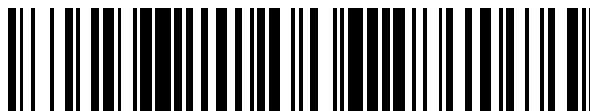


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 725**

21 Número de solicitud: 202330633

51 Int. Cl.:

**G01N 21/71** (2006.01)

**G01N 1/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**25.07.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.11.2023**

Fecha de concesión:

**04.03.2024**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**11.03.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(62.5%)**

**Avenida de Séneca, 2**

**28040 Madrid (Madrid) ES;**

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (12.5%);**

**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (UCBL)  
(12.5%) y**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (12.5%)**

72 Inventor/es:

**CÁCERES GIANNI, Jorge;**

**CÁRDENAS ESCUDERO, Jafet;**

**SÁNCHEZ SÁNCHEZ, Alfredo;**

**VILLALONGA CHICO, Anabel;**

**VILLALONGA SANTANA, Reynaldo;**

**GALÁN MADRUGA, David;**

**MOTTO ROS, Vincent y**

**GARDETTE, Vincent**

54 Título: **Detección y cuantificación de nanopartículas sólidas metálicas mediante espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS) con soporte de vidrio funcionalizado**

57 Resumen:

Detección y cuantificación de nanopartículas sólidas metálicas mediante espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS) con soporte de vidrio funcionalizado.

El uso de nanopartículas metálicas (NPMs), se ha extendido en la ciencia y en la industria. Debido a su pequeño tamaño (entre 1 y 100 nm) tienen propiedades físicas y químicas únicas. Sin embargo, debido a la amplia gama de tamaños, existe una controversia en cuanto a las NPMs como agentes tóxicos para la salud humana o para el medioambiente, resultando necesaria su cuantificación en determinadas muestras. Al mismo tiempo, pero este tamaño constituye un importante reto analítico.

Se propone un novedoso y económico, fácil de ejecutar, método de análisis de NPMs que permite una cuantificación con una preparación casi nula de la muestra y alta sensibilidad, basada en la técnica de espectroscopía LIBS empleando como soporte para la muestra una superficie de vidrio previamente funcionalizada con grupos silano.

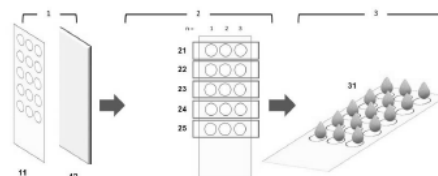


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 952 725 B2

## DESCRIPCIÓN

5 Detección y cuantificación de nanopartículas sólidas metálicas mediante espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS) con soporte de vidrio funcionalizado

## SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La invención se enmarca en el campo del análisis para la detección y cuantificación de nanopartículas sólidas metálicas con aplicaciones medioambientales y clínicas, entre otras. De forma más concreta, la invención se refiere al desarrollo de soportes de vidrio funcionalizados para la fijación de nanopartículas que, posteriormente, son analizadas espectroscopía de ablación inducida por láser, sin el requerimiento de métodos de preconcentración.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las nanopartículas metálicas (NPMs) son un tipo específico de nanomaterial, formado normalmente por partículas metálicas de entre 1 y 500 nanómetros de tamaño. Debido a su pequeño tamaño, tienen propiedades físicas y químicas únicas que difieren de las de partículas más grandes del mismo material. Estas propiedades se deben, en gran medida, a que la relación superficie-volumen de las nanopartículas es mucho mayor que la de las partículas más grandes. Estas propiedades únicas hacen que las NPMs sean utilizadas en una gran variedad de aplicaciones que van desde la fabricación de dispositivos electrónicos y catalizadores hasta la medicina y energía (Jamkhande, P.G. et al. *Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications*, Journal of Drug Delivery Science and Technology 53 (2019) 101174).

20 Dentro de la amplia gama de NPMs disponibles en la actualidad, las nanopartículas de oro (Au-NPs) son las más estudiadas y utilizadas en el ámbito científico por sus propiedades ópticas, fototérmicas, y electrónicas únicas. Además, se han diversificado tanto que también son utilizadas para aplicaciones novedosas que abarcan desde administración de fármacos y terapias hasta sensores especializados en la obtención de imágenes. Las nanopartículas de plata (Ag-NPs) constituyen otro ejemplo de típico

25

30

35

de NPMs que, a diferencia de las nanopartículas de oro, deben su popularidad a su poder bactericida, catalítico, antiinflamatorio, además de otras propiedades médicas.

5 El uso de Au-NPs y Ag-NPs se ha extendido en la ciencia y en la industria. Sus propiedades son tan características que, además de utilizarse por separado para diversos fines, se han desarrollado nanopartículas bimetálicas biogénicas de oro y plata para aplicaciones avanzadas, como la degradación catalítica de fármacos asociados al VIH en agua, entre otras. Uno de los usos más demandados de las Au-NPs y Ag-NPs es la fabricación de sensores y biosensores para la detección de una  
10 amplia gama de analitos, tanto en muestras inorgánicas como biológicas, especialmente en análisis medioambiental y biomédico.

Sin embargo, debido a la amplia gama de tamaños, existe una controversia en cuanto a las NPMs como agentes tóxicos para la salud humana o para el medioambiente, especialmente el para el agua. En el caso de las Au-NPs, se ha demostrado que  
15 pueden biodistribuirse y bioacumularse en distintas partes del cuerpo en función de su tamaño, considerándose los pulmones como destino preferido de este tipo de nanopartículas (Tinajero-Díaz, E. et al., *Green Metallic Nanoparticles for Cancer Therapy: Evaluation Models and Cancer Applications*, Pharmaceuticals, **2021**). Por su parte, las Ag-NPs también pueden biodistribuirse y bioacumularse en el organismo, provocando efectos similares, por ejemplo, en la respuesta inmunitaria (Noga, M. et al., *Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs) – Critical Review: State of the Art*, International Journal of Molecular Sciences, **2023**). No obstante, las Ag-NPs pueden generar otros efectos  
20 más comprometedores que los generados por las partículas de oro, debido a su capacidad para producir un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden provocar daños en el ADN, problemas en la producción de lípidos y proteínas, y comprometer negativamente el sistema de defensa antioxidante del organismo.

30 Por ello, a pesar de la rápida difusión del uso de nanopartículas de oro, plata y otros metales, la cuantificación de estos nanomateriales constituye un importante reto analítico, debido principalmente a su tamaño característico y a la falta de sistemas de detección de alta sensibilidad que garanticen el alto grado de precisión y exactitud que  
35 este tipo de análisis requiere.

El contenido de NPMs en muestras suele determinarse mediante técnicas de espectrometría de emisión óptica, como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) que proporciona una sensibilidad adecuada para la cuantificación de partículas metálicas si se utiliza con otras técnicas de separación  
5 (Majedi, M. y Lee, H.K. *Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment*, TrAC Trends in Analytical Chemistry 75 (2016) 183-196), como el fraccionamiento por flujo de campo (FFF-ICP-MS) (Bednar, J. et al. *Comparison of on-line detectors for field flow fractionation analysis of nanomaterials*, Talanta 104 (2013) 140-148). Y recientemente, la técnica  
10 ICP-MS se ha empleado con un enfoque de separación similar llamado Fraccionamiento de Flujo de Campo (F4-ICP-MS) para lograr límites de detección bajos (Bai, Q. et al. *Flow field-flow fractionation hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry: a robust technique for characterization of engineered elemental metal nanoparticles in the environment*, Applied Spectroscopy Reviews  
15 58(2) (2023) 110-131). Pero su uso supone una limitación importante debido a que se trata de una instrumentación altamente especializada y costosa, lo que impide que sea una opción económicamente viable, por no mencionar el importante tiempo que puede consumir el uso de estas técnicas avanzadas y la necesidad de una etapa previa de separación que incrementa el coste del análisis e influye en el rendimiento de la técnica  
20 de detección.

La presente invención propone una alternativa a las técnicas actuales de análisis de NPMs que permite una cuantificación mediante una técnica analítica que requiere una preparación casi nula de la muestra y presenta una alta sensibilidad para la detección  
25 de nanopartículas sólidas de especies metálicas, basada en la captación de la información espectral del plasma que se genera en la superficie de la muestra al incidir previamente sobre ella un láser pulsado, mientras la muestra es soportada en una superficie de vidrio químicamente funcionalizada.

### 30 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención describe el desarrollo de un soporte de vidrio funcionalizado con grupos silano para la fijación de nanopartículas metálicas que serán posteriormente analizadas para su detección y cuantificación mediante espectroscopía de ablación  
35

inducida por láser (LIBS).

El vidrio funcionalizado se utiliza como soporte o cubreobjetos donde se depositan las NPMs. La funcionalización química del soporte de vidrio comprende las siguientes etapas:

- 5
- Activación de la superficie de vidrio mediante inmersión, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en una disolución acuosa de ácido nítrico al 20% (m/m). (puede utilizarse cualquier ácido mineral en concentraciones entre 5-50% m/m)

10

  - Lavado exhaustivo del vidrio activado con agua tipo 1 (conductividad eléctrica máxima a 25 °C = 0.056  $\mu$ S/cm y resistividad eléctrica mínima a 25 °C = 18.2 M $\Omega$ -cm). Inmersión de los soportes de vidrio previamente lavados en una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entre el 10-50% (m/m) entre 30-80 °C de temperatura durante 15-50 minutos. Superado el tiempo de inmersión,

15

  - los soportes de vidrio son enfriados a temperatura ambiente y se les agrega 5 mL de una solución de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) concentrado (25.0 – 30.0 % NH<sub>3</sub> base) y posteriormente enjuagados vigorosamente con agua tipo 1 y se realiza un último lavado con metanol ( $\geq$ 99.8% m/m).
  - Inserción de los grupos silano (-SH) en la superficie del vidrio mediante la

20

  - inmersión del vidrio, previamente activado y lavado, en una disolución de 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano entre el 0.5-5%, empleando como disolvente una solución de metanol en agua (tipo 1) entre 10-30 % (metanol), previamente ajustada a un pH entre 2 y de 5 con ácido acético y agitada vigorosamente durante 10 min. El tiempo de inmersión de los soportes de vidrio en esta

25

  - solución entre 15 a 30 minutos, a temperatura ambiente.
  - Finalmente, los soportes de vidrio son extraídos de la solución previa y son enjuagados vigorosamente con etanol ( $\geq$ 96% m/m). Hecho esto, los soportes son llevados a un horno a 80-120 °C entre 10-40 min para su apropiado curado y secado.

30

Una vez obtenido el vidrio funcionalizado, las muestras y las disoluciones de calibración de NPMs son depositadas sobre el vidrio y se dejan secar antes de proceder al análisis LIBS. El láser pulsado del instrumento LIBS incide en la superficie del soporte de vidrio y se genera un plasma cuya radiación es captada de manera

35

continua durante todo el análisis mediante un espectrómetro acoplado a un detector

ICCD (*Intensified Charge Coupled Device*) que traduce las señales de emisión del plasma generado en un espectro de líneas de emisión de los elementos químicos que constituyen las muestras analizadas.

5 Una vez obtenido el espectro LIBS de las muestras, mediante la base de datos LIBS del NIST (*National Institute of Standards and Technology*) se procede a la identificación de las líneas de emisión presentes en el espectro LIBS obtenido, para la asignación de los elementos. Dada la capacidad técnica LIBS de generar este tipo de espectros de líneas de emisión elemental, se garantiza la alta selectividad del método para la  
10 identificación de las nanopartículas metálicas que puedan estar presentes en la muestra.

Una vez asignada la identidad de las líneas, se procede a tabular las intensidades promedias a las longitudes de onda de interés para cada metal, tanto para las muestras  
15 como para las soluciones de calibración.

A partir de la intensidad y concentración conocida de las soluciones de calibración, se ajustan linealmente (a modo de ejemplo, en rangos de concentraciones entre 3 y 0.1  $\mu\text{g}$  NPMs/ml, aproximadamente) para la cuantificación de las muestras, utilizando la  
20 recta de calibrado y la intensidad de la longitud de onda de trabajo.

La técnica descrita puede ser aplicada a cualquier nanopartículas metálicas de cualquier metal, comprendidas en el rango de 1 a 500 nm, no requiere procesos complicados de tratamiento de muestra, es fácil de llevar a cabo, es rápida, los límites  
25 de detección son aceptablemente bajos (del orden de  $10^{-4}$   $\mu\text{g}$  NPMs/ml) , los resultados son fácilmente interpretados y procesados, y se consumen cantidades pequeñas de reactivos de uso común en el laboratorio (lo cual coadyuva a la reducción del impacto en la salud y el impacto ambiental de la técnica, en comparación con las técnicas de análisis de NPMs basadas en espectroscopía de masas). Inclusive esta técnica puede  
30 ser aplicada a muestras sólidas y gaseosas previamente disueltas en agua.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

En las figuras adjuntas, con carácter ilustrativo y no limitativo, se muestran las  
35 principales características de la invención.

**Figura 1.** Esquema del soporte de vidrio funcionalizado con su montaje (1) y la disposición de las muestras en el soporte con pocillos (2) para deposición de muestras de disolución de NPMs (3). Sobre el soporte de vidrio (portaobjetos) funcionalizado químicamente con grupos silano (12) se coloca un adhesivo de doble cara con perforaciones de 4 mm de diámetro. Sobre estas perforaciones se colocan n muestras de cada concentración de trabajo (21 a 25) por triplicado (n = 3) en forma de gotas (31).

**Figura 2.** Espectros LIBS de Au-NPs sobre el soporte de vidrio funcionalizado.

10

**Figura 3.** Espectros LIBS de Ag-NPs sobre el soporte de vidrio funcionalizado.

**Figura 4.** Comparación de las curvas de calibración obtenidas con el empleo del soporte de vidrio sin y con funcionalización química: a) Diagrama de dispersión de las intensidades medias en función de la concentración de Au-NPs de 18 mn de tamaño, obtenidas con el soporte de vidrio sin funcionalización química; b) Diagrama de dispersión de las intensidades medias en función de la concentración de Au-NPs de 18 mn de tamaño, obtenidas con el soporte de vidrio funcionalizado químicamente; c) Diagrama de dispersión de las intensidades medias en función de la concentración de Au-NPs de 18 mn de tamaño, obtenidas con el soporte de vidrio sin funcionalización química; y d) Diagrama de dispersión de las intensidades medias en función de la concentración de Ag-NPs de 10 mn de tamaño, obtenidas con el soporte de vidrio funcionalizado químicamente. Nótese la mejora significativa en la sensibilidad (aumento de la pendiente de la regresión lineal) de los calibrados en los que se empleó el soporte de vidrio funcionalizado químicamente. En todos los gráficos, la sombra roja más oscura muestra la banda de confianza y la sombra roja más clara muestra la banda de predicción.

30

## REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de la misma.

35

**Ejemplo 1.** Funcionalización del soporte de vidrio.

En primer lugar, la superficie de vidrio portaobjetos o cubreobjetos se activa mediante la inmersión en una solución acuosa de ácido nítrico al 20% a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, el soporte de vidrio se lava abundantemente con agua tipo 1. A continuación, el soporte de vidrio activado se sumerge en una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 10% manteniendo la temperatura a 75°C durante 45 minutos para, después, enfriarlo hasta temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de disolución concentrada de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) y, posteriormente, se lava el vidrio vigorosamente en primer lugar con agua tipo 1 y, finalmente, con metanol.

Para injertar los grupos silano (-SH) en la superficie del soporte de vidrio se utiliza una solución de metanol al 25% en agua tipo 1, con un pH previamente ajustado a 4.5 utilizando ácido acético, para disolver 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano hasta una concentración final del 2%. Tras agitar durante 10 minutos esta solución, el soporte de vidrio se sumerge en la solución de silano al 2% durante 30 minutos.

Finalmente, el soporte se aclara con etanol y se seca y cura a 110°C durante 30 minutos.

**Ejemplo 2.** Identificación de las líneas de emisión.

Sobre soportes de vidrio funcionalizados, según se describe en el ejemplo 1, se colocan muestras de soluciones de NPs utilizando cinta de adhesiva de doble cara sobre el vidrio para delimitar pocillos de 4 mm para depositar gotas de 4 µl por triplicado para cada solución de trabajo. De este modo, se evita el escurrimiento de las gotas y se favorece la concentración de nanopartículas en la zona de los pocillos, además de evitarse errores sistemáticos que pueden ser generados por el movimiento Browniano natural de las NPMs. La Figura 1 muestra el esquema de la preparación de la muestra.

Una vez secas las gotas depositadas sobre el vidrio, se analizan por la técnica LIBS. El instrumento *Micro-LIBS-Imaging* está constituido por una fuente láser Nd:YAG infrarrojo multimodal de 1064 nm con una duración de pulso de 8 ns, una energía de pulso máxima de 2 mJ y una frecuencia de 1 a 100 Hz. La secuencia de análisis se ajusta a una resolución de 35 µm y todas las mediciones se realizan a temperatura ambiente, y asistidas con un flujo de 0.8 l/mm de argón comprimido de pureza ultra

alta. El sistema de detección consiste en un espectrómetro *Shamrok 500* con un dispositivo de carga acoplada intensificada (ICCD), con un ajuste de retardo y puerta de 1  $\mu$ s y 5  $\mu$ s, respectivamente, y una rejilla ajustada a 2400 l/mm. La ventana espectral seleccionada fue 257.60 – 277.50 nm para Au-NPs y 327.07 – 336.50 nm para Ag-NPs.

El espectro obtenido en el análisis LIBS se muestra en la Figura 2, donde se aprecia que para la longitud de onda 264.59 nm (específica de una de las principales líneas de emisión del oro) es posible detectar las Au-NPs de 18 nm de tamaño sin interferencia de otros elementos que pudieran estar presentes en la muestra, ya sea en las soluciones de nanopartículas o en el soporte de vidrio funcionalizado. También se observa la señal intensa a 263.12 nm, característica del Si, uno de los principales constituyentes del soporte de vidrio.

En la Figura 3 se muestra el espectro LIBS obtenido en el análisis de Ag-NPs, de 10 nm de tamaño observándose que a 328.15 nm se obtiene una señal característica para la emisión de Ag, sin interferencias de otros elementos. Esto pone de manifiesto la alta selectividad con la que se detectan las señales.

### 20 **Ejemplo 3.** Obtención de la curva de calibración

Se preparan soluciones de calibración con concentraciones conocidas de NPMs, según se muestra en la Tabla 1.

Las soluciones preparadas se colocan sobre soportes de vidrio funcionalizados, según se describe en el ejemplo 2 y se dejan secar completamente sobre el vidrio funcionalizado antes de proceder al análisis con la técnica LIBS.

Tabla 1. Disoluciones de concentraciones conocidas para calibración

NPMs	Disolución NPs ( $\mu$ g/mL)				
	1	2	3	4	5
Au-NPs	2.900	1.740	0.580	0.116	0.058
Ag-NPs	2.900	1.740	1.160	0.580	0.116

A partir de la información de intensidad de las líneas de emisión y concentración de

las soluciones de calibración, se confeccionan los calibrados y se ajustan linealmente para la posterior cuantificación de la concentración de muestras, utilizando la ecuación de la recta de calibrado y la intensidad de la muestra de longitud de onda. En las Figuras 4a y 4b se muestran las calibraciones obtenidas para Au-NPs y Ag-NPs, respectivamente.

Para el caso de partículas Au-NPs, la recta de calibrado en el intervalo de concentraciones estudiadas, la intensidad de emisión a 267.59 nm ( $I_{(267.59 \text{ nm})}$ ) responde a la ecuación siguiente ecuación, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9966:

$$I_{(267.59 \text{ nm})} = 382.24 [\text{Au-NPs}] + 698.84 \quad r^2 = 0.9966$$

Para el caso de partículas Ag-NPs, la recta de calibrado en el intervalo de concentraciones estudiadas, la intensidad de emisión a 328.15 nm ( $I_{(328.15 \text{ nm})}$ ) responde a la siguiente ecuación, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,9966:

$$I_{(328.15 \text{ nm})} = 455.13 [\text{Ag-NPs}] + 697.17 \quad r^2 = 0.9973$$

**Ejemplo 4.** Comparación de análisis con vidrio funcionalizado y no funcionalizado.

Se obtienen curvas de calibración del mismo que se describe en el ejemplo 3 pero empleando vidrio no funcionalizado. En la Figuras 4a y 4b se muestra el resultado para el caso de las nanopartículas de Au-NPs y en las figuras 4c y 4d para las nanopartículas de Ag-NPs).

Comparando las Figuras 4a y 4c (vidrio sin funcionalizar) con las figuras 4b y 4d (vidrio funcionalizado químicamente), se puede concluir que el uso de la funcionalización del soporte de vidrio proporciona resultados significativamente mejores, desde el punto de vista de sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión) que los obtenidos con el soporte de vidrio no funcionalizado.

Visualmente, se puede observar que la calibración obtenida a partir de medidas realizada sobre el soporte de vidrio funcionalizado muestran bandas de confianza (bandas oscuras) y bandas de predicción (bandas claras) mucho más estrechas, asociadas a una mayor precisión y exactitud, que la calibración realizada con las

medidas obtenidas sobre el vidrio funcionalizado.

En la Tabla 2 se muestran los datos estadísticos de las calibraciones. En el caso de las Au-NPs, se observa un aumento de la linealidad de la calibración en términos de coeficiente de determinación ( $r^2$ ), siendo de 0.9694 para el caso del vidrio no funcionalizado a 0.9966 para el caso de vidrio funcionalizado. En cuanto a la sensibilidad, se observa que la pendiente de la recta de calibración obtenida con soporte de vidrio funcionalizado aumenta un 4.7 % respecto a la pendiente obtenida con el soporte de vidrio no funcionalizado, lo que supone un ligero aumento de la sensibilidad debido a la funcionalización.

En el caso de las partículas Ag-NPs, se observa que, al utilizar la funcionalización del soporte de vidrio, la linealidad de la calibración se ve considerablemente mejorada ya que hay un aumento de hasta 3.7 veces en el coeficiente de determinación obtenido en la calibración con el soporte de vidrio no funcionalizado. Resultados similares se observan respecto a la sensibilidad, ya que la pendiente de calibración con el soporte de vidrio no funcionalizado (106.00) aumentó a 455.13, lo que constituye un aumento del 329.5 % debido a la funcionalización. Es decir, que sin la funcionalización del soporte de vidrio no hubiese sido posible la cuantificación de Ag-NPs.

**Tabla 2.** Datos estadísticos de curvas de calibración

NPMs	Vidrio funcionalizado	$r^2$	Pendiente ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )	Intercepto	Incremento sensibilidad*
Au-NPs	No	0.9694	365.20	697.17	4.7 %
	Sí	0.9966	382.24	698.84	
Ag-NPs	No	0.2640	106.00	3339.49	329.5 %
	Sí	0.9973	455.13	2688.69	

\*Relación de las pendientes obtenidas con soporte de vidrio funcionalizado y no funcionalizado.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de nanopartículas sólidas metálicas caracterizado porque comprende:
- Funcionalizar la superficie de un soporte de vidrio con grupo silano
  - Depositar sobre soporte funcionalizado las nanopartículas metálicas a analizar
  - Realizar un análisis por espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS) de las partículas soportadas sobre el vidrio funcionalizado.
- 10 2. Método, según reivindicación 1, donde la funcionalización del soporte de vidrio comprende las siguientes etapas:
- Activación de la superficie de vidrio mediante inmersión en una disolución de acuosa de un ácido mineral en concentraciones entre 5 - 50 % m/m.
  - 15 - Lavado del vidrio activado por inversión en una solución de con agua tipo 1, de conductividad eléctrica máxima a 25 °C = 0.056  $\mu$ S/cm y resistividad eléctrica mínima a 25 °C = 18.2 M $\Omega$ ·cm.
  - Inmersión de los soportes de vidrio previamente lavados en una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entre el 10-50% (m/m) entre 30-80 °C de temperatura durante 15-50 minutos; enfriamiento posterior a temperatura ambiente; agregación de una solución de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) concentrado (25.0 – 30.0 % NH<sub>3</sub> base); posterior enjuague vigorosamente con agua tipo 1; y último lavado con metanol ( $\geq$ 99.8% m/m).
  - 20 - Inserción de los grupos silano (-SH) en la superficie del vidrio mediante la inmersión, durante un tiempo comprendido entre 10 y 40 minutos a temperatura ambiente, del vidrio previamente activado y lavado, en una disolución de 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano entre el 0.5 - 5%, empleando como disolvente una solución de metanol en agua (tipo 1) entre 10-30 % en metanol, previamente ajustada a un pH entre 2 y de 5 con ácido acético y agitada vigorosamente durante 10 min.
  - 25 - Extracción de la solución previa, enjuague vigoroso con etanol ( $\geq$ 96% m/m) y posterior curado y secado en horno a 80-120 °C entre 10-40 minutos.
  - 30
- 35 3. Método, según reivindicación 2, donde la superficie de vidrio portaobjetos o cubreobjetos se activa mediante la inmersión, en primer lugar, en una solución

- 5 acuosa de ácido nítrico entre 5-50 %, a temperatura ambiente durante 24 horas, y se lava con agua antes de ser sumergido en una solución acuosa de peróxido de hidrógeno entre 10-50 % manteniendo la temperatura entre 30-80 °C durante 15-50 minutos para, después, enfriarlo hasta temperatura ambiente antes de añadir 5 ml de disolución concentrada de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) entre 25-30 %  $\text{NH}_3$ .
- 10 4. Método, según reivindicación 2, donde los grupos silano en la superficie del soporte de vidrio activado se injertan sumergiendo durante 1-30 minutos el vidrio activado en una solución de metanol al 10-30% en agua tipo 1, con un pH previamente ajustado entre 2-5 sobre la que se añade ácido acético, para disolver 3-(mercaptopropil) trimetoxisilano hasta una concentración final entre 0.5-5 %.
- 15 5. Método, según reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas metálicas con nanopartículas de oro.
6. Método, según reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas metálicas con nanopartículas de plata.
- 20 7. Método, según reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas metálicas pueden ser de cualquier metal comprendidas en el rango de 1 a 500 nm.
8. Soporte de vidrio funcionalizado con grupos silano, según reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque dispone de pocillos para colocar diferentes muestras de nanopartículas metálicas previa disolución en medio acuoso.
- 25 9. Equipo para la detección y cuantificación de nanopartículas metálicas, según el método reivindicado, donde el espectrómetro de ablación inducida por láser emplea un láser de Nd:YAG que trabaja a una frecuencia de 1 a 100 Hz a una longitud de onda de 1064 nm que irradia sobre una muestra de nanopartículas colocada sobre el soporte de vidrio funcionalizado provocando un produciendo un plasma cuya radiación es detectada mediante un sensor óptico ICCD.
- 30

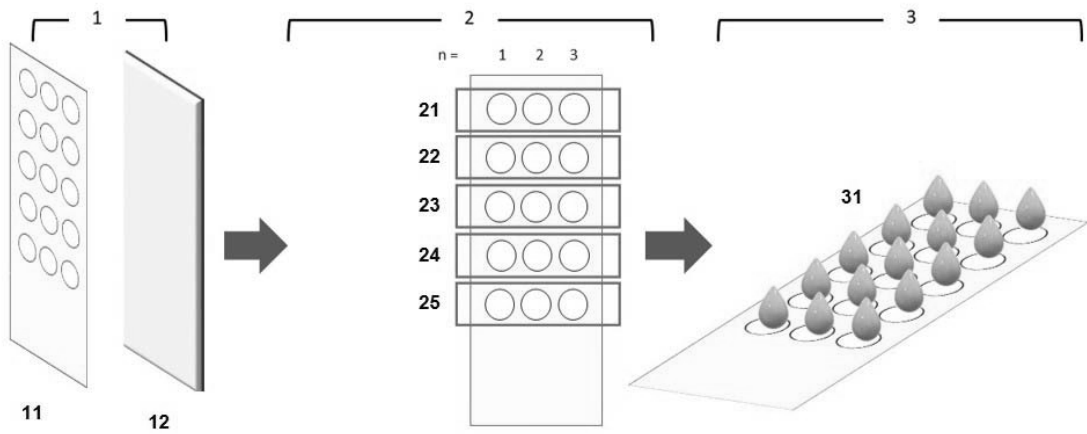


Figura 1

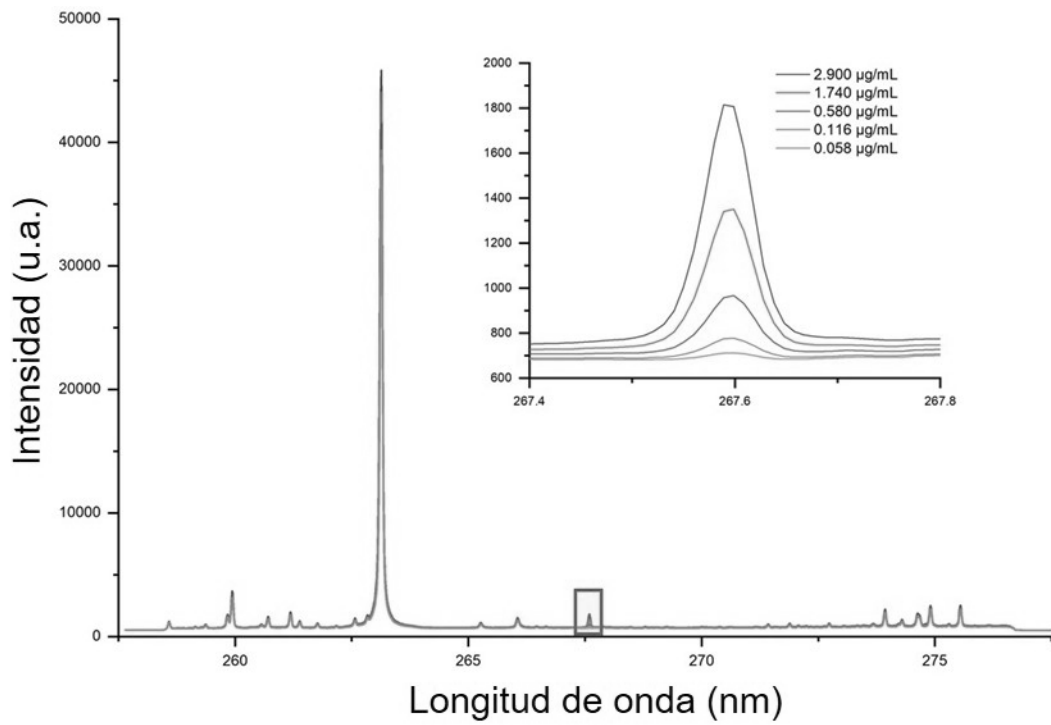


Figura 2

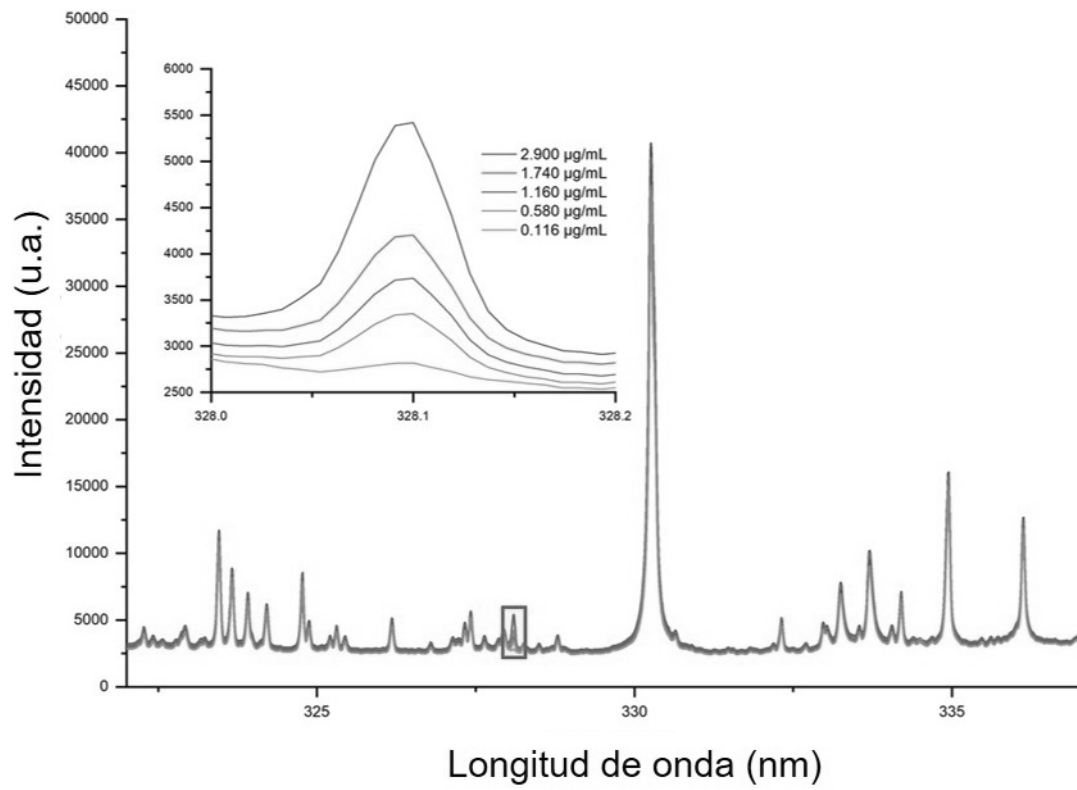


Figura 3

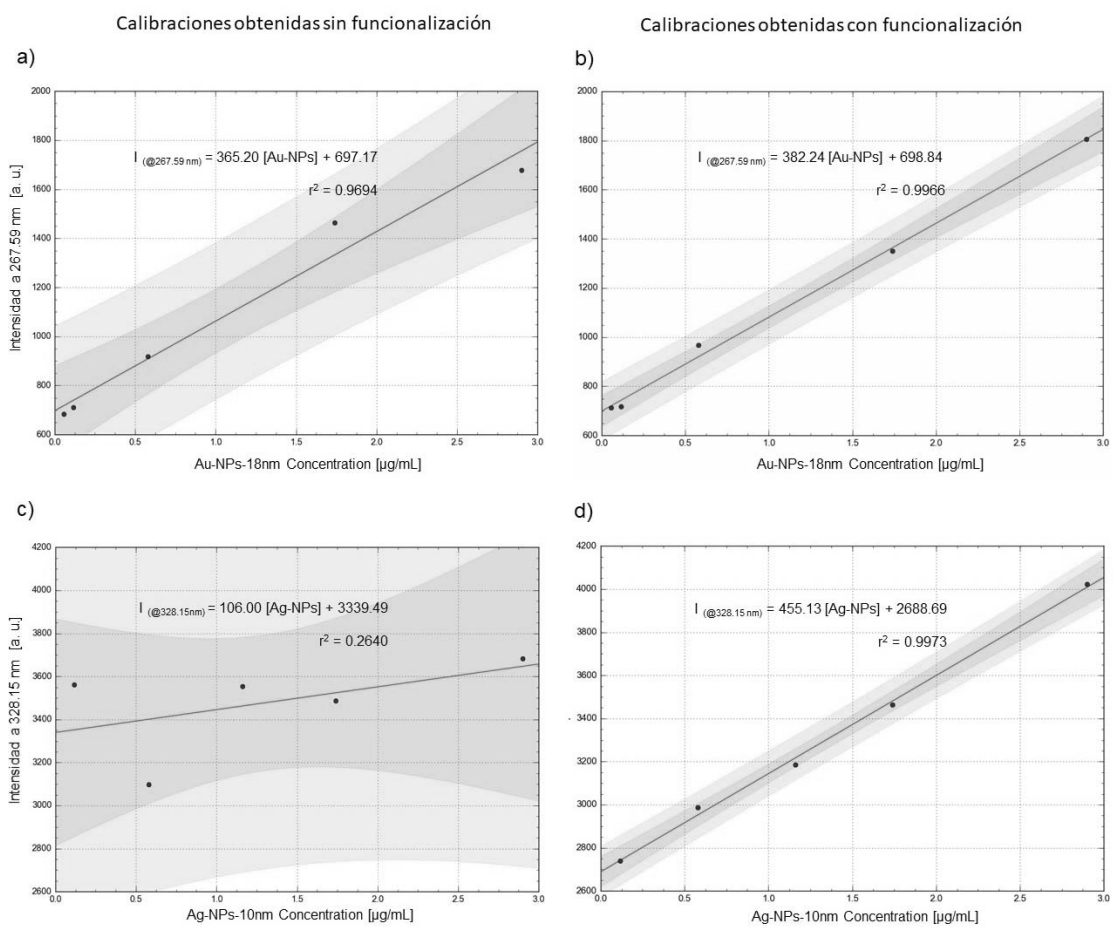


Figura 4