eta Ag NPei kaltzioa eta zisteina gehitzean, sortzen den kolore moreak 545 nm inguruan absorbatzen du. Beraz, bi absorbantzia erlazio desberdin erabili dira: A_{545}/A_{393} eta A_{556}/A_{393} , non lehengoa ikertzaile batzuek proposatu duten⁶ eta bigarrena froga moduan burutu den lan honetan. Emaitza hoberenak eman dituen absorbantzia erlazioa A_{556}/A_{393} izan da.

Ag NP erosiekin egin den lehen saiakeran 34. irudian ikus daiteke 5 minutu eta 8 minutu pasa ondoren. Kasu honetan, bi joera antzematen dira, 3 kontzentrazio baxuenekoek (0,1-0,5 mM) zuzen bat jarraitzen dute eta 4 altuenekoek (0,5-2,5 mM) beste bat. Saiakera horrekin, ez da lortu kalibrazio zuzen egoki bat, ez baita zuzen batera ongi egokitzen, eta, gainera, korrelazioak ez dira oso onak.



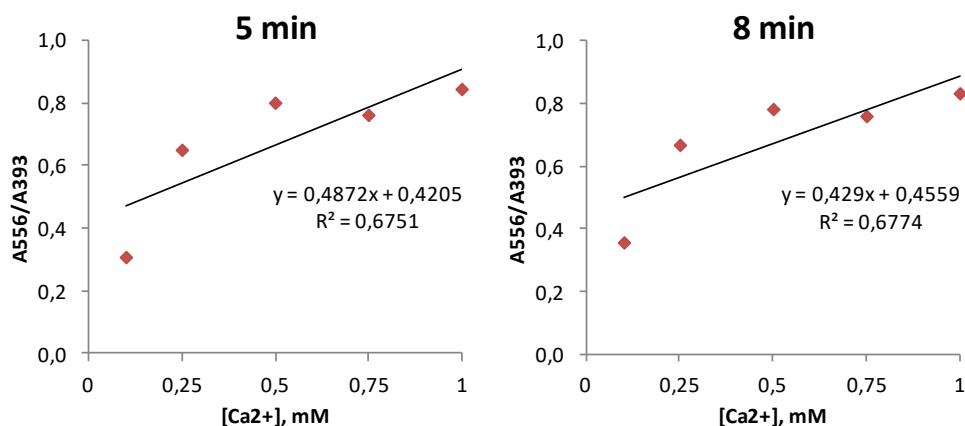
34. irudia: Ag NP erosiak, zisteina 2,5 mM eta kaltzioa 0,1-2,5 mM bitartean gehituz lortutako grafikoak eta ekuazioak. Ezkerrekoa 5 minutu pasa ondoren neurtua eta eskuinekoa 8 minutu ondoren. X ardatzean kaltzioa kontzentrazioa irudikatu da eta Y ardatzean 556 eta 393 uhin-luzeren absorbantzia erlazioa irudikatu da.

Erosiekin egindako bigarren saiakeran lortutako kalibraketa zuzena hobeto egokitzen zaio zuzen bati. Emaitza hoberenak kaltzio gehitu eta 5 eta 8 minutu ondoren lortu dira, eta bi horietatik hobereana 5 minutu ondoren lortutakoa izan da. 35. irudiaren (a) eta (c) grafikoei begiraturaz, ikusi da detekzio muga (51. orrialdean kalkulatu: $C_{LD} = 0,21 \text{ mM}$) (a) grafikoan erabilitako kontzentrazio tartearen gainera dagoela. Beraz, (a) grafikoa ez da egokia izango. (c) grafikoa, ordea, detekzio muga gainera dago eta honekin lortzen den korrelazioa nahiko ona da, nahiz eta kontzentrazio tartea ez oso handia izan. Hortaz, aipatutako kalibrazio zuzen hau lortu den hobereana izan da.



35. irudia: Ag NP erosiak, zisteina 1 mM eta kaltzioa 0,1-1 mM bitartean gehituz lortutako grafikoak eta ekuazioak 5 minutu pasa ondoren neurtua (a) eta 8 minutu ondoren (b). Ag NP erosiak, zisteina 1 mM eta kaltzioa 0,25-1 mM bitartean gehituz lortutako grafikoak eta ekuazioak 5 minutu pasa ondoren neurtua (c) eta 8 minutu ondoren (d). X ardatzean kaltzioa kontzentrazioa irudikatu da eta Y ardatzean 556 eta 393 uhin-luzeren absorbantzia erlazioa irudikatu da.

Nanopartikula erosiekin zuzen hoberena zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,25-1 mM tartean lortu denez, S0.0 nanopartikula sintetizatuekin froga berdina burutu da. 36. irudian ikusten da sintetizatuekin ez dela lortu kontzentrazio tarte osoarekin zuzen bat. Hasierako 3 kontzentrazioetan (0,1-0,5 mM) linealtasun joera dagoela dirudi, baina tarte txiki batean soilik mantentzen da, kontzentrazio handienetan joera hau galdu egiten baitelako.



36. irudia: S0.0 Ag NP sintetizatuak, zisteina 1 mM eta kaltzioa 0,1-1 mM bitartean gehituz lortutako grafikoak eta ekuazioak. Ezkerrekoa 5 minutu pasa ondoren neurtua eta eskuinekoa 8 minutu ondoren. X ardatzean kaltzioa kontzentrazioa irudikatu da eta Y ardatzean 556 eta 393 uhin-luzeren absorbantzia erlazioa irudikatu da.

- Detekzio eta kuantifikazio muga

Detekzio-muga edo *Limit of detection* (LOD) metodo analitiko jakin baten bidez fidagarritasunez detektatu daitekeen substantziaren gutxieneko kantitatea edo kontzentrazioa da³⁵. Detekzio muga, besteak beste, bi modutara kalkula daiteke: zuriaren seinaleen neurketen bidez eta, zuririk neurtzen ez bada, erregresio linealaren bidez. Lan honetan zuriaren neurketarik egin ez denez, modu honetara kalkulatu da detekzio muga:

$$y = b_0 + b_1c \quad 4. \text{ ekuazioa}$$

Aurreko ekuazio horretatik, ondorengo hau lortzeko da,

$$y_{LD} = y_B + 3,3 s_B \quad 5. \text{ ekuazioa}$$

Non,

y_{LD} : detekzio mugari dagokioen seinalea den.

y_B : zuriaren seinalea den.

s_B : zuriaren desbiazio estandarra den.

Azken ekuazio honetatik abiatuz, zuriaren seinalea (y_B) eta ordenatua (b_0) ia berdinak direla eta zuriaren desbiazio estandarra (s_B) eta erregresioaren desbiazioa ($s_{y/x}$) ere ia berdinak direla suposatuta da. Aldaketa horiek eginda, ondorengo ekuazioa lortzen da:

$$y_{LD} = b_0 + 3,3 s_{y/x} \quad 6. \text{ ekuazioa}$$

4. ekuazioaren eta 6. ekuazioaren berdinketa eginez, azken ekuazioa lortzen da:

$$C_{LD} = \frac{3,3s_{y/x}}{b_1} \quad 7. \text{ ekuazioa}$$

Beraz, bi kalibrazio ekuazioen detekzio mugak kalkulatu dira:

- 1. NP erosiak, zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,1-1 mM bitartean.
- 2. NP erosiak, zisteina 1 mM eta Ca^{2+} 0,25-1 mM bitartean.

Kalibrazio ekuazioak (35. irudiko (a) eta (c) grafikoen kalibratuak, Ag NP erosiak eta zisteina 1 mM 5 minutu ondoren lortuak)

$$- 1. \quad y = 1,2945x - 0,1448 \quad 8. \text{ ekuazioa}$$

$$C_{LD} = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b_1} = \frac{3,3 \cdot 0,0815}{1,2945} = 0,21 \text{ mM}$$

$$- 2. \quad y = 1,4121x - 0,2358 \quad 9. \text{ ekuazioa}$$

$$C_{LD} = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b_1} = \frac{3,3 \cdot 0,0900}{1,4121} = 0,21 \text{ mM}$$

Lehenengo kalibratuaren detekzio mugaren kontzentrazioa (0,21 mM) kalibrazio zuzeneko lehen kontzentrazioa baina handiagoa da, beraz, kalibratu hau ez da egokia izango. Bigarren kalibratuaren detekzio mugaren kontzentrazioa, ordea, kalibratuaren lehen kontzentrazioa baino txikiagoa da (0,25 mM), nahiz eta asko gerturatzen den. Beraz, esan daiteke lortutako kalibratua ona dela.

Kauntifikazio muga edo *limit of quantification* (LOQ) zehaztasunez eta prezisioz determinatu daitekeen kontzentrazio edo kantitate baxuena da³⁴. Modu honetara kalkula daiteke:

$$C_{LOQ} = 3 \cdot C_{LD} \quad 10. \text{ Ekuazioa}$$

$$- 1. \quad C_{LOQ} = 3 \cdot 0,2077 = 0,62 \text{ mM}$$

$$- 2. \quad C_{LOQ} = 3 \cdot 0,2104 = 0,63 \text{ mM}$$

Kuantifikazio mugaren kontzentrazioak (0,62 eta 0,63 mM) bi bikalibratuen erdian daude, kalibratuen kontzentrazio tartean (1) 0,1-1 mM eta (2) 0,25-1 mM baitira.

- **Prezisioa eta zehaztasuna**

Prezisioak errepikatutako neurketen arteko gertutasuna adierazten du. Prozedura ezberdinak jarrai daitezke hau lortzeko, hala nola, errepikakortasuna eta erreproduzigarritasuna³⁴. Errepikakortasuna denbora labur batean eta baldintza zehatz batzuetan egiten da, adibidez: analista eta instrumentazio bera. Erreproduzigarritasuna, berriz, denbora tarte zabalagoan egiten

da eta baldintzak aldatu egiten dira, adibidez: erreaktiboak, analista eta instrumentazio ezberdinak. Prezioa portzentai moduan honela adierazi da:

$$\% RSD = \left(\frac{SD}{BB} \right) \times 100 \quad 11. \text{ ekuazioa}$$

Zehaztasunak lortu den balioaren eta benetako balioaren arteko gertutasuna adierazten du. Metodo analitiko batek duen alderdi oso garrantzitsua da zehaztasuna³⁴. Lan honetan laginen neurketarik egin ez denez, zehaztasuna errore erlatiboaren ehuneko moduan kalkulatu da:

$$\% E.E. = \left(\frac{|benetako balioa - neurtutako balioa|}{benetako balioa} \right) \times 100 \quad 12. \text{ ekuazioa}$$

Metodoaren prezioa eta zehaztasuna lortzeko, bi kontzentrazio ezberdinen 3 neurketa egin dira Ag NP erosiak: 0,35 eta 0,90 mM. Emaitzak lortzeko erabili den kalibrazio ekuazioa, NP erosiak lortutako izan da (9. ekuazioa), zisteina 1mM eta Ca²⁺ 0,25-1 mM bitartean gehitutako.

8. taula: Ag NP erosiak erabilitako metodoaren prezioaren eta zehaztasunaren kalkuluak, kaltzio 0,35 eta 0,9 mM-etan.

| [Ca ²⁺], mM benetakoa | [Ca ²⁺], mM lortua | BB | Sd | % RSD | % E.E |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 0,35 mM | 0,2974 | 0,298 | 0,007 | 2 | 15 |
| | 0,2916 | | | | |
| | 0,3064 | | | | |
| 0,90 mM | 0,9532 | 0,947 | 0,006 | 1 | 5 |
| | 0,9456 | | | | |
| | 0,9412 | | | | |

Ikusten da desbideratzen estandar erlatiboak (% RSD) begiratzen bazaie, lortutako balioak ez direla oso handiak, beraz, esan daiteke metodoa nahikoa prezioa dela. Baina, errore erlatiboak erreparatzen bazaie, balio altuak lortu direla ikusi da. Hortaz, proposatutako metodoa ez da oso zehatza izango.



Laburbilduz, lortu den kalibraketarik hoberena zisteina 1 mM gehituz eta Ca²⁺ 0,25-1 mM kontzentrazio tartean egindakoa izan da. Ikusi da detekzio muga kalibraketa zuzenaren lehen kontzentrazioa gerturazten dela, eta kuantifikazio muga kalibratuaren erdian dagoela. Gainera, proposatutako metodo hau nahikoa prezioa dela ikusi da, baina, ez horren zehatza.

Behin UM-Ikusgai espektroskopiarekin froga hauek burututa, kaltzio determinatzeko beste metodo bat proposatu da, irudi digitalen analisi bidezkoa; non hau, Ag NPei zisteina eta kaltzioa gehitzean sortutako disoluzioen kolore aldaketan oinarrituko den.

4.2.2. Irudi digitalen analisisa


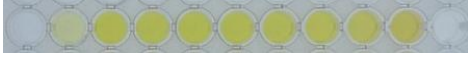





Irudi digitalen analisisa S0.0 sintetizatutako nanopartikulekin burutu da. Bi saiakera egin dira, eta argazkiak egindako momentuan, 5 minutu ondoren, 10 minutu ondoren eta 20 minutu ondoren atera dira. 1. saiakera burutzeko jarraitutako prozedura 3. taulan azaldu da eta 2. saiakera burutzeko jarraitutako prozedura 4. taulan.

9. taula: S0.0 Ag NP sintetizatuen lehenengo saiakera mikroplaketan 0' eta 20' bitartean.

| | |
|-------------|---|
| 1. Saiakera | [Ca ²⁺]: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,75; 2,5; 5; 7,5; 10 mM |
| [Zisteina] | 5 mM |
| 0' |  |
| 20' |  |

Kasu horretan, 9. taulan argi ikusten da kolore progresiorik ez dagoela eta ia kolore aldaketarik egon ez dela 20 minututan zehar. Beraz, irudi horrekin ezin izango da kalibratio zuzenik lortu.

10. taula: S0.0 Ag NP sintetizatuaren bigarren saiakera mikroplaketan, 0' eta 20' bitartean.

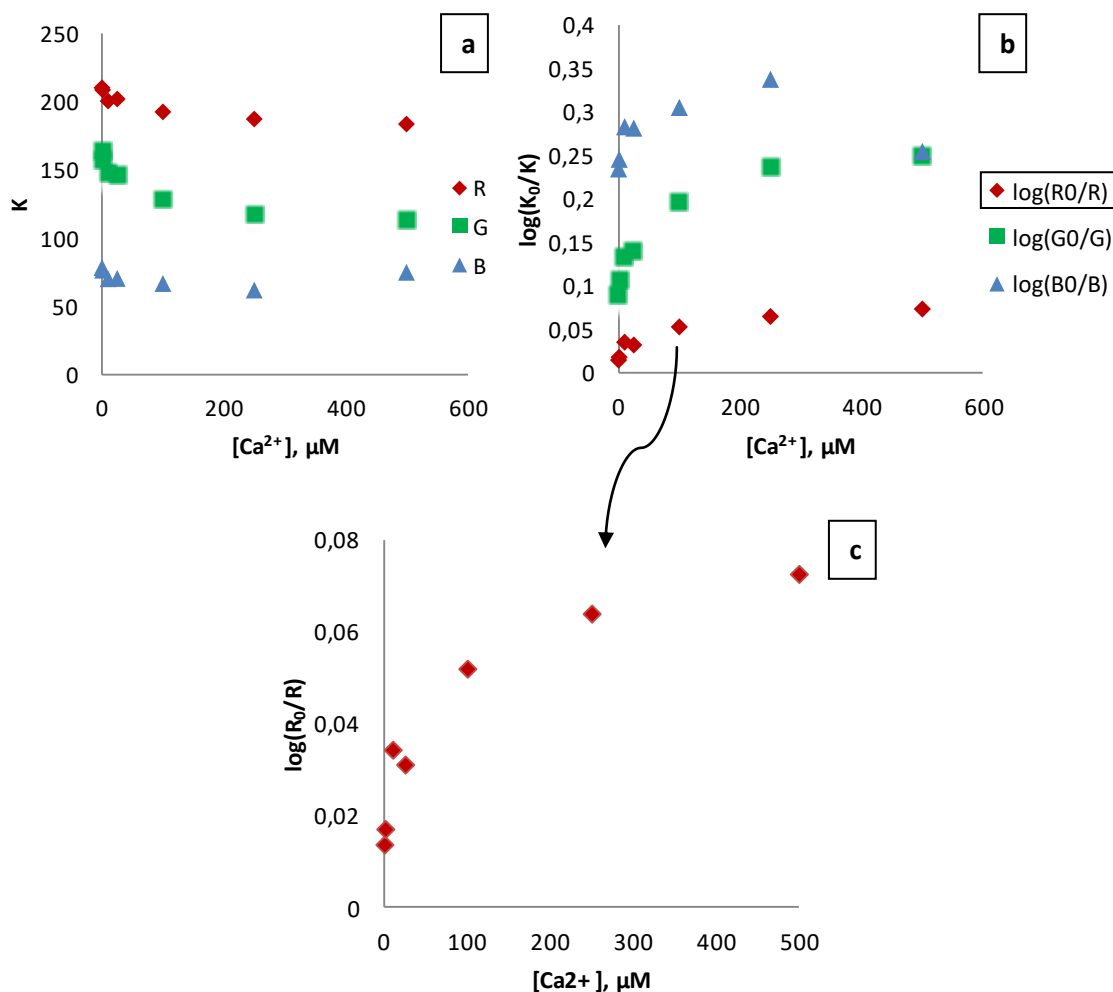
| | |
|-------------------------|--|
| 2. Saiakera | |
| [Ca ²⁺], μM | 0; 0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 μM |
| [Zisteina] | 50 μM |
| 0' |  |
| 20' |  |
| [Zisteina] | 100 μM |
| 0' |  |
| 20' |  |
| [Ca ²⁺], μM | 0, 0, 1, 10, 25, 100, 250, 500 μM |
| [Zisteina] | 500 μM |
| 0' |  |
| 5' |  |
| 20' |  |

Bigarren saiakera honetan, argi ikusten da ere lehen bi lerroetan ez dagoela kolore progresio argirik inongo momentuan. Baina, hirugarren lerroan baliteke hau gertatzea. Beraz, MADDI softwarea erabiliz, ziurtatuko da ea kalibrazio zuzenik lortzen den 5 minutu pasa ondoren, UM-Ikus espektroskopian lortu den bezala.

Kalibrazio zuzena lortzeko, irudien koloreaz baliatuz MADDI softwareak R, G eta B balio bana ematen du mikroplaken putzu bakoitzeko. 37. irudiko (a) grafikoan R, G eta B balio (K) kaltzio kontzentrazioaren aurrean irudikatu dira. Linealtasuna lortzeko, zuriaren (K_0 : R_0 , G_0 edo B_0) eta lortutako putzu bakoitzaren balioen (K: R, G edo B) erlazioaren logaritmoa aplikatu da, eta kaltzio kontzentrazioaren aurrean irudikatu da. Kasu honetan, zuria Ag NPak soilik emandako balioa izan da.

Ondorengo irudiko (a) eta (b) grafikoetan ikusten da R eta G kanalekin lortutako balioek joera berdina jarraitzen dutela, baina B kanalarekin lortutakoek, berriz, ez dute joera hau jarraitzen. (c) grafikoari erreparatuz, R kanalarekin lortutako kalibraketa ez da zuzen batera doitzen. Kontzentrazioa baxueneko balioekin joera lineala ikus daiteke, baina segituan galtzen da. Aipatutako azken grafiko hau 36. irudian agertzen diren grafikoekin konparatuz (UM-Ikus

espektroskopiarekin lortutakoak), ikus daiteke horien joerak irudi digitalen analisiarekin lortutakoaren oso antzekoak direla.



37. irudia: MADDI softwarea erabiliz lortu den grafikoa zistaina 500 μM Ca^{2+} 0-500 μM kontzentrazio tartean, 5 minutu pasa ondoren. X ardatzean kaltzioa kontzentrazioa μM -etan eta Y ardatzean R,G eta B balioak (a). X ardatzean $\log(K_0/K)$ eta Y ardatzean kaltzio kontzentrazioa μM etan (b). X ardatzean $\log(R_0/R)$ eta Y ardatzean kaltzio kontzentrazioa μM -etan.

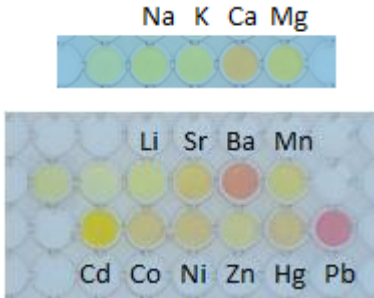
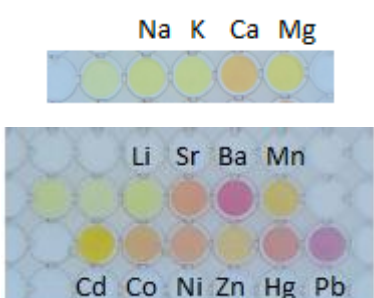
4.2.3. Interferentzien azterketa

Ag NP erosiarekin interferentzien azterketa egin da mikroplaketan. 11. taulako lehenengo ilaran, Ag NP % 50 soilik gehitu da eta ondorengo putzuetan Ag NP, zistaina 0,25 mM eta metal desberdinak bota dira 0,25 mM kontzentrazioan. 11. taulako bigarren eta hirugarren ilaran kasuan, lehenengo putzuan Ag NPak soilik gehitu dira eta biagurrean Ag NP eta zistaina 0,25 mM. Ondorengo putzu guztietan, Ag NP, zistaina 0,25 mM eta metal desberdinak gehitu dira. Metalen bukaerako kontzentrazioa 0,25 mM da. Kasu honetan ere, Ag NPak 1:2 diluzioa aplikatu ondoren erabili dira. Irudiak metalak bota ondoren eta 20 minutu pasa eta gero atera dira, denborarekin aldaketarik ematen den ikusteko. Lehenengo ilaran NP, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}

metalak gehitu dira, bigarren ilaran NP, NP + Zis, Li⁺, Sr²⁺ Ba²⁺, eta Mn²⁺ metalak eta hirugarren ilaran Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ eta Pb²⁺.

11. taulan dauden irudietan ikusten da Na⁺, K⁺ eta Li⁺ metalak dituzten putzuak ez direla kolorez aldatu inongo momentuan. Baina gainontzeko metalen kasuan, kolore aldaketa bat nabaritzen da 20 minutu pasa ondoren, nahiz eta hauetako metal askok kolore aldaketa eman metala gehitzerako momentuan (Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺...).

11. taula: Ag NP erosiakin egindako interferentzien azterketa hainbat katioiekin, 0' eta 20' -tan.



| Ag NP erosiak | Interferentziak: Katioiak |
|---------------|--|
| 0' |  |
| 20' |  |

Ag NP sintetizatuekin ere froga hau egin da mikroplaketan, zehazki S0.0 nanopartikula disoluzioekin. Kasu honetan ere lehen putzuan Ag NPak soilik gehitu dira eta biagrranean Ag NP eta zisteina 0,25 mM. Ondorengo putzu guztietan, Ag NP, zisteina 0,25 mM eta metal desberdinak gehitu dira NP erosiakin egin den bezala. Metalen bukaerako kontzentrazioa 0,25 mM da eta Ag NP-ak 1:2 diluzioa aplikatu ondoren erabili dira. Lehenengo ilaran NP, NP + Zis, Li⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ metalak gehitu dira eta bigarren ilaran Ba²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺. Irudiak metalak bota ondoren eta 20 minutu pasa eta gero atera dira.

Argi ikusten da Li⁺, Na⁺ eta K⁺ metalekin ez dela kolore aldaketarik eman. Baina gainontzeko metalei erreparatuz, beha daiteke disoluzio guztien koloreak aldatu direla, batzuk hori

indartsuagora (Cd^{2+} eta Pb^{2+}) eta beste batzuk arros edo morera (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} eta Hg^{2+}). Kasu honetan denborarekin koloreek ez dute aldaketa handirik jasan.

12. taula: S0.0 Ag NP sintetizatuekin egindako interferentzien azterketa hainbat katioiekin, 0' eta 20'-tan.

| Nanopartikula sintetizatuak: S0.0 | Interferentziak: Katioiak |
|---|--|
| 0' |  |
| 20' |  |

Orokorrean esan daiteke Li^+ , Na^+ eta K^+ metalekin ia kolore aldaketarik nabaritzen ez dela, baina gainontzeko metalekin kolore aldaketa oso nabaria dela. Beraz, metal horiek interferentziak izango lirateke laginetan kaltzioa determinatzerako garaian.

5. Ondorioak

Kaltzioaren determinazioa burutzeko, Ag NP-ak 5 modu ezberdinetara sintetizatu dira, guztira 12 Ag NP disoluzio ezberdin izanik. Lortutako Ag NP horiek karakterizateko, ultramore-ikuskor espektroskopia, TEM analisia, partikula tamainaren kalkulua eta aldagai anitzeko analisia (PCA) burutu dira. Sintetizatutako zilar nanopartikulak Ag NP erosiekin konparatzeko prozedura bat proposatu da. Karakterizaziorako teknika guztiak aplikatu ondoren, ikusi da Ag NP hoberenak S0 prozedurarekin lortu direla, erosiei gehien gerturatzen zaien disoluzioak izan direlako, zehazki S0.0 disoluzioa.

Kaltzioaren determinazioari dagokionez, Ag NP erosien kasuan Ultramore-Ikusgai espektroskopiarekin kalibratu bat egitea lortu da, zisteina 1mM eta kaltzioa 0,25-1 mM kontzentrazio tartean, nahiz eta metodoaren zehaztasuna ez oso ona izan. Ag NP sintetizatuen kasuan ez dira NP erosiekin lortu diren emaitza berdinak lortu.

Irudi digitalen analisiari erreparatuz, ikusi da S0.0 Ag NP-rekin kaltzio kontzentrazioaren eta kolorearen arteko korrelazioa badagoela, nahiz eta ez den lortu kalibrazioa balidatzerik. Ikusi da ere, UM-Ikus eta irudi digitalen analisi bidez lortutako emaitzak oso antzekoak izan direla. Hau da, bi metodoekin S0.0 NP-ren emaitzen joera oso antzeko izan da.

Azkenik, interferentzien azterketa burutu da hainbat ioi metalikoekin. Ikusi da zilar nanopartikula erosi eta sintetizatuekin (S0.0) Li^+ , Na^+ eta K^+ katioiekin izan ezik, gainontzeko metalekin kolore aldaketa esanguratsua eman dela. Hortaz, laginetan hainbat interferentzia egongo dira kaltzioaren determinazio kolorimetrikoa egiterakoan.

Conclusions

To perform the calcium determination, silver nanoparticles were synthesized in 5 different ways, with a total of 12 different Ag NP solutions. To characterize these obtained Ag NPs, Ultraviolet-Visible spectroscopy, TEM analysis, particle size calculation and multivariate analysis (PCA) were performed. A procedure for comparing synthesized silver nanoparticles with purchased nanoparticles has been proposed. After applying all the characterization techniques, it has been seen that the best Ag NPs have been obtained with the S0 procedure, because of the closeness to the purchased ones, specifically the S0.0 solution.

With regard to the determination of calcium, in the case of purchased Ag NPs, a calibration was performed with Ultraviolet-Visible spectroscopy, ranging from 1 mM cysteine and 0,25–1 mM calcium concentration, although the accuracy of the method was not very good. In the case of synthesized silver nanoparticles, comparing with purchased nanoparticles, same results were not obtained.

Looking at the analysis of the digital images, it has been observed that there is a correlation between calcium concentration and colour with S0.0 Ag NP, although no calibration has been validated. It has also been observed that the results obtained through Ultraviolet-visible spectroscopy and digital image analysis have been very similar. That is, the tendency of the results of S0.0 nanoparticles with both methods was similar.

Finally, an interference study was performed with various metal ions. It has been observed that with bought and synthesized (S0.0) AgNPs, except Li^+ , Na^+ and K^+ cations, a significant colour change was observed in the rest of the metals solutions. Therefore, there will be several interferences in the colorimetric determination of calcium in samples.

6. Bibliografia

- (1) Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12* (7), 908–931.
- (2) Beyene, H. D.; Werkneh, A. A.; Bezabh, H. K.; Ambaye, T. G. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustain. Mater. Technol.* **2017**, *13*, 18–23.
- (3) Bharmoria, P.; Ventura, S. Optical applications of nanomaterials. *Nanomaterials for Healthcare, Energy and Environment.* **2019**, 1–29.
- (4) nanoComposix. The Science of Plasmonics. <https://nanocomposix.com/pages/the-science-of-plasmonics> 2021eko otsailean kontsultatua.
- (5) Stampelcoskie, K. G.; Scaiano, J. C. Light emitting diode irradiation can control the morphology and optical properties of silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6, 1825–1827.
- (6) Han, C.; Xu, K.; Liu, Q.; Liu, X.; Li, J. Colorimetric sensing of cysteine using label-free silver nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *202*, 574–582.
- (7) Hajizadeh, S.; Farhadi, K.; Forough, M.; Molaei, R. Silver nanoparticles in the presence of Ca^{2+} as a selective and sensitive probe for the colorimetric detection of cysteine. *Anal. Methods.* **2012**, *4* (6), 1747–1752.
- (8) Menazea, A. A.; Ahmed, M. K. Silver and copper oxide nanoparticles-decorated graphene oxide via pulsed laser ablation technique: preparation, characterization, and photoactivated antibacterial activity. *Nano-Struct. Nano-Objects.* **2020**, *22*, 100464.
- (9) Mulfinger, L.; Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84* (2), 322.
- (10) Nguyen, D. T.; Kim, D.-J.; So, M. G.; Kim, K.-S. Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl_4 . *Adv. Powder Technol.* **2010**, *21* (2), 111–118.
- (11) Elkins, K. E.; Vedantam, T. S.; Liu, J. P.; Zeng, H.; Sun, S.; Ding, Y.; Wang, Z. L. Ultrafine FePt nanoparticles prepared by the chemical reduction method. *Nano Lett.* **2003**, *3* (12), 1647–1649.
- (12) Wani, I. A.; Khatoun, S.; Ganguly, A.; Ahmed, J.; Ahmad, T. Structural characterization and antimicrobial properties of silver nanoparticles prepared by inverse microemulsion method. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2013**, *101*, 243–250.
- (13) Atta, A. M.; Abomelka, H. M. Multifunctional finishing of cotton fibers using silver nanoparticles via microwave-assisted reduction of silver alkylcarbamate. *Mater. Chem. Phys.* **2021**, *260*, 124137.
- (14) Saifuddin, N.; Wong, C. W.; Yasumira, A. A. N. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *Journal of Chemistry.* **2009**. 734264.

- (15) Krithiga, N.; Rajalakshmi, A.; Jayachitra, A. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of clitoria ternatea and solanum nigrum and study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens. *Journal of nanoscience*. **2015**, 928204.
- (16) Salari, Z.; Danafar, F.; Dabaghi, S.; Ataei, S. A. Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae spirogyra varians and analysis of their antibacterial activity. *J. Saudi Chem. Soc.* **2016**, 20 (4), 459–464.
- (17) Bastús, N. G.; Merkoçi, F.; Piella, J.; Puentes, V. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. *Chem. Mater.* **2014**, 26 (9), 2836–2846.
- (18) Cuadros-Moreno, A.; Pimentel, R. C.; Martínez, E. S. M.; Fernandez, J. Y. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat.-Am. J. Phys. Educ.* **2014**, 8 (4), 14.
- (19) ImageJ <https://imagej.net/Welcome> 2021eko otsailean kontsultatua.
- (20) Unscrambler | Camo Analytics - The Leader in Industrial Analytics. *Camo Analytics*.
- (21) Salata, OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*. **2004**, 2 (3).
- (22) Kwiecińska, B.; Pusz, S.; Valentine, B. J. Application of electron microscopy TEM and SEM for Analysis of coals, organic-rich shales and carbonaceous matter. *Int. J. Coal Geol.* **2019**, 211, 103203.
- (23) Sigma-Aldrich. Silver Nanoparticles: properties and applications. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html> 2021eko otsailean kontsultatua.
- (24) Harris, D. C. Fundamentals of Spectrophotometry. In Quantitative chemical analysis; W.H.Freeman & Co Ltd: New York, 2007; Vol. 42, 100-106 eta 393–399.
- (25) D.L. Massart et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. *Part A, Elsevier* .1997.
- (26) Fernández, C. M. Quimiometría; Universitat de València, **2005**.
- (27) Fan, Y.; Li, J.; Guo, Y.; Xie, L.; Zhang, G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: a review. *Measurement*. **2021**, 171, 108829.
- (28) Vidal, M.; Garcia-Arrona, R.; Bordagaray, A.; Ostra, M.; Albizu, G. Simultaneous determination of color additives tartrazine and Allura Red in Food Products by Digital Image Analysis. *Talanta*. **2018**, 184, 58–64.
- (29) Ezenarro, J. Polifenol Eduki Totalaren Determinazioa Irudi Digitalen Analisi Bidez Eta Hauen Tratamendurako Softwarearen Garapena. (Gradu Amaierako Lana) 2020ko uztaila.
- (30) MATLAB Online <https://es.mathworks.com/products/matlab-online.html> 2021eko otsailean kontsultatua.
- (31) Rashid, M. U.; Bhuiyan, K. H.; Emran, Q. M. Synthesis of Silver Nano Particles (Ag-NPs) and their uses for quantitative analysis of vitamin C tablets. Dhaka University Jorunal of Pharmaceutical Science. **2013**, 12(1).

- (32) Quintero-Quiroz, C.; Acevedo, N.; Zapata-Giraldo, J.; Botero, L. E.; Quintero, J.; Zárate-Triviño, D.; Saldarriaga, J.; Pérez, V. Z. Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its Antimicrobial and toxic activity. *Biomater. Res.* **2019**, *23*.
- (33) Vedantu. Properties and Structure of Silver Nitrate and Its Applications
<https://www.vedantu.com/chemistry/silver-nitrate> 2021eko otsailean kontsultatua.
- (34) Araujo, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B.* **2009**, *877* (23), 2224–2234.
- (35) Boqué, R. El Límite de Detección de Un Método Analítico.
<http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf> 2021eko otsailean kontsultatua.