UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ

INSTITUTO DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA INDUSTRIAL Y DE MANUFACTURA

Síntesis, Caracterización y Metodología de Prueba y Análisis de Degradación Acelerada Basado en el Proceso Wiener con Efectos Aleatorios y Medidas de Error para Estimación de Vida Útil de GNPs@LA

Tesis que Presenta

Betania Sánchez Santamaria

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN TECNOLOGÍA

DIRECTORES

Dr. Rey David Molina Arredondo

Dr. Delfino Cornejo Monroy

Ciudad Juárez, Chihuahua. Noviembre 2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres por desear y anhelar siempre lo mejor de mí, a mi amado esposo por su apoyo y comprensión constante y sobre todo a mis hijos por ser los promotores de este sueño.

Gracias a la vida por este logro.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi Comité Tutorial formado por el Dr. Rey David Molina Arredondo, Dr. Delfino Cornejo Monroy y el Dr. Boris Mederos Madrazo por su dirección, tiempo, dedicación y apoyo, sin los cuales no hubiese sido posible la realización de este trabajo. También deseo agradecer al Dr. Salvador Noriega por sus valiosas observaciones y consejos los cuales contribuyeron al mejoramiento de esta tesis.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme apoyado a lo largo de mis estudios, así como también a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez por permitirme sus instalaciones para realizar dichos estudios y elaboración de este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS 7

LISTA DE FIGURAS 8

RESUMEN 9

1. INTRODUCCIÓN 11
1.1. Antecedentes 11
1.2. Planteamiento del Problema 14
1.3. Objetivos 15
1.3.1. Objetivos Generales 16
1.3.2. Objetivos Específicos 16
1.4. Hipótesis 17
1.4.1. Hipótesis Generales 17
1.4.2. Hipótesis Particulares 17
1.5. Justificación 18
1.6. Delimitación 19
1.6.1. Alcances 19
1.6.2. Limitaciones 20

2. MARCO TEÓRICO 21
2.1. Nanotecnología 21
2.1.1. Técnicas de Caracterización 22
2.1.2. Viabilidad Celular – Ensayo MTT 25
2.1.3. Estabilidad en GNPs@LA 27
2.2. Ingeniería de Confiabilidad 28
2.2.1. Confiabilidad 28
a) Función de Confiabilidad 29
b) Percentil 29
c) Tasa de Falla Instantánea 30
d) Estimación por Máxima Verosimilitud (MLE) 30
2.2.2. Enfoques para la Estimación de la Confiabilidad 32
a) Enfoque Tradicional 32

b) Enfoque de Degradación 32
2.2.3. Modelos de Degradación Acelerada 34
a) Modelo Acelerado 34
b) Modelo de Degradación 36
2.2.4. Proceso de Degradación Wiener 37
a) Proceso Wiener con Parámetro de Deriva 37
b) Proceso Wiener con Errores de Medición 39
c) Proceso Wiener con Efectos Aleatorios 40
d) Proceso Wiener con Covariables 41
2.2.5 Inferencia Estadística del Proceso de Degradación Wiener 41
a) Proceso Wiener con Parámetro de Deriva, Covariables, Efectos Aleatorios y Errores de Medición 41
b) Distribución de Vida 44
c) Estimación de Parámetros de ADT de Esfuerzo Constante 45
d) Criterio AIC para Selección del Modelo 48
e) Intervalo de Confianza Bootstraping 48
f) Criterio de Cramér-von Mises 49
2.2.6. Planes de Prueba de Degradación Acelerada 50

3. METODOLOGÍA 52
3.1. Materiales 52
3.2. Métodos 53
3.2.1. Caracterización de GNPs@LA 53
3.2.2. Análisis de Confiabilidad 55

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 61
4.1. Caracterización de GNPs@LA 61
4.1.1. Estabilidad 61
a) Soluciones Coloidales 61
b) Espectroscopia UV-Vis 62
c) Polvo de GNPs@LA 63
4.1.2. Morfología y Tamaño 64
4.1.3. Composición – Grupos Funcionales 64
a) Espectroscopia FT–IR 65
b) Espectroscopia Raman 65

4.1.4. Ensayo de Citotoxicidad 66
4.2. Análisis de Confiabilidad 68
4.2.1. Plan ADT de Esfuerzo Constante 68
4.2.2. Datos de Degradación 72
4.2.3. Modelo de Degradación Acelerada 73
4.2.4. Estimación de Parámetros 77
4.2.5. Vida Útil GNPs@LA y Evaluación de los Modelos Propuestos 78

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 85
5.1. Conclusiones 85
5.2. Recomendaciones 86

6. ADENDUM 89

7. PRODUCTOS OBTENIDOS 91

8. BIBLIOGRAFÍA 94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de Enlace para Esfuerzo Acelerado 42

Tabla 2. Modelos con Distinta Función de Enlace 58

Tabla 3. Mediciones Iniciales y Finales del Área en el ADT 73

Tabla 4. Medición Inicial y Final del Incremento de Degradación en ADT 74

Tabla 5. Valores $\boldsymbol{kij}$ representados en el ADT 76

Tabla 6. Parámetros Óptimos del Modelo de Degradación Acelerada 77

Tabla 7. Modelo de Proporción de Falla para la Degradación Acelerada 78

Tabla 8. Proporción de Falla con Diferentes Porcentajes de NaCl para cada Modelo Propuesto 80

Tabla 9. Comparación de Datos Experimentales vs Modelo Propuesto 81

Tabla 10. Valores del Criterio AIC para Modelos Propuestos 82

Tabla 11. Valores de P-Valor para Modelos Propuestos 83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectros de GNPs de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 nm de Diámetro de Abajo hacia Arriba, respectivamente 23

Figura 2. Espectro de GNPs Dispersa y Aglomerada..... 24

Figura 3. Umbral de Degradación de Falla 33

Figura 4. Metodología para la Estimación de Parámetros del Modelo Propuesto, así como su Evaluación y Validación para la Estimación de Vida Útil. 59

Figura 5. Fotografía de las Soluciones Coloidales..... 62

Figura 6. Espectros UV-Vis de Nanopartículas de Oro Coloidales, a) GNPs y GNPs con Promotores de Aglomeración, b) GNPs@LA y GNPs@LA con Promotores de Aglomeración, y c) GNPs@LA versus GNPs@LA Redispersados en Agua Después del Secado..... 63

Figura 7. Fotografías de a) GNPs@LA y b) GNPs@LA+NaCl Ambas en Polvo 63

Figura 8. Micrografías TEM de GNPs@LA a Diferentes Aumentos. Barras de Escala a) 20 nm b) 10 nm, y c) Histograma de Distribución de Tamaños. 64

Figura 9. Espectros FTIR de GNPs@LA vs GNPs@LA+NaCl 65

Figura 10. Espectros RAMAN de GNPs@LA 66

Figura 11. Viabilidad Celular a Diferentes Concentraciones..... 67

Figura 12. Morfología de Fibroblastos a Diferentes Concentraciones Después de 24 horas: a) Control b) 20 µg / ml c) 60 µg / ml d) 100 µg / ml e) 250 µg / ml f) 500 µg / ml g) 750 µg / ml h) 1000 µg / ml..... 67

Figura 13 Espectros de Medición Inicial vs Medición Final del ADT en GNPs@LA .. 69

Figura 14. Consistencia del Material al 16% de NaCl los Últimos Días de Medición. 70

Figura 15. Espectros Promedio de Medición Inicial contra Medición Final 71

Figura 16. Señales de Degradación en Absorbancia, Picos y Áreas a Diferentes Porcentajes..... 72

Figura 17. Trayectorias de Degradación..... 75

Figura 18. Densidad y Densidad Acumulada a 4%, 8%, 12%, 16% de NaCl de Abajo hacia Arriba Respectivamente..... 79

Figura 19. Resultados del Método Bootstrap en cada Modelo Propuesto 83

RESUMEN

La nanotecnología se ha convertido en un área cada vez más innovadora, en particular, ha abierto amplias posibilidades en aplicaciones industriales y biomédicas, sin embargo, para la aplicación exitosa de nanomateriales se necesita primeramente el control de ciertas características del material, como el tamaño, la estabilidad, la forma, la química de la superficie, la citotoxicidad e incluso el método de síntesis. Asimismo, hay otro aspecto importante a considerar como la vida útil del nanomaterial, debido a que pueden ser inestables en ciertas condiciones, lo que puede provocar la falla en sus propiedades y por ende en su aplicación. Considerando esta situación, las nanopartículas de oro estabilizadas con ácido lipoico (GNPs@LA), estudiadas en este proyecto se están desarrollando como un nanomaterial tentativo para ser evaluado por ensayos clínicos, motivo por el cual el propósito de este trabajo es establecer la caracterización que sustenten y dirija la posibilidad de su aplicación, así como la evaluación de vida útil que asegure su calidad, eficiencia y confiabilidad una vez fabricadas. Para ello en el primer capítulo se discute el problema, los objetivos, las hipótesis y la justificación de este proyecto.

En el segundo capítulo se discuten las teorías que sustentan este trabajo, Nanotecnología e Ingeniería de Confiabilidad. La teoría de nanotecnología aborda conceptos básicos y las técnicas de caracterización, como son la espectroscopía UV-Vis, FT-IR, Raman, TEM, y el ensayo MTT, así como estudios de estabilidad los cuales fueron utilizados como el mecanismo de degradación que se utilizó en el estudio de confiabilidad. Por su parte, la ingeniería de confiabilidad detalla el proceso de degradación estocástico Wiener para la obtención de proporción de falla. En esta sección, se aborda el tema de pruebas de degradación acelerada (ADT), con el cual se obtiene datos de degradación a través del mecanismo estudiado y son modelados a través de la teoría de procesos de degradación para la estimación de la vida útil.

La metodología que guía el desarrollo de esta investigación aplica estas dos teorías, describe los materiales utilizados, así como las técnicas aplicadas para la caracterización de GNPs@LA con las cuales se analizó su estabilidad, composición, morfología y las concentraciones tóxicas a nivel celular. Para el análisis de confiabilidad se detalló una metodología de prueba y análisis degradación acelerada con un factor degradante y se basó en el proceso Wiener para estimación de vida útil de GNPs@LA.

Por último, se presentan los resultados en los que se destaca que GNPs@LA son nanopartículas de oro ultrapequeñas, esféricas no aglomeradas con un tamaño promedio de 2.5 nm. Son altamente estables, tienen grupos funcionales COOH y a concentraciones inferiores a 100 µg/mL no son citotóxicas. A su vez, se presenta el análisis de confiabilidad con el cual se determinó la proporción de falla a través del modelo de degradación acelerada con el cual se puede estimar la vida útil de GNPs@LA en función de su factor degradante.

Con lo anterior, este trabajo contribuye a que GNPs@LA se siga desarrollando y viabilice su posible introducción como un material nanotecnológico con caracterización y estimación de vida útil. Asimismo, este trabajo ha abierto áreas de oportunidad para seguir investigando por lo que en el apartado de conclusiones y recomendaciones se mencionan, además se detallan algunas observaciones que pudieran considerarse para trabajos posteriores. Por último, se agrega un adendum con una descripción breve de estudios clínicos que se pudieran llevar a cabo después de este trabajo para dirigir este material a una posible aplicación clínica.

1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se exponen los antecedentes del proyecto, seguidos del planteamiento del problema, los que preceden a los objetivos, las hipótesis y la justificación del proyecto, para terminar, comentando el alcance y delimitación.

1.1. Antecedentes

La nanotecnología es una ciencia en crecimiento considerada una tecnología emergente [1] encargada del estudio, desarrollo y aplicación de materiales a escala nanométrica especialmente de materiales con al menos una dimensión longitudinal entre 1 y 100nm [2]. La importancia de los nanomateriales radica en sus propiedades iónicas [3], catalíticas[4], [5], térmicas [6], eléctricas [7] y ópticas [5], las cuales son manipulables con base al tamaño, composición, distancia interarticular, propiedades del medio así como su forma [5] originando con ello una amplia gama de aplicaciones.

Hay diferentes tipos de nanomateriales como son los fabricados con base de carbono [8], polímeros [9] sintéticos [10] y metálicos [11]. Dentro de los nanomateriales metálicos, las nanopartículas de oro (GNPs) son de los más fascinantes debido a sus propiedades físicas y químicas [12], [13]. Además de su síntesis relativamente simple, resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y funcionalización sin complicaciones, así como a la conjugación con una gran variedad de entidades biológicas [13].

Debido a ello, las GNPs han logrado ser ampliamente utilizadas en bioimagen y fototerapia ya que combinadas con la aplicación de un campo magnético generan un biosensor [14] capaz de detectar ciertas enfermedades como el cáncer [15], SARS-CoV-2 [16] Alzheimer y Salmonela [17], [15], también como portadores químicos [18], [19] donde los nano transportadores basados en nanopartículas de oro han surgido como candidatos atractivos para el transporte

y descarga de productos farmacéuticos en tumores cancerígenos [17], y más recientemente como agentes teranósticos [20], [21] ya que se pueden difundir a través de barreras biológicas, siendo capaces de llegar a sitios de interés para servir como estrategia terapéutica, menos agresiva y más eficiente que las actualmente en uso [15].

A pesar de los grandes beneficios y aplicaciones de las GNPs todavía hay preocupaciones en cuanto al diseño de los nanomateriales debido a que pueden presentar efectos secundarios y riesgos potenciales. Aunado a esto si la aplicación es clínica, es necesario evaluar estudios de acoplamiento como son ensayos de irritabilidad, toxicidad, biodistribución, biocompatibilidad y biodegradación según sea la aplicación clínica deseada.

Las nanopartículas de oro estabilizadas con ácido lipoico (GNPs@LA), estudiadas en este proyecto se están desarrollando como un nanomaterial tentativo que posee ventajas sobre otras nanoestructuras de oro debido a su método de fabricación sencillo, eficiente, rápido y económico, que pudiera tener diversas aplicaciones para la medicina debido a su pequeño tamaño, por ejemplo, estudios indican que las nanopartículas ultra pequeñas por debajo de 5 nm tienen ventajas únicas en el cuerpo humano debido a su eliminación relativamente rápida, buena absorción e interacción favorable con la radiación [16], [17].

Sin embargo, para tener éxito, el tamaño, la estabilidad, la forma, la química de la superficie, la citotoxicidad e incluso el método de síntesis son características que deben de estar determinadas ya que estas conducen a una mejor comprensión de como las diferentes propiedades de las nanopartículas afectan la respuesta biológica en un estudio de acoplamiento. Estas características pueden ser determinadas a través de ciertas variantes como son la estabilidad, la creación de grupos funcionales, la viabilidad celular. En lo que se refiere a la estabilidad de las nanopartículas de oro, esta debe ser lo suficientemente fuerte como para resistir condiciones agresivas [11], [12]. Además, es ideal que se creen grupos

funcionales útiles para unir entidades biológicas que otorguen propiedades físicas y químicas necesarias para lograr requisitos específicos para una aplicación determinada [22]. Aunado a esto, si la aplicación es biomédica, es importante tener en cuenta que las interacciones de las nanopartículas funcionalizadas en la superficie con las células no dañen la integridad de la estructura de la membrana [22] ni afecten el funcionamiento de la viabilidad celular [23], [24].

Además de la estabilidad, creación de grupos funcionales y el funcionamiento de la viabilidad celular, hay otro aspecto importante a considerar, los nanomateriales al igual que cualquier otro material después de fabricado presentan deterioro que involucran una interacción muy compleja entre el esfuerzo, el tiempo y el ambiente, ocasionando eventualmente la falla del producto[5]. Aunado a esto, las propiedades de las nanopartículas son sensibles a los materiales utilizados, así como al anfitrión medio [25], por lo cual es de suma importancia con qué tipo de material esta interactuando.

En la actualidad todavía quedan retos en el procesamiento de tecnologías explícitas de conocimiento tales como garantías en el área de nanotecnología dadas las limitaciones y desventajas de los existentes enfoques [1], [26]. En este sentido, para incidir en la problemática se puede recurrir a la confiabilidad, que es una disciplina enfocada en medir, modelar y evaluar aspectos relacionados con el desempeño de un producto ya después de fabricado [27], [28].

No obstante, un problema al calcular la confiabilidad de un producto es el tiempo total requerido, especialmente en áreas tecnológicas donde los componentes tienen una vida larga y su tiempo requerido para lanzar al mercado es corto [29], por lo que se emplean pruebas de vida acelerada (ALT).

Sin embargo, hay productos, en lo que se pueden observar pocas o ninguna falla en un corto tiempo de prueba, por lo que se recurre a pruebas de vida acelerada con un enfoque de degradación llamadas pruebas de degradación

acelerada (ADT), que son usadas, particularmente para obtener información de confiabilidad en componentes y materiales, estas consisten en degradar la vida del producto aplicando un factor de aceleración el cual provoca la degradación del material [30], el principal objetivo es obtener información rápida la cual es modelada para estimar la vida útil del material en condiciones normales de uso y a su vez minimizar los costos y tiempos involucrados en la prueba obteniendo datos de vida confiables a través del tiempo [31].

Para materiales de reciente creación estudios actuales han adoptado un ADT en la evaluación de la confiabilidad basado en el proceso Wiener. El proceso Wiener se encuentra con frecuencia en la práctica ya que proporciona una descripción satisfactoria y flexible en datos de degradación obtenidos después de haber realizado un ADT [32].

Por lo tanto, existen herramientas que pueden ser utilizadas para evaluar la información de vida a través del tiempo y así proporcionar garantías en la nanotecnología. De esto desprende el interés de contribuir en esta ciencia, aplicando estudios de confiabilidad en un material nanoestructurado como son GNPs@LA asimismo obtener la caracterización de este material que demuestre su estabilidad, grupos funcionales y las concentraciones no toxicas a nivel celular, para con ello dar avance a estudios de acoplamiento para una aplicación determinada. Como respuesta a lo anterior, el presente trabajo de investigación contribuye a que GNPs@LA viabilice su posible introducción como un material nanotecnológico con caracterización y vida útil garantizada.

1.2. Planteamiento del Problema

En esta sección se describen las dos vertientes del problema investigado, iniciando en la práctica industrial de la caracterización de nanopartículas de oro, que precede a los aspectos teóricos de la síntesis, seguido de los relacionados con métodos de prueba y análisis de degradación.

En lo que se refiere a la síntesis industrial, específicamente a los procesos y materiales que se utilizan en la práctica para la síntesis de nanopartículas de oro. En la actualidad, muchas entidades utilizadas para estabilizar GNPs no crean grupos funcionales notables otras utilizan productos químicos peligrosos y su fabricación es mediante muchos pasos consumiendo con ello, tiempo [33]–[35], lo que impacta en el alto costo de producción de nanopartículas de oro [13] induciendo el desarrollo de procesos más eficientes. Si bien la síntesis de GNPs@LA que se propone es un método establecido, faltan todavía aspectos por considerar como son las concentraciones que no aporten efectos citotóxicos, estudios de estabilidad, composición y morfología, que, aunque constituyen importante evidencia empírica, no se tienen los resultados para considerar que se tiene un producto industrial con características determinadas para la práctica.

Por su parte, en lo que corresponde a la dimensión teórica del problema, hay importantes lagunas de conocimiento con respecto a vida útil a través del tiempo en nanomateriales lo que provoca que no se tenga garantías en hojas de seguridad, debido a que los estudios encontrados en la literatura actual no proporcionan métodos de prueba y análisis de degradación que aporten información confiable e incuestionable de la vida útil a través del tiempo, reportando con ello la necesidad de reformas regulatorias para mejorar la supervisión a lo largo de su ciclo de vida [36], [37]. Provocando una necesidad de desarrollar formas para estimar su confiabilidad, debido a que pueden ser inestables en ciertas condiciones, lo que puede provocar la falla en sus propiedades y por ende en su aplicación.

1.3. Objetivos

Esta sección presenta los propósitos de este proyecto de investigación, en el primer apartado se expone el objetivo general seguido de sus particulares.

1.3.1. Objetivos Generales

- Sintetizar y caracterizar GNPs@LA con tamaño menor de 5nm no toxicas.
- Estimar la distribución de vida de GNPs@LA mediante pruebas de degradación acelerada aplicando NaCl como factor de aceleración.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Fabricar nanopartículas de oro estabilizadas con ácido lipoico GNPs@LA.
- Determinar las características funcionales, morfológicas y estructurales de GNPs@LA.
- Determinar la viabilidad celular en GNPs@LA para encontrar las concentraciones citotóxicas.
- Diseñar y llevar a cabo un plan de esfuerzo constante para ADT y realizar las pruebas de degradación en GNPs@LA usando NaCl como factor de aceleración.
- Analizar los datos de degradación a través de un modelo de degradación acelerada bajo el proceso estocástico Wiener no lineal con errores de medición, efectos aleatorios y distinta covariabilidad.
- Estimar la vida útil de GNPs@LA a través de la proporción de falla en función del factor de aceleración.

1.4. Hipótesis

Esta sección presenta las premisas a comprobar, inicia en la discusión de la hipótesis general para después exponer las particulares.

1.4.1. Hipótesis Generales

- Las GNPs@LA son estables con un tamaño menor de 5nm no toxicas.

- La distribución de vida de GNPs@LA pueden ser estimada en condiciones de uso a través de pruebas de degradación acelerada usando NaCl como factor de aceleración.

1.4.2. Hipótesis Particulares

- H1: Las nanopartículas de oro sintetizadas con ácido lipoico tienen características funcionales, morfológicas y estructurales para una posible aplicación biomédica.

- H2: Las nanopartículas de oro sintetizadas con ácido lipoico son citotóxicas a ciertas concentraciones.

- H3: La vida útil puede ser estimada con ADT aplicando NaCl como factor de aceleración.

- H4: El modelo de degradación acelerada utilizando covariabilidad inmersa es el más adecuado para obtener la distribución de vida de GNPs@LA en condiciones normales de uso.

- H5: Las condiciones del método de prueba y análisis de degradación propuestos son adecuadas y eficientes, para estimar la distribución de vida en función del porcentaje de NaCl.

1.5. Justificación

Los investigadores y científicos indican que la nanotecnología promete ser la próxima revolución industrial, de manera que aquellos países que no logren incorporarse podrían quedar fuera de la nueva redistribución industrial, señalando además que la economía mundial se basa crecientemente en el conocimiento y la innovación tecnológica, lo cual coloca en desventaja a países que no invierten en educación y conocimiento [38].

En este contexto, la nanotecnología constituye una gran oportunidad para el desarrollo económico a través de estrategias para impulsar el avance de la ciencia y la tecnología; en este caso, el desarrollo de GNPs@LA puede ser benéfico para impulsar nuevos negocios de capital nacional y contribuir al avance de este importante campo del conocimiento en nuestro país.

Teniendo presente que en la nanotecnología se debe tener un control preciso de vida del material, así como el control de sus características funcionales, morfológicas y estructurales para una aplicación exitosa. Este trabajo presenta, las características mencionadas en GNPs@LA, así como los límites de concentración no tóxicos, con el fin de proponer un material de nanopartículas de oro con características determinadas.

Asimismo, se propone una metodología para prueba y análisis de degradación acelerada como herramienta para obtener la proporción de falla en GNPs@LA, donde la industria de la nanotecnología se puede beneficiar por esta metodología porque tendrá acceso a un proceso de garantía que tiene ventajas como la estimación de vida útil a través del tiempo evitando posibles

consecuencias por fallas generando así satisfacción al cliente y contribuyendo a la regulación de la nanotecnología.

Aunado a esto, específicamente las industrias de nanoestructuras de oro pueden tener un alto interés en GNPs@LA debido a que es un proceso de producción garantizado, sustentable para obtener nanopartículas de oro con vida útil, no toxicas, ultrapequeñas, altamente estables, funcionales y biocompatibles utilizando una ruta de síntesis rápida, eficiente, simple y económica impactando a la sociedad en general.

Por su parte, la metodología propuesta es una contribución importante en la teoría de la nanotecnología porque los procesos para obtener garantías contenidos en la literatura no tienen los enfoques ni los propósitos de la metodología propuesta, dadas estas características. Por consiguiente, este enfoque abre una puerta para el desarrollo de investigaciones posteriores considerando este trabajo como base fundamental para seguir contribuyendo a la nanotecnología.

1.6. Delimitación

Este apartado presenta la delimitación de este proyecto, iniciando con los alcances esperados para después establecer sus limitaciones.

1.6.1. Alcances

- Se analizará a través de UV-Vis, FT-IR, espectroscopias Raman y TEM la estabilidad, composición y morfología de GNPs@LA. Además, la citotoxicidad a diferentes concentraciones a través del ensayo MTT.

- Se determinará un plan de prueba a través de estudios exploratorios en GNPs@LA y NaCl como factor de aceleración.

- Con base en la investigación se propondrá el proceso estocástico Wiener para el ajuste de las trayectorias de degradación.

1.6.2. Limitaciones

- Este trabajo se enfoca en el estudio y análisis de GNPs@LA.

- El plan de prueba se obtendrá a partir de estudios exploratorios, para así llevar acabo un enfoque de degradación ADT de estrés constante.

- Se analizará la degradación de cada muestra con NaCl como factor de aceleración.

- El análisis de degradación se realiza a través de la caracterización obtenida en la espectroscopia UV-Vis.

- Se estima la vida útil a través de la proporción de falla de GNPs@LA en función del factor de aceleración.

2. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se discute la teoría que respalda este proyecto, la primera sección inicia en la teoría de la nanotecnología, que precede a la caracterización, estabilidad y citotoxicidad; la segunda sección presenta lo correspondiente a la ingeniería de confiabilidad que antecede a la degradación para la estimación de la vida útil.

2.1. Nanotecnología

La nanotecnología se ha convertido en un área cada vez más innovadora, en particular, ha abierto amplias posibilidades en aplicaciones biomédicas, como resultado de nuevos compuestos que permiten la combinación de diferentes tipos de métodos y materiales para preparar nanopartículas.

Hay dos enfoques principales para la preparación de materiales nanoestructurados en general, ya sea a través de métodos físicos o químicos [39]. A los métodos físicos se les conoce como “top-down” o de “arriba-abajo”. A los métodos químicos se les conoce como “bottom-up” o de “abajo-arriba” [40], la segunda opción es la más usada por su simplicidad y por la habilidad del agua para solubilizar una gran cantidad de iones y estabilizar moléculas [41][42].

Para la fabricación de GNPs@LA una metodología propuesta por D. Cornejo et al.[43], es un ejemplo de fabricación de nanopartículas de oro coloidal obtenidas por un método químico el cual genera nanopartículas de oro ultra pequeñas estabilizadas con ácido lipoico. Hasta donde sabemos, no se tienen muchos estudios de las GNPs estabilizadas con ácido lipoico, en medicina, el ácido lipoico (LA) se usa para tratar muchas enfermedades, debido a sus propiedades antioxidantes [44].

Las GNPs han demostrado tener aplicaciones potenciales en muchas áreas de investigación. En medicina, las nanopartículas ultra pequeñas por debajo de

5 nm tienen ventajas únicas en el cuerpo humano debido a su eliminación relativamente rápida, buena absorción e interacción favorable con la radiación [13], [45]. Por ejemplo, las nanoestructuras de oro han sido probadas como sensores[14] capaces de detectar ciertas enfermedades como el cáncer [15], SARS-CoV-2 [16] Alzheimer y Salmonela [17],[15], también como portadores químicos [18], [19] y como agentes teranósticos [20], [21].

Existe una intensa investigación sobre cómo aprovechar las propiedades únicas de las GNPs incluidas las aplicaciones antes mencionadas. Sin embargo, antes de que este material se pueda aplicar de forma segura en un entorno clínico, es necesario evaluar cuidadosamente su biocompatibilidad, biodistribución y biodegradación. Estos conceptos están definidos brevemente en la sección de Adendum.

Para iniciar una aplicación exitosa en nanomateriales, el diseño es pieza fundamental por lo que el control de ciertas características del material, son necesarias antes de proceder a una evaluación clínica, estas características son: el tamaño, la estabilidad, la forma, la química de la superficie, la citotoxicidad e incluso el método de síntesis. Para ello, la nanotecnología utiliza técnicas de caracterización que sirven para identificar y evaluar las características funcionales, morfológicas y estructurales en un nanomaterial.

Entre las más comunes se encuentran, espectroscopía UV-Vis, la microscopia electrónica de transmisión (TEM), La espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y La espectroscopia Raman. Las cuales son descritas brevemente a continuación.

2.1.1. Técnicas de Caracterización

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de espectroscopia de emisión de fotones que utiliza luz visible ultravioleta la cual es absorbida por las moléculas

provocando transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas a través de los espectros. La espectroscopia de UV-Vis determina, en el caso de las nanopartículas, la posición y forma de la banda del plasmón superficial que está relacionada con la morfología y tamaño de la nanopartícula, así como la dispersión de tamaños de la muestra [46].

Algunos metales como el oro presentan transiciones electrónicas de bandas en el rango visible con una longitud de onda de 450 nm a 550 nm en nanopartículas esféricas conocida como zona de plasmón. Por lo tanto, algunas longitudes de onda visible son absorbidas emitiendo un color característico con el cual se pueden medir cambios morfológicos en el material [47]. En todas las ramas de la biología molecular, la medicina y las ciencias de la vida, la espectroscopia es una ayuda esencial para la investigación y el control de rutina [48]. En la Figura 1. J. Martínez et al. [49] muestra diversos tamaños de nanopartículas de oro en función del pico característico en la banda del plasmón, en el que se puede observar que conforme el pico característico avanza el diámetro de GNPs aumenta.

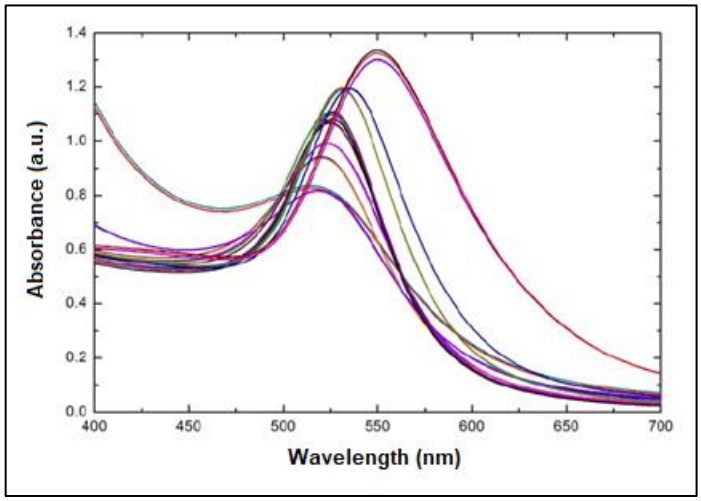


Figura 1. Espectros de GNPs de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 80 nm de Diámetro de Abajo hacia Arriba, respectivamente

Lo anterior se deriva porque las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro cambian cuando las partículas se agregan y los electrones de conducción cerca de la superficie de cada partícula se deslocalizan y se comparten entre las nanopartículas vecinas. Cuando esto ocurre, la resonancia del plasmón de superficie cambia a energías más bajas, lo que hace que el pico característico de absorción y dispersión se desplace hacia longitudes de onda más largas [49].

La espectroscopía UV-Visible se puede utilizar como un método simple y confiable para monitorear la estabilidad de las soluciones de nanopartículas. A medida que las partículas se desestabilizan, el pico característico original disminuirá en intensidad debido al agotamiento de las nanopartículas estables y, a menudo, el pico se ampliará a longitudes de onda más largas debido a la formación de agregados o aglomerados [50].

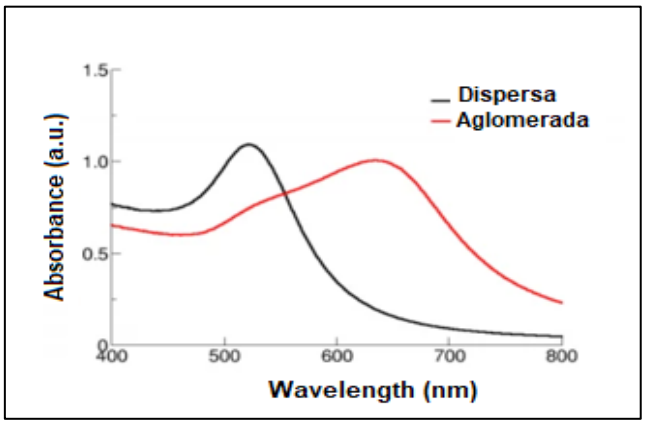


Figura 2. Espectro de GNPs Dispersa y Aglomerada

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) permite la formación de imágenes de la estructura cristalográfica de una muestra en una escala atómica con las cuales se determina la forma y distribución de tamaños de las nanopartículas [51]. Para realizar el análisis, el microscopio utiliza un haz de electrones que atraviesa una muestra la cual debe ser lo suficientemente fina como para que el haz de electrones incidente sea capaz de atravesarla brindando

micrografías de esta. A su vez, en las micrografías obtenidas durante el análisis, se puede observar si las nanopartículas se encuentran dispersas.

La espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) es una técnica empleada para obtener la huella molecular de una muestra biológica que absorbe la onda infrarroja de acuerdo con los enlaces químicos y estructurales de las moléculas, proporcionando información sobre los grupos funcionales presentes en la muestra, así como, de los enlaces que ésta presenta [52]. Para que una molécula absorba energía en el infrarrojo, los enlaces deben vibrar con la misma frecuencia que la energía incidente para así sufrir un tránsito energético a un estado vibracional superior al que se encuentra inicialmente.

La espectroscopia Raman es una técnica espectroscópica molecular que usa la interacción de la luz con la materia para obtener información sobre la composición o las características de un material [53], como FTIR. La información proporcionada por la espectroscopia Raman es el resultado de un proceso de dispersión de la luz, mientras que la espectroscopia FTIR se basa en la absorción de la luz. La espectroscopia Raman proporciona información sobre las vibraciones intramoleculares e intermoleculares y puede proporcionar una comprensión adicional sobre una reacción. Tanto la espectroscopia FTIR como Raman proporcionan un espectro característico de las vibraciones específicas de una molécula y son valiosas para identificar grupos funcionales en una sustancia.

2.1.2. Viabilidad Celular – Ensayo MTT

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, determina la cantidad de células que están vivas o muertas basándose en la actividad mitocondrial de estas. La determinación de la sobrevivencia de las células es necesaria en estudios de citotoxicidad en nanomateriales [54].

Dicho objetivo puede alcanzarse a través del ensayo de una sal tetrazolio mejor conocido como MTT, la cual determina la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método se utiliza para determinar el efecto citotóxico de un compuesto determinado sobre cultivos de células normales y osteoblastos. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido que resulta en su actividad metabólica. Para declarar la citotoxicidad toman como base la norma ISO 10993 que describe métodos de prueba para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de dispositivos médicos [55] donde se destaca la clasificación de citotoxicidad con base a el porcentaje de viabilidad celular: 100-75%: No citotóxico, 74-50%: Ligeramente citotóxico, 49-25%: Moderadamente citotóxicos, 24-0%: Extremadamente citotóxico.

Para el análisis de los datos, una disminución en el número de células vivas da como resultado una disminución en la actividad metabólica en la muestra. Esta disminución se correlaciona directamente con la cantidad de formazán azul violeta formado, según lo monitoreado por la densidad óptica a 570 nm.

Para calcular la reducción de la viabilidad en comparación con el blanco se utiliza la ecuación:

$$Viab.\% = \frac{100xOD_{570e}}{OD_{570b}} \qquad (2.1)$$

OD_{570e} : Es el valor medio de la densidad óptica medida de los extractos al 100% de la muestra de prueba

OD_{570b} : Es el valor medio de la densidad óptica medida de los blancos.

Cuanto menor sea el valor de $Viab.\%$, mayor será el potencial citotóxico del elemento de prueba. Es decir, si la viabilidad se reduce a $< 70\%$ del blanco, tiene un potencial toxico.

2.1.3. Estabilidad en GNPs@LA

El termino estabilidad implica que las partículas sólidas no se sedimentan ni se agregan a una velocidad significativa [56], logrando así la aplicación de estas como fuerza de repulsión en agregados. En contraste, cuando las nanopartículas pierden su estabilidad por agregación, generando una aglomeración de estas, ocasionan un aumento en su tamaño que provoca la perdida de sus propiedades y su aplicación [2].

Una manera de percibir como son afectadas dichas propiedades es analizando un mecanismo de degradación basados en la estabilidad de la nanopartícula el cual puede ser monitoreado utilizando la caracterización por espectroscopia UV-Vis [57], considerando que la forma y la posición del pico de los espectros UV-Vis están relacionadas con la morfología y el tamaño de la nanopartícula, así como con la dispersión y agregación de coloides de oro [47].Una forma de medir la desestabilización es a través del pico característico, donde este disminuirá en intensidad debido al agotamiento de nanopartículas estables y se localizara en longitudes de onda más largas debido a la formación de agregados o aglomerados [50].

En la Figura 1, J. Martínez et al [49] muestra diferentes tamaños de nanopartículas de oro en función del pico característico de la banda del plasmón, se puede observar que su pico característico se recorre hacia el rojo a medida que aumenta el diámetro de las GNPs. Esto se debe a que las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro cambian cuando las partículas se agregan y los electrones de conducción cerca de la superficie de cada partícula se deslocalizan y comparten entre las nanopartículas vecinas [58].Cuando esto ocurre, la resonancia del plasmón de superficie se desplaza a energías más bajas, lo que provoca la absorción característica y el desplazamiento del pico de dispersión a longitudes de onda más largas [49].

Hay evidencia que la estabilidad de las nanopartículas de oro debe estar bien controlada para llegar a los tejidos o células deseadas [59], superando las limitaciones de barreras biológicas para diagnosticar [5] y tratar objetivos profundos [60], [61]. Algunas variables que influyen en la alteración de la estabilidad son el pH [62] del medio así como la presencia de NaCl [63].

2.2. Ingeniería de Confiabilidad

Hoy en día las empresas buscan la reducción del costo invertido en el control de calidad de productos y servicios, con el fin de mantenerse competitivos dentro de la economía, para lograr lo anterior es necesario hacer uso de técnicas que ayuden a garantizar la calidad durante un tiempo establecido.

Una de las técnicas que permite estudiar el comportamiento del desarrollo de los productos y su vida útil para garantizar la calidad es la confiabilidad [64]. Esta teoría está enfocada a medir, modelar y evaluar aspectos relacionados con el desempeño de un producto ya después de fabricado aplicando la estadística como herramienta principal. En una forma práctica, confiabilidad se define como “calidad a través del tiempo”.

En el siguiente apartado se presenta una breve revisión de conceptos de estadística como son el proceso de degradación propuesto, así como el análisis y la obtención de la vida útil.

2.2.1. Confiabilidad

Se puede definir la confiabilidad como la probabilidad de que un componente o sistema desempeñe satisfactoriamente la función para la que fue creado durante un periodo y bajo condiciones de operación establecida [64], algunas definiciones importantes aplicadas en la confiabilidad se muestran a continuación.

a) Función de Confiabilidad

Considerando T la variable aleatoria que indica el tiempo en que un producto funciona correctamente hasta que falla. Sean $f(t)$ la función de densidad y $F(t)$ la distribución acumulada de T, que están dadas por (2.2) y (2.3)

$$F(t) = P(T \leq t). \tag{2.2}$$

Es decir, la probabilidad de que el producto funcione correctamente a lo mucho t unidades de tiempo

$$F(t) = \int_0^t f(t)dt. \tag{2.3}$$

La función de confiabilidad, también conocida como resistencia es el complemento de la distribución acumulada. La cual nos proporciona la probabilidad de que una unidad o fracción de la población presente fallas hasta después de un tiempo t. Por lo tanto, se obtiene que la función de confiabilidad $R(t)$ satisface:

$$R(t) = P(T > t) = 1 - F(t) = 1 - \int_0^t f(t)dt. \tag{2.4}$$

Donde $R(t)$ es la probabilidad de que un producto funcione correctamente por lo menos t unidades de tiempo.

b) Percentil

El percentil o cuantil de $F(t)$ es útil para estimar tiempos de garantía, se denota por τ_p, este indica el tiempo en el que un porcentaje de la población falle, el percentil 50 se expresa como (τ_{50}) es llamado la mediana y es comúnmente usado para la vida típica. La proporción P de la población que fallara, está determinada por

$$P = F(\tau_p). \tag{2.5}$$

c) Tasa de Falla Instantánea

La función de tasa de falla instantánea $h(t)$ es conocida también como tasa de riesgo y se puede interpretar como la probabilidad de que en un instante después de t el producto falle dado que estaba funcionando bien hasta dicho tiempo t. Se define como

$$h(t) = \frac{f(t)}{1-F(t)} = \frac{f(t)}{R(t)}\,. \tag{2.6}$$

Otro parámetro de medición comúnmente utilizado para estudiar las fallas es el tiempo promedio de falla $(MTTF)$, interpretado como la vida promedio que una unidad nueva tendrá hasta que falle.

d) Estimación por Máxima Verosimilitud (MLE)

El método de máxima verosimilitud es utilizado para obtener una aproximación de confiabilidad. La evaluación por este método permite encontrar los valores más probables de los parámetros de una distribución de densidad de probabilidad para un conjunto de datos, lo cual se logra usando métodos iterativos para estimar los valores de los parámetros que maximicen la función de verosimilitud. Además, existen softwares disponibles en el mercado que provee excelentes algoritmos para obtener estimadores a partir del método de máxima verosimilitud con las distribuciones más usadas.

El método de máxima verosimilitud se define dada una muestra aleatoria simple de tamaño n de una población como un conjunto de n variables aleatorias independientes $T_1, \dots, T_n$ que tienen la misma distribución.

Supongamos que $T_1, \dots, T_n$ es una muestra aleatoria simple de n elementos, los cuales proceden de una determinada población con función de

densidad $f_\theta(t)$, donde $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_k)'$ es un vector de parámetros desconocidos que toman valores en un conjunto Ω. La función de verosimilitud $L(\theta)$ para θ es,

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^{n} f_\theta(T_i) \ . \tag{2.7}$$

Evidentemente, la función $L(\theta)$ depende de la muestra, pero es común suprimirla en la notación.

Si $\hat{\theta}$ es donde la función de verosimilitud $L(\theta)$ alcanza su valor máximo, entonces $\hat{\theta}$ se denomina estimador de máxima verosimilitud del parámetro θ, que en muchos modelos de distribución existe y es único. Muchas veces es más cómodo trabajar con la función log-verosimilitud, que también alcanza un máximo en $\hat{\theta}$. Esta función de log-verosimilitud tiene la expresión,

$$l(\theta) = log\big(L(\theta)\big) = \sum_{i=1}^{n} \log\left(f_\theta(T_i)\right) . \tag{2.8}$$

En la mayoría de las ocasiones, el estimador de máxima verosimilitud $\hat{\theta}$ se obtiene resolviendo las k ecuaciones,

$$\frac{\partial l(\theta)}{\partial \theta_i} = 0, \qquad i = 1, \dots, k \tag{2.9}$$

Donde θ_i es la $i - ésima$ componente del vector de parámetros $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_k)'$.

El método de máxima verosimilitud es muy utilizado en la práctica debido a que proporciona estimadores consistentes.

2.2.2. Enfoques para la Estimación de la Confiabilidad

Los modelos estadísticos confían extensivamente en datos para hacer predicciones. En el caso de confiabilidad los datos pueden ser datos de vida del producto los cuales pueden ser analizados por tiempo de falla o datos de degradación. Generando dos enfoques distintos de llevar a cabo el análisis de datos.

a) Enfoque Tradicional

El análisis tradicional de confiabilidad se basa en datos de tiempo de falla. En general, hay dos tipos de falla: falla suave y falla dura. La falla suave ocurre cuando el producto no falla catastróficamente, pero alcanza un nivel especifico de degradación. La falla dura es causada por accidentes repentinos perdiendo la funcionabilidad total del producto.

En el enfoque tradicional de análisis de confiabilidad, es estudiado por Meeker y Escobar [64], donde supone que debemos obtener la distribución de vida del producto a partir de los tiempos de falla. Suponga que $T_i \sim F(\bullet;\theta)$ $(i = 1,2,\dots,n)$ donde $T_1, T_2, \dots T_n$ es un conjunto de vidas del producto. Es posible que el tipo de distribución no se conozca desde el principio, sin embargo, podemos usar el grafico de probabilidad para evaluar qué tipo de distribución se ajusta mejor a los datos de tiempo de falla. Generalmente en muchas aplicaciones la vida útil de los productos se ajusta a una distribución Weibull o lognormal [65]. Una vez que se conoce $F(\bullet;\theta)$, Se puede utilizar el método de máxima verosimilitud para estimar el parámetro.

b) Enfoque de Degradación

En muchos casos, puede resultar difícil observar el tiempo de falla de un producto altamente confiable. Por consiguiente, es urgente buscar formas alternativas de hacer el análisis de confiabilidad. Como solución, estudios emplean un enfoque de degradación donde se utiliza la reducción en el rendimiento del producto a

través del tiempo, generando una función en el tiempo con la cual se pueden tomar medidas en diferentes momentos para obtener datos de degradación, los cuales proporcionan más información del producto que los datos de falla ya que registran el proceso de falla del producto.

Es decir, la degradación se puede considerar como daño a un sistema, se acumula con el tiempo y eventualmente conduce a una falla del producto cuando el daño acumulado alcanza un umbral de falla, ya sea aleatorio o estipulado por los estándares industriales [66].

El mecanismo de falla del umbral de degradación proporciona un vínculo intimo entre la degradación y las fallas del producto. La distribución del tiempo de falla y los parámetros en ella se pueden determinar a través del análisis del mecanismo de degradación y los datos [66]. En la Figura 3 se muestra la falla en un cierto nivel de degradación llamado umbral de degradación.

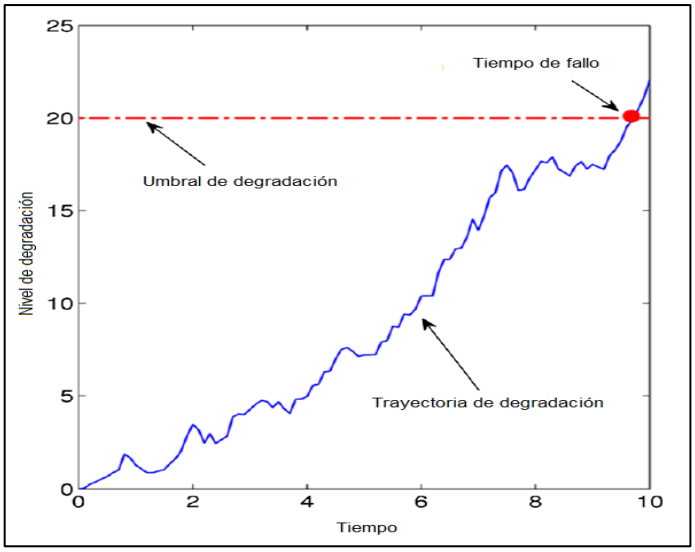


Figura 3. Umbral de Degradación de Falla

El vínculo natural entre trayectoria de degradación y el tiempo de falla motiva a evaluar la confiabilidad del producto haciendo uso de señales de degradación.

Si se encuentra un modelo de degradación adecuado a los datos de degradación generados por las señales, el modelo se puede usar para el pronóstico y la toma de decisiones posteriores.

Por otro lado, el proceso para obtener datos de degradación puede ser lento y traer dificultades en la recopilación de ellos. Por esa razón, las pruebas de degradación acelerada ADT aparecen en el análisis de confiabilidad, estas consisten en degradar la vida del producto aplicando un factor de degradación a través de un plan, el cual provoca la degradación del material propiciando señales de degradación, el principal objetivo es obtener a través de las señales, datos de degradación de forma rápida los cuales son modelados para estimar la vida útil del producto en condiciones normales de uso y a su vez minimizar los costos y tiempos involucrados en la prueba obteniendo buenos datos de vida [31].

2.2.3. Modelos de Degradación Acelerada

Un objetivo del análisis de confiabilidad es hacer estimaciones sobre la vida útil del producto a través de la distribución de vida. Para obtener la distribución de vida de un producto utilizando datos de degradación, el paso central es configurar un modelo que describa el proceso de degradación, llamado modelo de degradación acelerada. Un modelo de degradación acelerada es la combinación de un modelo acelerado y un modelo de degradación, basados en modelos de física y estadística.

a) Modelo Acelerado

Un modelo acelerado muestra la relación entre la vida y esfuerzo, existen diversos tipos de modelos, entre los más utilizados son los modelos de aceleración de voltaje, modelos de aceleración de temperatura como la relación de Arrhenius y Eyring, y modelos de aceleración como Potencia Inversa que reduce el tiempo de inactividad del producto en función de un esfuerzo de aceleración.

Suponga que el esfuerzo de aceleración V es positivo. La relación de Potencia Inversa entre la vida nominal τ de un producto y V es

$$\tau(V) = \frac{A}{V^{\gamma_1}}\,. \tag{2.10}$$

Aquí A y γ_1 son parámetros característicos del producto, método de prueba, geometría del espécimen y fabricación, etc.

Las formas equivalentes están dadas por las ecuaciones

$$\tau(V) = \left(\frac{A\prime}{V}\right)^{\gamma_1} \qquad \text{y} \qquad \tau(V) = A'' \left(\frac{V_0}{V}\right)^{\gamma_1}. \tag{2.11}$$

V_0 es un nivel estándar específico de aclaración. El parámetro γ_1 es llamado la potencia. En algunos trabajos sobre ADT [67], la Potencia Inversa suele escribirse como,

$$\tau(V) = \exp\,(-\gamma_1 \ln\,(V)). \tag{2.12}$$

Por otra parte, existen modelos menos comunes de usar para efectos de degradación, pero no por ello inexistentes como ejemplo el modelo lineal y el modelo cuadrático. Suponga que el esfuerzo de aceleración V es positivo. La relación tanto del modelo lineal como el cuadrático entre la vida nominal τ de un producto y V esta descrita respectivamente como,

$$\tau(V) = \exp\,(-\gamma_1(V)). \tag{2.13}$$

$$\tau(V) = \exp\,(-\gamma_1(V) + \gamma_2(V)^2). \tag{2.14}$$

Donde γ_1 y γ_2 son parámetros por encontrar.

b) Modelo de Degradación

Para establecer la conexión entre los datos de degradación y la vida útil del producto, es esencial establecer un modelo de probabilidad adecuado para describir el comportamiento de los datos de degradación recopilados, conocidas también como trayectorias de degradación. Hay dos tipos de modelos de degradación que se usan comúnmente, que son los modelos de trayectoria general y los modelos estocásticos.

Los modelos de trayectoria general son descritos como modelos sencillos de usar, pero carecen de la capacidad para capturar la dinámica del sistema y la aleatoriedad inherente debido a que limitan el espacio muestral del proceso de degradación, asumiendo que todas las funciones de la muestra admiten la misma forma funcional, pero con parámetros diferentes determinando el tiempo de falla.

En contraste, la dinámica estocástica es una característica común involucrada en el proceso de degradación que modela la aleatoriedad en los procesos causados por la aleatoriedad inherente y la aleatoriedad inexplicable debido al entorno de trabajo. Los modelos estocásticos tienen un gran potencial para capturar la dinámica aleatoria dentro del procesos de degradación.

En particular el proceso Wiener, el proceso Gamma y el proceso Gaussiano Inverso son tres procesos estocásticos comunes que han recibido muchas aplicaciones en el modelado de degradación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tanto el proceso Gamma como el proceso Gaussiano Inverso solo son adecuados para modelar trayectorias de degradación monótonas. En comparación, el proceso Wiener es aplicable a procesos de degradación no monótonos que se encuentran con frecuencia en la práctica ya que proporciona una descripción satisfactoria y flexible en los datos de degradación [32].

2.2.4. Proceso de Degradación Wiener

Dado que los componentes de un sistema se deterioran con el tiempo y fallan cuando el nivel de degradación alcanza cierto umbral. La información de degradación se puede medir de forma no destructiva, posteriormente se elige un modelo de degradación apropiado para describir el proceso a través del análisis de los datos. Entre los modelos de degradación, el proceso de Wiener con deriva positiva es un método bien establecido por sus propiedades matemáticas.

El proceso de degradación estocástico Wiener es explicado por Ding- Geng et al. en el libro Modelos Estadísticos para Degradación de Datos [65] en el capítulo III se define las diferentes variantes del proceso. A continuación, se destaca lo expuesto en dicho capítulo.

En casos prácticos, la trayectoria de degradación del rendimiento del producto es el resultado de la acción conjunta de factores ambientales externos. Desde el teorema del límite central medio, los incrementos $\Delta D(t) = \mathrm{D(t + \Delta t) - D(t)}$ deberían seguir aproximadamente la distribución normal. Y los incrementos de la trayectoria de degradación en el proceso Wiener sigue la distribución normal, por lo que el proceso Wiener se usa en el campo del análisis de confiabilidad.

a) Proceso Wiener con Parámetro de Deriva

Antes de la introducción del proceso Wiener con el parámetro de deriva también conocido como no lineal, primero se proporciona el proceso estándar $\{D(t), t \geq 0\}$ que es conocido como proceso Wiener o Movimiento Browniano, y se define como

- $D(0) = 0$;

- Para $\{D(t), t \geq 0\}$, los incrementos $\Delta D(t) = \mathrm{D}(\mathrm{t} + \Delta\mathrm{t}) - \mathrm{D}(\mathrm{t})$ son independientes;

- $\forall t > 0, D(t)$ sigue una distribución normal $\mathrm{N}(0, \sigma^2 t)$.

Si σ es 1, entonces $\{D(t), t \geq 0\}$ se denomina proceso Wiener estándar. El proceso Wiener variable con parámetro de deriva $\{D(t), t \geq 0\}$ es llamado proceso Wiener con parámetro de deriva λ y parámetro de volatilidad $\sigma > 0$ [65] algunos investigadores lo manejan como modelo no lineal [68], si

- $D(0) = 0$;

- Los incrementos $\Delta D(t) = \mathrm{D}(\mathrm{t} + \Delta\mathrm{t}) - \mathrm{D}(\mathrm{t})$ son independientes;

- $\forall t > 0, D(t)$ sigue una distribución normal $\mathrm{N}(\lambda\Lambda(\mathrm{t}), \sigma^2\Lambda(t))$.

Donde $\Lambda(t)$ es el tiempo de escala y es una función continua monótona que explica la no linealización de los datos, en la teoría el tiempo de escala puede hacer uso de una función exponencial $\Lambda(t) = e^{bt}$, logarítmica $\Lambda(t) = \mathrm{bln}(t)$, o en su caso de potencia $\Lambda(t) = t^b$, donde $0 < b < 1$ y es un parámetro que estimar.

Por lo tanto, sea $\mathrm{B}(\cdot)$ un movimiento Browniano estándar, de acuerdo con la definición anterior, la ruta de degradación en un proceso Wiener se expresa como

$$D(t) = \lambda\Lambda(\mathrm{t}) + \sigma\mathrm{B}\big(\Lambda(\mathrm{t})\big). \qquad (2.15)$$

Debido a que $\mathrm{D}(t)$ sigue una distribución normal $\mathrm{N}(\lambda\Lambda(\mathrm{t}), \sigma^2\Lambda(t))$, el coeficiente de variación esta dado por (2.16) y es una función de reducción del tiempo, que muestra que, con el aumento del tiempo, la ruta de degradación de D(t) se acerca gradualmente a la curva media.

$$CV\big(D(t)\big) = \frac{\sqrt{Var(D(t))}}{E(D(t))} = \frac{\sigma}{\lambda\sqrt{\Lambda(t)}}. \qquad (2.16)$$

Una propiedad importante del proceso Wiener es que los incrementos $\Delta D(t) = \mathrm{D(t + \Delta t) - D(t)}$ son independientes, y tienen una distribución normal con media $\lambda\Delta\Lambda(t) = \lambda\Lambda(t + \Delta t) - \lambda\Lambda(t)$ y una varianza $\sigma^2\Delta\Lambda(t) = \sigma^2\Lambda(t + \Delta t) - \sigma^2\Lambda(t)$. Para el modelo de parámetro de deriva, la función de densidad de probabilidad de falla (PDF) de $\Delta D(t)$ es

$$f(D(t): \Delta\Lambda(t), \lambda, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi\cdot\Delta\Lambda(t)}} \cdot exp\left\{-\frac{\big(\Delta \mathrm{D}(t) - \lambda\Delta\Lambda(t)\big)^2}{2\sigma^2\Delta\Lambda(t)}\right\}. \qquad (2.17)$$

El tiempo de falla T es definido como la primera vez que $D(t)$ cruza el valor del umbral D_f. En el proceso Wiener, el tiempo de falla T sigue una distribución Gaussiana inversa transformada, que es $\Lambda(T) \backsim IG\left(\frac{D_f}{\lambda}, \frac{D_f^2}{\sigma^2}\right)$. Por lo tanto, podemos inducir que la función de probabilidad acumulada (CDF) de $\Lambda(T)$ este dado por

$$F_{\Lambda(T)}(x) = \Phi_{nor}\left(\sqrt{\frac{D_f^2}{\sigma^2 x}}\left(\frac{\lambda x}{D_f} - 1\right)\right) + exp\left(\frac{2\mu D_f}{\sigma^2}\right) \cdot \Phi_{nor}\left(\sqrt{\frac{D_f^2}{\sigma^2 x}}\left(\frac{\lambda x}{D_f} + 1\right)\right). \qquad (2.18)$$

Y el valor esperado $E\big(\Lambda(T)\big) = \frac{D_f}{\lambda}$, $Var\big(\Lambda(T)\big) = \frac{D_f\sigma^2}{\lambda^3}$.

b) Proceso Wiener con Errores de Medición

Aunque el proceso Wiener $D(t) = \lambda\Lambda(\mathrm{t}) + \sigma\mathrm{B}\big(\Lambda(\mathrm{t})\big)$ puede expresar aleatoriedad interna del proceso de degradación, es difícil mostrar un error de medición dentro de la prueba de degradación.

La existencia de un error puede deberse a una herramienta de medición imperfecta y la aleatoriedad de los factores ambientales externos también puede

afectar los valores medidos del rendimiento del producto. El proceso Wiener con error de medición [69] se puede expresar como lo indica

$$Y(t) = D(t) + \varepsilon \tag{2.19}$$

Donde $Y(t)$ es el valor medido del rendimiento del producto en el tiempo t ; $D(t)$ representa el proceso Wiener con parámetro de deriva, formula (2.15); y ε es un error de medición que es independiente del tiempo t donde $\varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$.

c) Proceso Wiener con Efectos Aleatorios

Es común encontrar diferencias entre las trayectorias de degradación para unidades de la misma población. Es muy probable que este tipo de diferencias sea el resultado de efectos aleatorios no observables. Con base a esto, es necesario discutir el proceso Wiener con efectos aleatorios.

Cuando se aplica el proceso Wiener es común permitir que uno o más parámetros del modelo sean específicos de la unidad, estableciendo un proceso con cierta distribución paramétrica [70]. Por ejemplo, podemos asignar que el parámetro de deriva λ en el modelo $D(t) = \lambda\Lambda(\mathrm{t}) + \sigma\mathrm{B}\big(\Lambda(\mathrm{t})\big)$ sea especifico de la unidad y siga una distribución normal, mientras que el parámetro de volatilidad $\sigma > 0$ sea una constante.

El modelo Wiener con efectos aleatorios esta dado por

$$D(t) = \eta t + \sigma\mathrm{B}(t). \tag{2.20}$$

Donde el parámetro de deriva η es una variable aleatoria, que describe la diferencia de la tasa de valor individual; El parámetro de volatilidad σ es un constante para todas las unidades del producto. En particular, se puede considerar que el parámetro de deriva η sigue una distribución normal $N\big(\mu_\eta, \sigma_\eta^2\big)$.

d) Proceso Wiener con Covariables

Los factores de esfuerzo pueden afectar el proceso de degradación del rendimiento. Los factores ambientales más comunes incluyen voltaje, humedad, temperatura, vibración etc. Estos factores de esfuerzo se conocen como covariables. Cuando la covariable es medible, se puede usar un modelo de aceleración para integrar la covariable en el proceso de Wiener.

La forma más común de incorporar el modelo de aceleración al proceso Wiener es considerar algunos parámetros del modelo como una función de covariable que se denomina función de enlace. Y la elección de la forma de la función dependerá de la forma en que el factor de aceleración influya en los parámetros del modelo visto [67].

2.2.5 Inferencia Estadística del Proceso de Degradación Wiener

Dentro del proceso Wiener hay diferentes variantes como son la no linealidad, con errores de medición, con covariabilidad y con efectos aleatorios, vistas en la sección anterior. En este apartado se detalla el procedimiento para el modelo que incorpora más de una variante en el proceso Wiener.

Li Sun et al. [67] describe una metodología para el modelo y estimación de parámetros a través de un ADT de esfuerzo constante aplicando el proceso Wiener no lineal, con covariables, efectos aleatorios y errores de medición, siendo un claro ejemplo para considerar todas las variantes del proceso.

a) Proceso Wiener con Parámetro de Deriva, Covariables, Efectos Aleatorios y Errores de Medición

En la teoría hay estudios que configuran más de una variante en el proceso Wiener. A continuación, se resalta los puntos esenciales que se utiliza para la

obtención del modelo de degradación acelerada incorporando las cuatro variantes.

Primero se considera el proceso Wiener no lineal (2.21). Sea $X(t)$ el valor de degradación en el tiempo t, λ es el parámetro de deriva, σ_B es el parámetro de difusión, t indica el tiempo de medición, $\Lambda(t)$ es el tiempo transformado y $B(\Lambda(t))$ el movimiento Browniano que representa la dinámica estocástica del proceso de degradación en una escala de tiempo transformado.

$$X(t) = \lambda\Lambda(t) + \sigma_B B(\Lambda(t)). \qquad (2.21)$$

Después se describe el proceso Wiener con covariables, donde se configura la relación entre los parámetros y las variables de esfuerzo acelerado mediante la función de enlace aplicada como factor multiplicativo tanto en el parámetro de deriva y el parámetro de difusión.

Tabla 1. Funciones de Enlace para Esfuerzo Acelerado

Modelo Acelerado	Factor de Aceleración
Modelo Arrhenius	$h(s) = exp\left(-\frac{\beta}{S_k}\right)$
Potencia Inversa	$h(s) = exp(-\beta \ln(S_k))$
Modelo Lineal	$h(s) = exp(-\beta(S_k))$
Modelo Eyring	$h(s) = \frac{1}{exp\left(-\frac{\beta}{S_k}\right)}$
Modelo Cuadrático	$h(s) = exp(-\beta(S_k) + \beta_2(S_k)^2)$

Algunas funciones de enlace para relaciones de esfuerzo acelerado se muestran en la Tabla 1. Donde se asigna como ς_k como la forma abreviada de $\varsigma(S_k|\beta)$; donde S_k es el factor acelerado indicando a k como el nivel de esfuerzo y β una constante a estimar.

Por consiguiente, el modelo acelerado del parámetro de deriva λ, el parámetro de difusión σ_B y la función de enlace ς_k puede escribirse uniformemente como

$$\lambda_k = \eta\varsigma_k \quad , \quad (\sigma_B^2)_k = \kappa\varsigma_k. \tag{2.22}$$

Donde el proceso de degradación Wiener no lineal con covariables queda definido por

$$X(t) = \eta\varsigma_k\Lambda(t) + \sqrt{\kappa\varsigma_k}B(\Lambda(t)). \tag{2.23}$$

Para efectos aleatorios, se considera que la degradación observada para productos de la misma población puede ser muy diferente debido a factores no observables como son la variabilidad temporal, la variabilidad de unidad a unidad y de medición. La variabilidad temporal se conoce como las características estocásticas inherentes al movimiento browniano estándar. La variabilidad de unidad a unidad se modela generalmente como efectos aleatorios del parámetro de degradación.

Es difícil modelar los procesos acelerados si el parámetro de deriva λ y el parámetro de difusión σ_B se consideran ambos como comparadores aleatorios. Así que, como Peng y Tseng [71], Si et al. [72], [73] y Tsai et al. [74], asumen que diferentes unidades tienen diferentes parámetros de deriva mientras que todos los parámetros de difusión tienen el mismo valor bajo un cierto esfuerzo.

Entonces, tenemos $\eta \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2)$, donde μ_η y σ_η^2 son la media y la varianza del parámetro η.

$$X(t) = \eta\varsigma_k\Lambda(t) + \sqrt{\kappa\varsigma_k}B(\Lambda(t)) \quad \text{con} \quad \eta \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2). \tag{2.24}$$

Ahora bien, para obtener el proceso Wiener considerando el ADT de esfuerzo constante consideremos que: $S_1, \dots S_k, \dots S_K$ son el nivel de esfuerzo aplicado y K denota el nivel de esfuerzo máximo y el subíndice k corresponde al nivel de esfuerzo $k = 1,2, \dots K$.

Suponga también que hay N_k unidades de muestras probadas bajo un esfuerzo constante S_k y que cada muestra se mide M_{ki} veces en el k nivel de esfuerzo $i = 1,2, \dots, N_k$. La degradación en el tiempo transformado indicando nivel, muestra y tiempo estará dada por ω_{kij} donde $\omega_{kij} = \Lambda(t_{kij})$ con $j = 1,2, \dots, M_{ki}$.

Li Sun et al. [67] plantea el modelado para el ADT de esfuerzo constante considerando las variantes de no linealidad, con covariables y efectos aleatorios que es formulado como

$$X_{kij}(\omega_{kij}|S_k) = \eta_i\varsigma_k\omega_{kij} + \sqrt{\kappa\varsigma_k}B(\omega_{kij}) \quad \text{con} \quad \eta_i \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2). \tag{2.25}$$

Por último, durante el proceso de observación es inevitable no cometer errores de medición, cuando esto ocurre el modelo de degradación estará dado por

$$y_{kij}(\omega_{kij}|S_k) = X_{kij}(\omega_{kij}|S_k) + \varepsilon_{kij} \quad \text{con} \quad \varepsilon_{kij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2). \tag{2.26}$$

b) Distribución de Vida

Un objetivo del análisis de confiabilidad es hacer estimaciones sobre la vida útil del producto a través de la distribución de vida. Para obtener la distribución de vida de un producto utilizando datos de degradación, el paso central es configurar el modelo que describa el proceso de degradación, llamado modelo de degradación acelerada.

En la sección anterior se definió el modelado para el ADT de esfuerzo constante considerando las variantes de no linealidad, con covariables y efectos aleatorios que fue formulado en (2.25).

Considerando las variantes mencionadas, es decir $\sigma_\varepsilon^2 = 0$, y definiendo a w como el umbral de falla Li Sun et al. [67] presenta el PDF bajo tensión S_k dado por

$$f_{S_k}(t) = \frac{w}{\sqrt{2\pi\omega^3(\kappa\varsigma_k+\sigma_\eta^2\varsigma_k^2\omega)}}\, exp\left(-\frac{(w-\mu_\eta\varsigma_k\omega)^2}{2\omega(\kappa\varsigma_k+\sigma_\eta^2\varsigma_k^2\omega)}\right)\frac{d\omega}{dt}. \qquad (2.27)$$

Si consideramos, $\sigma_\varepsilon^2 > 0$ Junxing Li. et al [75] expresa la distribución de vida determinada por

$$f_{S_k}(t) = \frac{\sigma_\varepsilon^2\varsigma_k\mu_\eta+(\kappa\varsigma_k+\varsigma_k{}^2\sigma_\eta^2)w}{\sqrt{2\pi\left(\varsigma_k\omega(\kappa+\varsigma_k\sigma_\eta^2\omega)+\sigma_\varepsilon^2\right)^3}}\cdot\frac{d\omega}{dt}\cdot exp\left\{\frac{-(w-\varsigma_k\mu_\eta\omega)^2}{2(\varsigma_k\omega(\kappa+\varsigma_k\sigma_\eta^2\omega)+\sigma_\varepsilon^2)}\right\}. \qquad (2.28)$$

c) Estimación de Parámetros de ADT de Esfuerzo Constante

Para estimar los parámetros desconocidos, una propiedad importante del proceso Wiener es que los incrementos son independientes, y tienen una distribución normal. Por lo tanto, la degradación $y_{kij}(\omega_{kij}|S_k)$ obedece a una distribución normal con media $\lambda\omega$ y varianza $\sigma_B^2\omega$ con incrementos independientes.

La degradación observada bajo el proceso Wiener con sus cuatro variantes se muestra de la siguiente manera

$$y_{kij}(\omega_{kij}|S_k) = \eta_i\varsigma_k\omega_{kij} + \sqrt{\kappa\varsigma_k}B(\omega_{kij}) + \varepsilon_{kij} \qquad (2.29)$$

Con $\eta_i \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2)$, $\varepsilon_{kij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ y ς_k la función de enlace del modelo acelerado, generando un vector de parámetros a estimar

$$\widetilde{\Theta} = \{\mu_\eta, \sigma_\eta^2, \kappa, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2\}. \tag{2.30}$$

Ahora, considerando el ADT de esfuerzo constante, se especifica como $T_{ki} = (T_{ki1}, \dots, T_{kiM_{ki}})'$, $T_{kij} = \omega_{kij}$, $Y_{ki} = (Y_{ki1}, \dots, Y_{kiM_{ki}})'$, $Y_k = (Y_{k1}, \dots, Y_{kN_k})'$y $Y = (Y_1, \dots, Y_K)$ para $k = 1,2, \dots K$, $i = 1,2, \dots, N_k$ y $j = 1,2, \dots, M_{ki}$. De acuerdo con las propiedades y la suposición de independencia del movimiento Browniano Y_{ki} sigue una distribución normal multivariada con media y covarianza:

$$\begin{aligned} \mu_{ki} &= \mu_\eta \varsigma_k T_{ki}, \\ \Sigma_{ki} &= \sigma_\eta^2 \tilde{\Sigma}_{ki,} \end{aligned} \tag{2.31}$$

donde

$$\widetilde{\Sigma_{k\imath}} = \widetilde{\Omega}_{ki} + \varsigma_k^2 T_{ki} T_{ki}^{\mathrm{T}},$$

$$Q_{ki} = \begin{bmatrix} \omega_{ki1} & \omega_{ki1} & \cdots & \omega_{ki1} \\ \omega_{ki1} & \omega_{ki2} & \cdots & \omega_{ki2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \omega_{ki1} & \omega_{ki2} & \dots & \omega_{kiM_{ki}} \end{bmatrix} \tag{2.32}$$

$$\Omega_{ki} = \tilde{\kappa} \varsigma_k Q_{ki} + \tilde{\sigma}_\varepsilon^2 I_{ki}$$

I_{ki} es la matriz identidad de orden M_{ki} y $\widetilde{k} = \frac{k}{\sigma_\eta^2}$, $\tilde{\sigma}_\epsilon^2 = \frac{\sigma_\epsilon^2}{\sigma_\eta^2}$ son una reparametrización para facilitar la inferencia. La función log-verosimilitud de parámetros desconocidos $\widetilde{\Theta} = \{\mu_\eta, \sigma_\eta^2, \tilde{\kappa}, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2\}$ se expresa

$$\ln L\left(\widetilde{\Theta}\middle|Y\right) = -\frac{1}{2}\ln(2\pi)\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} M_{ik} \tag{2.33}$$

$$-\frac{1}{2}\ln\left(\sigma_\eta^2\right)\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} M_{ki} - \frac{1}{2}\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k}\left|\tilde{\Sigma}_{ki}\right|$$

$$-\frac{1}{2\sigma_\eta^2}\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k}\left(y_{ki} - \mu_\eta \varsigma_k T_{ki}\right)'\tilde{\Sigma}_{ki}^{-1}\left(y_{ki} - \mu_\eta \varsigma_k T_{ki}\right)$$

Dado valores específicos de $(\tilde{\kappa}, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2)$, se realiza la derivación de (2.33) $\frac{\partial lnL(\Theta|Y)}{\partial \mu_\eta}$, $\frac{\partial lnL(\Theta|Y)}{\partial \sigma_\eta^2}$ con respecto a los parámetros μ_η, σ_η^2 y estas derivadas se igualan a cero correspondiendo al MLE, obteniendo

$$\hat{\mu}_\eta = \frac{\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} \varsigma_k T_{ki}' \tilde{\Sigma}_{ki}^{-1} y_{ki}}{\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} \varsigma_k^2 T_{ki}' \tilde{\Sigma}_{ki}^{-1} T_{ki}} \tag{2.34}$$

$$\hat{\sigma}_\eta^2 = \frac{1}{\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} M_{ki}} \cdot \sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} \left(y_{ki} - \hat{\mu}_\eta \varsigma_k T_{ki}\right)' \tilde{\Sigma}_{ki}^{-1} \left(y_{ki} - \hat{\mu}_\eta \varsigma_k T_{ki}\right) \tag{2.35}$$

Sustituyendo (2.34) y (2.35) en (2.33) y simplificando en la función de log-verosimilitud, obtenemos

$$\begin{aligned} ln\, L(\Theta|Y) = & -\frac{1}{2}(\ln(2\pi) + 1) \sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} M_{ik} \\ & -\frac{1}{2} ln\left(\hat{\sigma}_\eta^2\right) \sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} M_{ki} - \frac{1}{2}\sum_{k=1}^{K}\sum_{i=1}^{N_k} \left|\tilde{\Sigma}_{ki}\right| \end{aligned} \tag{2.36}$$

La estimación por máxima verosimilitud de $\tilde{k}, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2$ se puede obtener maximizando la función de log-verosimilitud (2.36), mediante una búsqueda tridimensional, empleando el método de optimización de cuasi Newton L-BFGS-B que se puede encontrar en los paquetes del lenguaje R [76]. Luego se sustituye en (2.34) y (2.35); y podemos obtener la estimación por máxima verosimilitud para μ_η, σ_η^2. El valor de $\hat{\kappa}, \hat{\sigma}_\varepsilon^2$ se puede obtener mediante las siguientes ecuaciones:

$$\hat{\kappa} = \hat{\tilde{\kappa}} \cdot \hat{\sigma}_\eta^2 \,, \tag{2.37}$$

$$\hat{\sigma}_\varepsilon^2 = \hat{\tilde{\sigma}}_\varepsilon^2 \cdot \hat{\sigma}_\eta^2 \tag{2.38}$$

d) Criterio AIC para Selección del Modelo

La selección del mejor modelo, entre una clase de modelos en competencia es elegir el modelo que mejor se ajusta a los datos de una observación particular, es decir, con la máxima bondad de ajuste. En datos de degradación, los criterios considerados para la selección del modelo deben tener en cuenta las características estocásticas de la variabilidad del proceso de degradación incluyendo la capacidad de predecir el comportamiento de degradación futuro.

El criterio de información de Akaike (AIC) es utilizado para la selección del modelo con pronóstico de degradación [77]. AIC se basa en la teoría de la información y maneja un compromiso entre la bondad de ajuste y la complejidad del modelo. Su objetivo radica en seleccionar el modelo con la distribución más cercana a la distribución verdadera y que tenga el menor número de parámetros desalentando el sobreajuste. Considerando el conjunto de datos, el AIC está determinado por:

$$AIC = 2k - 2\ln(L) \qquad (2.39)$$

Donde k es el número de parámetros del modelo y es L el logaritmo de la máxima verosimilitud del modelo estimado. Teniendo en cuenta este criterio y un conjunto de modelos candidatos, el modelo seleccionado será el que tenga un AIC mínimo.

e) Intervalo de Confianza Bootstraping

La validación del modelo es el paso posterior a la estimación de los parámetros requeridos del modelo seleccionado. La validación se realiza a través de criterios estadísticos, dichos criterios atienden a la construcción de intervalos de confianza (IC), donde el principal objetivo es validar las predicciones obtenidas en el modelo.

El Bootstrap es una técnica de remuestreo de datos que permite resolver problemas relacionados con la estimación de intervalos de confianza. La denominación de remuestreo se debe a que la metodología que aplica se basa

esencialmente en la extracción de un gran número de muestras repetidas de los propios datos, y sobre esta base se realizan inferencias estadísticas [78]. Este enfoque requiere de un ordenador capaz de simular un proceso de remuestreo aleatorio de los datos.

El Bootstrap puede ser aplicado para estimar IC y para diagnosticar modelos o evaluar la replicabilidad de los resultados de un estudio. Su descripción consiste en: crear un gran número de submuestras con reposición de los mismo datos y calcular para cada muestra resultante el valor del estadístico en cuestión, con ello se obtienen una aproximación a la distribución de muestreo del estadístico, a partir de la cual podemos construir un IC para dicho estadístico [79].

f) Criterio de Cramér-von Mises

El criterio de Cramér-von Mises es utilizado es estadística para juzgar la bondad de ajuste de una función de distribución acumulada F comparada con una función de distribución empírica F_n, utilizando la estimación de distancia mínima [80]. Se define como,

$$W^2 = \int_{-\infty}^{\infty} [F_n(x) - F]^2 dF(x) \qquad (2.40)$$

La prueba de bondad de ajuste se basa en la suposición de que la hipótesis nula es verdadera bajo la comparación de los resultados muestrales observados con los resultados esperados. Para ello, sean $x_1, x_2, \dots, x_n$ los valores observados, en orden creciente. Entonces el estadístico es,

$$T = \frac{1}{12n} + \sum_{i=1}^{n} \left[\frac{2i-1}{2n} - F(x_i) \right]^2 \qquad (2.41)$$

Si este valor es mayor que el valor tabulado, se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de la distribución F [81].

2.2.6. Planes de Prueba de Degradación Acelerada

Un plan de prueba es diseñado antes de realizar un ADT y requiere determinar el tipo de esfuerzo, los niveles de esfuerzo, el número de unidades a ser probadas, los tiempos de medición y un modelo aplicable que relacione los tiempos de falla a condiciones aceleradas a aquellos a condiciones normales [68].

Un plan de prueba puede proveer información precisa sobre la vida útil del producto y lograr ahorros en tiempo y costos de las pruebas. Los ahorros se logran analizando los datos antes de que todas las unidades hallan fallado [65].

Hay tres tipos de pruebas ADT en la práctica, los cuales son: ADT de esfuerzo por pasos, ADT de esfuerzo progresivo y ADT de esfuerzo constante.

El ADT de esfuerzo por pasos es un plan de prueba económico y flexible. El esfuerzo aumenta en pasos bajo un ADT de esfuerzo escalonado. Como resultado, el ADT de esfuerzo por pasos no requiere un gran tamaño de muestra y puede evitar choques de esfuerzo que conducen a una falla repentina del producto.

El ADT de esfuerzo progresivo es similar al ADT de esfuerzo por pasos, excepto que el esfuerzo de la prueba aumenta con el tiempo a una velocidad constante. Sin embargo, aumentar el esfuerzo a un ritmo específico es difícil. Por lo tanto, hay muchos problemas en la aplicación de ADT de esfuerzo progresivo.

Por su parte, en el ADT de esfuerzo constante, se dividen en varios niveles de esfuerzo, y cada nivel requiere varias muestras. Para nuevos productos en desarrollo, no es una tarea fácil determinar los niveles de esfuerzo adecuados. Por lo tanto, realizar un ADT de esfuerzo constante puede requerir de varias muestras.

Para materiales de reciente creación estudios actuales han adoptado un ADT de esfuerzo constante en la evaluación de la confiabilidad basado en proceso Wiener aplicando planes compromiso que se encuentran dentro del esfuerzo constante, estos constan de tres a cuatro niveles de pruebas con diferentes proporciones de unidades en cada uno, donde principalmente en el nivel de esfuerzo bajo corren más muestras que a un nivel alto y este tipo de plan puede proveer estimaciones precisas [12].

Los pasos para el diseño de planes de prueba compromiso son:

- Determinar los parámetros del modelo mediante las probabilidades de falla en los niveles de esfuerzo.
- Definir el nivel de esfuerzo alto, mediano y bajo.
- Determinar la proporción de unidades a colocar en cada nivel de esfuerzo. Algunos diseños utilizan un arreglo $4:2:1$, es decir, una proporción de unidades de $4/7$, $2/7$ y $1/7$, en los niveles de esfuerzo bajo, medio y alto respectivamente si se trata de un estudio de tres niveles.
- Obtener el diseño del plan de prueba con los valores que minimizan la varianza aproximada del cuantil de interés.

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se discuten los recursos que fueron aplicados en la realización de este proyecto de investigación, en primer término, se presentan los materiales, los que anteceden a los métodos**.**

3.1. Materiales

Las GNP@LA se sintetizaron utilizando: solución de cloruro de oro al 1%, polvo de borohidruro de sodio ≥98%, ácido (±) -α-lipoico titulación mínima del 99%, alcohol etílico 96% y agua ultrapura> 18 MΩ-cm. Para promover la aglomeración se utilizaron cloruro de sodio (NaCl) 99.8% y PBS 1.X. Para la prueba de citotoxicidad los materiales utilizados fueron: hematoxilina, eosina 99%, PBS 1.X, glutaraldehído Grado II 25% en H2O y dimetilsulfóxido DMSO ≥ 99.9%. Para la prueba ADT se utilizó NaCl 99.8% y la fabricación de 50 muestras de GNPs@LA en solución coloidal.

En cuanto a equipo se utilizaron el agitador de laboratorio PC 410 (Corning®), balanza analítica (Ohaus®), sistema de purificación de agua (WaterPro PS, Labconco®), evaporador rotativo con bomba de vacío y controlador (Buchi R-3 Rotavapor), espectrofotómetro UV / Vis 190-1100 nm ± 1 nm (Grupo Zhejiang Holdwell), espectrómetro infrarrojo (M 530, Buck Scientific), espectrómetro Raman (HoribaJobin HR 800), microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-ARM200F), microscopio de fluorescencia 100x (Zeiss N-Achroplan) y espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus). Por último, los softwares aplicados tanto para la caracterización como para el ADT fueron: MetaSpecPro, Zen blue, OriginPro 2017 y R.

3.2. Métodos

Esta sección expone los métodos, la forma en lo que los recursos fueron aplicados, iniciando en la caracterización y finalizando en el análisis de confiabilidad.

3.2.1. Caracterización de GNPs@LA

La caracterización de GNPs@LA se realiza a través de un proceso de varias etapas, siendo las siguientes:

- Etapa 1. Preparación de nanopartículas de oro desnudas y nanopartículas de oro estabilizadas con ácido lipoico.
- Etapa 2. Analizar la estabilidad, morfología y composición de las muestras fabricadas.
- Etapa 3. Ensayo de citotoxicidad en diversas concentraciones.

En lo que corresponde a la etapa 1, con base en la metodología "de abajo hacia arriba" y específicamente en el método coloidal reportada en Cornejo et al. [82], se sintetizaron y estabilizaron nanopartículas de oro con un tamaño menor de 5 nm usando cloruro de oro como precursor, borohidruro de sodio como reductor y ácido lipoico como estabilizador. Para preparar 700 ml de solución coloidal acuosa, se añadieron 6,3 ml de solución de cloruro de oro a un matraz Erlenmeyer bajo agitación vigorosa; una vez que se mezcló la solución, se añadieron 85 mg de borohidruro de sodio mezclado con 7 ml de agua. Hasta este paso, se sintetizaron nanopartículas de oro desnudas (GNPs). Aproximadamente, 30 segundos después de la adición de borohidruro de sodio, se añadieron al coloide 100 mg de ácido lipoico (LA) mezclado en una solución de 7 ml de etanol-agua (1:1 v/v) para obtener nanopartículas de oro estabilizadas con ácido lipoico (GNPs@LA).

En la etapa 2, para probar la estabilidad de las nanopartículas de oro desnudas y estabilizadas, se utilizaron tres promotores de aglomeración diferentes: NaCl, PBS y evaporación del agua. Se añadió NaCl al coloide a una concentración de 10% m/v, PBS a 50% v/v y el agua del coloide se eliminó para obtener polvo. Para la morfología y composición muestras de GNPs@LA fueron analizadas mediante TEM y FT-IR respectivamente. Asimismo, para la caracterización de Raman algunas muestras fueron enviadas al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. para ser analizadas.

En la etapa 3 se determinó la citotoxicidad de los GNP@LA mediante el método de prueba establecido en la norma ISO 10993 así que para el análisis en la reducción metabólica de los fibroblastos al reactivo MTT los pasos esenciales fueron colocar diversas concentraciones en una placa así como un control con los cuales se sembraron e incubaron con soluciones y células de fibroblastos de ratón, el producto de formazán resultante se analizó y por último se utilizó la tinción para el examen morfológico. A continuación, se explica con más detalle el proceso realizado.

Para realizar esta prueba, se colocaron concentraciones de: 20, 40, 60, 80, 100, 250, 500, 750, 1000 (µg / mL) de GNPs@LA en una placa de 24 pocillos, así como un control, donde se sembraron e incubaron con 20,000 células de fibroblastos de ratón en D-MEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) y penicilina-estreptomicina. Después de 24 horas, se retiró el medio de incubación y se añadieron 200 µl de solución D-MEM, que contenía 10% de FBS, 1% de antibiótico y 50 µl de MTT (5 mg / ml en PBS). Luego, se incubó a 37°C durante 2 horas. El producto de formazán resultante se disolvió en dimetil sulfóxido y se midió la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro de microplacas Benchmark Plus. Las GNPs@LA cultivados con fibroblastos se tiñeron con hematoxilina y eosina para el examen de la morfología celular.

Con lo anterior, esta investigación confirmara que el LA no solo actúa como agente de protección si no que nos aporta características que pueden ser útiles en el ámbito médico, también se presentara el estudio de citotoxicidad para tener conocimiento de las concentraciones no toxicas a nivel celular abriendo puertas a futuros estudios clínicos.

3.2.2. Análisis de Confiabilidad

El análisis de confiabilidad tuvo como objetivo, obtener el modelo de degradación acelerada que estimara la proporción de falla en función del factor acelerante con el cual se estimó la vida útil de GNPs@LA, para ello se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- Etapa 1. Fabricación de varias muestras de GNPs@LA.
- Etapa 2. Determinar el factor de aceleración y ejercer diferentes niveles de esfuerzo en función de él, dentro de las muestras fabricadas.
- Etapa 3. Establecer un plan de prueba ADT de estrés constante.
- Etapa 4. Caracterización de datos de degradación.
- Etapa 5. Ajuste de datos de degradación a un modelo de degradación acelerada basado en el proceso estocástico Wiener no lineal, con efectos aleatorios, medidas de error y con distintos modelos acelerados en la covariabilidad.
- Etapa 6. Estimación de parámetros de los modelos de degradación acelerada propuestos.
- Etapa 7. Evaluación y validación de los modelos.
- Etapa 8. Selección del modelo y estimación de vida útil de GNPs@LA.

Para realizar la degradación primero se tuvieron que fabricar alrededor de 50 muestras coloidales de GNPs@LA quedando definidas como la población total para el estudio de confiabilidad. Se consideró como factor de aceleración el NaCl presentando una degradación a través de tiempo. Dicha degradación se vio

reflejada en la agregación de nanopartículas con las cuales se llegó a la aglomeración de alguna de ellas.

Los niveles de prueba de esfuerzos fueron basados en un estudio exploratorio previamente hecho. Considerando 1gr equivalente a 1ml de nuestras síntesis fabricadas y un plan ADT de esfuerzo constante, quedaron planteados dos planes piloto de prueba tipo compromiso, plan A y plan B. El plan A utilizo tres diferentes niveles de esfuerzo para tres poblaciones distintas, la población 1 fue de 23 muestras para el 12% NaCl, 15 muestras para el 16% de NaCl y 12 muestras para el 20% de NaCl. Plan B utilizo la misma proporción de muestras, pero en tres diferentes niveles de esfuerzo siendo estos, el 8%, 12% y 16% m/v con NaCl para cada población de síntesis. Las mediciones se llevaron a cabo cada tercer día generando un numero de mediciones que muestran señales de degradación para el nivel bajo, medio y alto respectivamente.

Para la obtención de datos de degradación de GNPs@LA bajo un ADT se utilizaron las señales de degradación obtenidas a través de las mediciones con las cuales se condujo a un análisis de estabilidad, considerando como degradación la agregación del material que, en base a su absorbancia, longitud de onda y consistencia del material se puede determinar por sus propiedades caracterizadas en un dominio cerrado de 450 a 550 nm en la longitud de onda a través de la espectroscopia UV-Vis, utilizando un análisis con el programa MetaSpecPro.

Asimismo, utilizando el análisis del programa, se puede definir el umbral de falla con la ubicación del pico máximo característico del oro considerando que este tiene influencia en el análisis de tamaño y estabilidad del material. Por lo tanto, para este estudio se consideró como falla la aglomeración de las nanopartículas a través del desface del pico en la zona de plasmón después de 525 unidades.

Por ultimo, este trabajo propone estimar la proporción de falla de GNPs@LA aplicando un ADT de esfuerzo constante el cual fue elaborado a través de estudios exploratorios y con ello se obtuvieron señales de degradación. Por lo tanto, se puede definir lo siguiente:

- ✓ Los niveles del porcentaje de NaCl como $k = 1, \dots, K$,
- ✓ Las muestras como $i = 1, \dots, N_k$ y
- ✓ Los tiempos de medición $j = 1, \dots, M_{ki}$.

Una vez definidas las señales de degradación como datos de degradación, se procede a obtener la configuración del modelo de degradación acelerada que describa las trayectorias de degradación. Por lo tanto, este trabajo propone el Proceso Wiener con parámetro de deriva, efectos aleatorios, errores de medición y diferentes funciones de enlace en la covariabilidad. Como resultado, el modelo propuesto asume:

- ✓ El parámetro de deriva donde los tiempos transformados explican la no linealidad de los datos y está dada por $\omega_{kij} = \Lambda(t_{kij}) = (t_{kij})^b$.
- ✓ Efectos aleatorios, asumiendo que diferentes unidades tienen diferentes parámetros de deriva mientras que todos los parámetros de difusión tienen el mismo valor bajo un cierto esfuerzo. Entonces, tenemos $\eta_i \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2)$.
- ✓ Errores de medición con $\varepsilon_{kij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$.
- ✓ Con covariabilidad donde el modelo acelerado se encuentra inmerso en el Proceso a través de la función de enlace ς_k. Asimismo, se resalta que fueron evaluados tres modelos acelerados, potencia inversa, modelo lineal y el modelo cuadrático.

Por lo tanto, suponiendo que la degradación sigue una distribución normal con $\lambda\omega$ y varianza $\sigma_B^2\omega$ y aplicando los modelos acelerados, la deriva y la difusión estarán dadas por

$$\lambda_k = \eta\varsigma_k \quad , \quad (\sigma_B^2)_k = \kappa\varsigma_k$$

Donde ς_k es analizada por Potencia Inversa $\varsigma_k = exp(-\beta \ln(S_k))$, un Modelo Lineal $\varsigma_k = exp(-\beta(S_k))$ y un Modelo Cuadrático $\varsigma_k = exp\left(-\beta(S_k) + \beta_2(S_k)^2\right)$. Ahora, proponiendo el ADT de esfuerzo constante y el proceso Wiener con las características mencionadas, el proceso de degradación puede formularse en general como la formula (2.29) con $\eta_i \sim N\left(\mu_\eta, \sigma_\eta^2\right)$ y $\varepsilon_{kij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$. Generando tres distintos modelos a evaluar los cuales son presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Modelos con Distinta Función de Enlace

Covariabilidad Asumiendo Potencia Inversa
$M1 = \ y_{kij}(\omega_{kij}\|S_k) = \eta_i \varsigma_k \omega_{kij} + \sqrt{\kappa \varsigma_k} B(\omega_{kij}) + \varepsilon_{kij}$ donde $\varsigma_k = exp(-\beta \ln(S_k))$
Covariabilidad Asumiendo Modelo Lineal
$M2 = \ y_{kij}(\omega_{kij}\|S_k) = \eta_i \varsigma_k \omega_{kij} + \sqrt{\kappa \varsigma_k} B(\omega_{kij}) + \varepsilon_{kij}$ donde $\varsigma_k = exp(-\beta(S_k))$
Covariabilidad Asumiendo Modelo cuadrático
$M3 = \ y_{kij}(\omega_{kij}\|S_k) = \eta_i \varsigma_k \omega_{kij} + \sqrt{\kappa \varsigma_k} B(\omega_{kij}) + \varepsilon_{kij}$ donde $\varsigma_k = exp(-\beta_1(S_k) + \beta_2(S_k)^2)$

Originando con ello un vector de parámetros a estimar $\widetilde{\Theta} = \left\{\mu_\eta, \sigma_\eta^2, \kappa, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2\right\}$ en cada uno de los modelos, siendo estos:

μ_η, σ_η^2: la media y la varianza del parámetro aleatorio η_i.

$\tilde{\sigma}_\varepsilon^2$: es la varianza no atribuible al Movimiento Browniano ni a la deriva, correspondiendo a los errores de medición.

β: es un factor que determina la influencia del porcentaje de NaCl. Para el caso del modelo cuadrático $M3$ se encuentra también el parámetro $\beta = \{\beta_1, \beta_2\}$ por estimar.

κ: es la constante asociada a la volatilidad o difusión del movimiento estocástico.

Todo lo anterior fue programado en el software estadístico R siguiendo lo propuesto por Li Sun et al. [67] donde se aplicó la estimación por máxima verosimilitud para la obtención de parámetros. En la Figura No. 4 se muestra la metodología propuesta para la estimación de parámetros a través de MLE, así como la evaluación y validación de cada modelo hasta obtener la proporción de falla en cada uno de ellos.

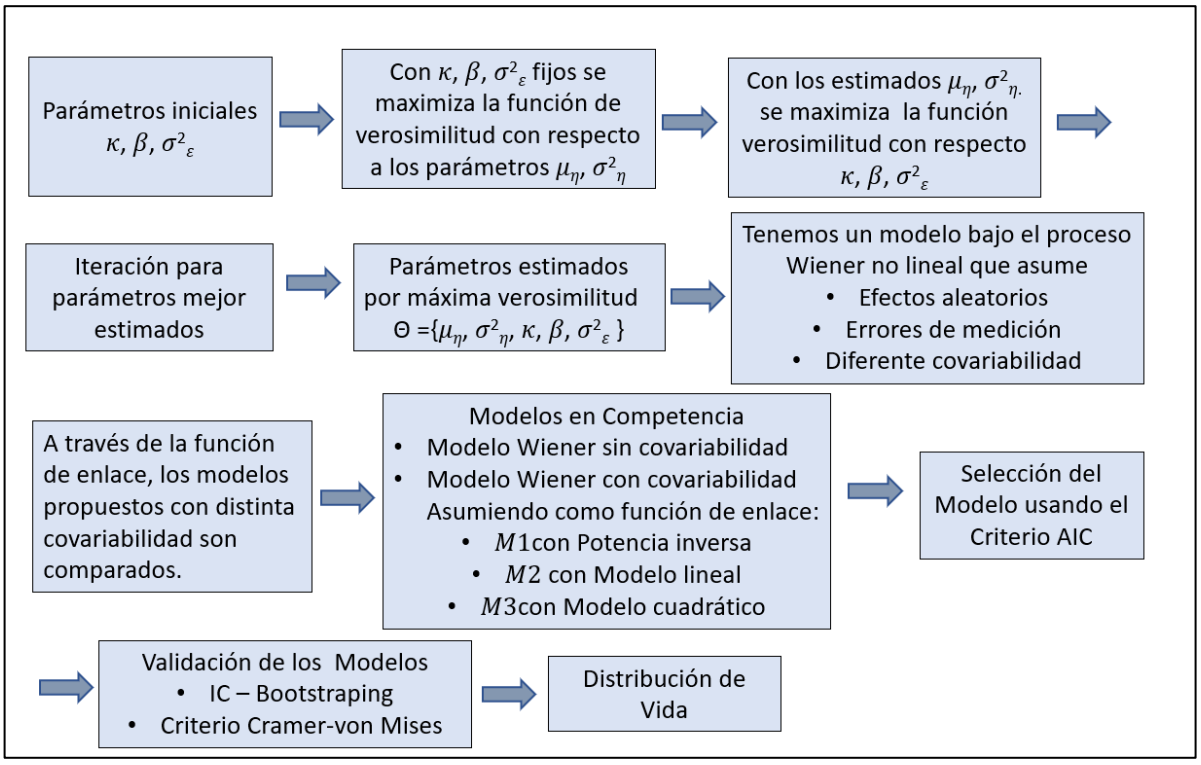


Figura 4. Metodología para la Estimación de Parámetros del Modelo Propuesto, así como su Evaluación y Validación para la Estimación de Vida Útil.

Como se aprecia en la Figura 4, se obtiene un modelo bajo el proceso Wiener no lineal con efectos aleatorios, errores de medición y distintos modelos acelerados en la covariabilidad. Para la selección, evaluación y validación de los modelos propuestos, se determinará cual es el modelo con la distribución más cercana a la distribución verdadera utilizando el criterio AIC. Asimismo, para la evaluación y validación se hará uso de los parámetros estimados del modelo y se calculará la distribución Bootstraping con la construcción de intervalos de confianza, también se juzgará la bondad de ajuste utilizando el criterio Cramer-von Mises para la selección del modelo.

Por último, considerando los parámetros se establece a w como el umbral de falla y la distribución de vida estará determinada por la fórmula (2.28). Con ello se obtiene la proporción de falla en función del factor acelerante y se estima la vida útil de GNPs@LA.

Con lo anterior, esta investigación propone una metodología y un modelo de análisis para estimar la tasa de falla y vida útil de GNPs@LA basado en pruebas de degradación acelerada y proceso de Wiener no lineal incorporando efectos aleatorios, medidas de error y covariabilidad. El esquema propuesto emplea tres funciones de enlace diferentes en covariabilidad utilizando los modelos de potencia inversa, lineal y cuadrática los cuales serán juzgados y se proporcionara el modelo más adecuado que permita determinar la vida útil del material.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se da a conocer los resultados obtenidos tanto del desarrollo conceptual de GNPs@LA para obtener sus características, así como la metodología de prueba y análisis ADT para obtener su vida útil, en cada apartado se interpreta y analizan los resultados de este trabajo. Cabe destacar que dichos resultados de caracterización se publicaron inicialmente en Cornejo et al. [82], en marzo del 2020 en la revista Nanobiomedicine and Nanopharmaceuticals.

4.1. Caracterización de GNPs@LA

Para poder obtener el desarrollo conceptual, se fabricaron GNPs@LA basados en la metodología de “abajo hacia arriba”, reportada en Cornejo et al. [82] y Cornejo et al. [43], a su vez para determinar su caracterización se utilizaron espectroscopía UV-Vis, FT-IR, Raman, TEM y un evaporador rotativo para analizar su estabilidad, composición y morfología. Conjuntamente, la citotoxicidad de las nanopartículas de oro se evaluó mediante el ensayo MTT. A continuación, se presentan los resultados.

4.1.1. Estabilidad

En este apartado se presentan los resultados de las pruebas de estabilidad con y sin promotores de aglomeración. Para ello se hace una comparativa a través de las fotografías de las soluciones coloidales, los espectros de UV-Vis, así como los resultados de la redispersión de las GNPs@LA.

a) Soluciones Coloidales

Como se puede ver en la Figura 5, las GNPs muestran un color rojo anaranjado característico, en contraste, los GNPs@LA tienen un color magenta. Con el fin de analizar su estabilidad, se usaron los promotores de aglomeración con los cuales se pudo observar que las GNPs se desestabilizan rápidamente con la adición de NaCl, PBS o ambos, siendo apreciable debido al cambio de color de rojo-naranja

a azul-gris en comparación con las GNPs@LA donde se puede ver que no hay cambios significativos en el color de los coloides. Es decir, las nanopartículas de oro estabilizadas con LA son más resistentes a la aglomeración, demostrando su alta estabilidad en la consistencia firme del coloide.

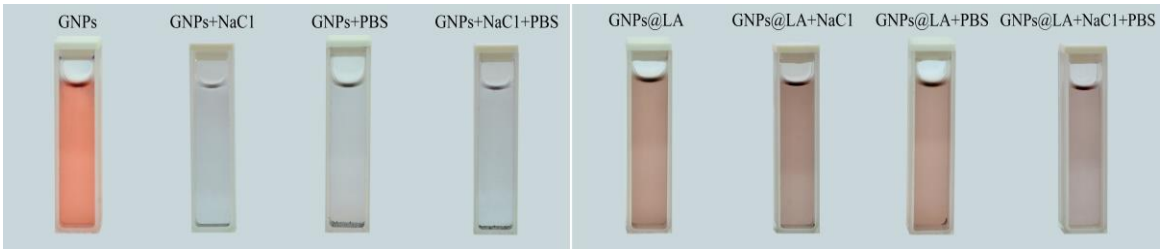


Figura 5. Fotografía de las Soluciones Coloidales

b) Espectroscopia UV-Vis

En los resultados de la espectroscopia UV-Vis se puede apreciar en la Figura 6a que las GNPs muestran un pico característico en la banda del plasmón superficial alrededor de 496 nm. Usando el modelo propuesto por W. Haiss et al. [47], [83], el tamaño de partícula estimado de los espectros UV-Vis es inferior a 3 nm. Después de la adición de LA, en la Figura 6b las GNPs@LA tienen un pico característico alrededor de 498 nm moviéndose a longitudes de onda más alta, lo que indica que el ácido lipoico fue absorbido en la superficie de las nanopartículas de oro y el tamaño sigue siendo menor a los 3 nm.

Para analizar la estabilidad de los coloides, se usó NaCl y PBS para promover la aglomeración; comparando los espectros de GNPs+NaCl, GNPs+PBS, GNPs+NaCl+PBS frente al espectro de GNPs hay una diferencia muy significativa, NaCl y PBS desestabilizan casi instantáneamente las nanopartículas de oro desnudas, En comparación con las GNPs@LA con GNPs@LA+NaCl, GNPs@LA+ PBS y GNPs@LA+NaCl + PBS, no hay diferencia entre los espectros lo que indica que LA estabiliza las nanopartículas de oro y evita la aglomeración.

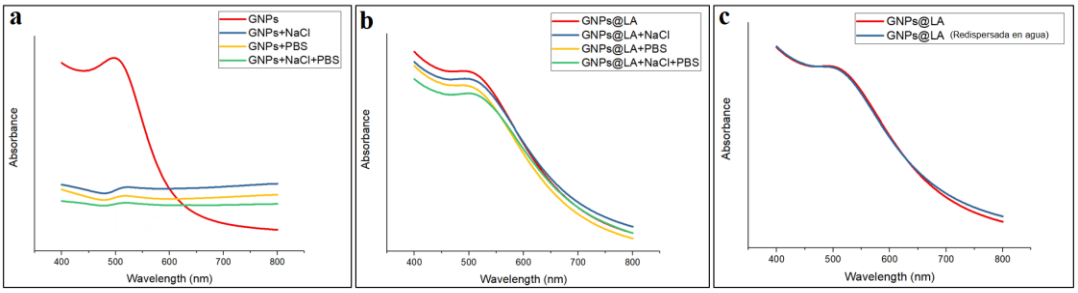


Figura 6. Espectros UV-Vis de Nanopartículas de Oro Coloidales, a) GNPs y GNPs con Promotores de Aglomeración, b) GNPs@LA y GNPs@LA con Promotores de Aglomeración, y c) GNPs@LA versus GNPs@LA Redispersados en Agua Después del Secado

Además, como podemos ver en los resultados del UV-Vis, en la Figura 6c el pico característico del oro permanece en la misma posición, mostrando que el polvo de GNPs@LA se puede redispersar fácilmente en agua sin un efecto relevante sobre las propiedades de las nanopartículas.

c) Polvo de GNPs@LA

El polvo de GNPs@LA y GNPs@LA+NaCl se obtuvo usando el evaporador rotativo. Los polvos mostraron un color marrón oscuro, como se aprecia en la Figura 7.

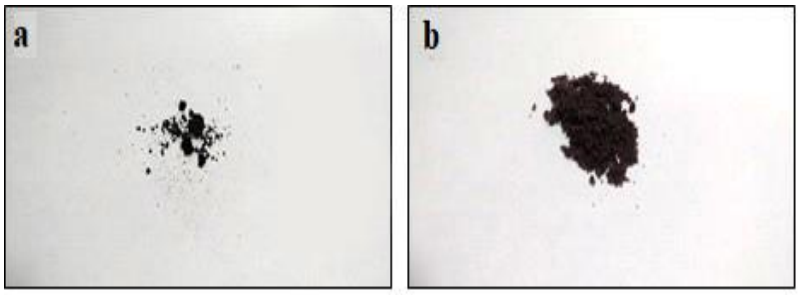


Figura 7. Fotografías de a) GNPs@LA y b) GNPs@LA+NaCl Ambas en Polvo

El polvo de GNPs@LA era como una pasta pegajosa y más oscura, como se puede apreciar en la Figura 7a. En contraste, en la Figura 7b el polvo de GNPs@LA+NaCl era más fácil de manejar.

Ambos polvos se redispersaron en agua sin ningún esfuerzo y sin efecto perceptivo sobre sus propiedades, mostrando nuevamente la alta estabilidad de GNPs@LA.

4.1.2. Morfología y Tamaño

Para el análisis de morfología y tamaño de GNPs@LA, en la Figura 8, se puede visualizar los resultados de las micrografías usando TEM, con el cual se pudo determinar que tenemos nanopartículas de oro ultrapequeñas y con forma esféricas. Asimismo, se puede apreciar claramente que las GNPs@LA son dispersas, no aglomeradas, y con un tamaño promedio de 2.5±1.10nm. Estos tamaños corresponden con las dimensiones obtenidas en la espectroscopia UV-Vis.

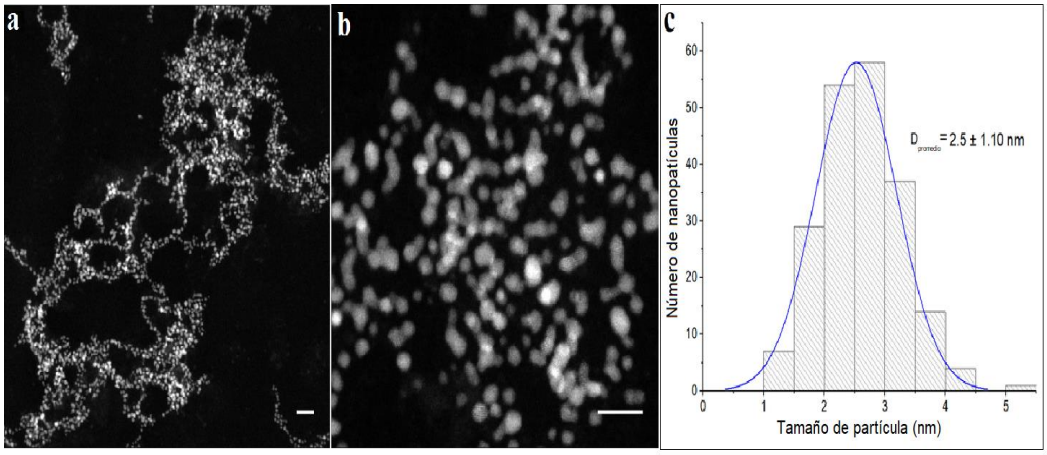


Figura 8. Micrografías TEM de GNPs@LA a Diferentes Aumentos. Barras de Escala a) 20 nm b) 10 nm, y c) Histograma de Distribución de Tamaños.

4.1.3. Composición – Grupos Funcionales

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el FT-IR, así como los que se realizaron en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. en el análisis por Raman.

a) Espectroscopia FT–IR

El espectro FTIR de GNPs@LA con GNPs@LA+NaCl fueron comparados y se muestra en la Figura 9. En la comparación se encontró que las principales bandas de absorción están presentes en ambas muestras, lo que es indicativo de la alta estabilidad de GNPs@LA. El espectro FTIR muestra seis bandas principales de absorción en 3430, 2928, 1571, 1357,1115 y 1050 cm^{-1}.

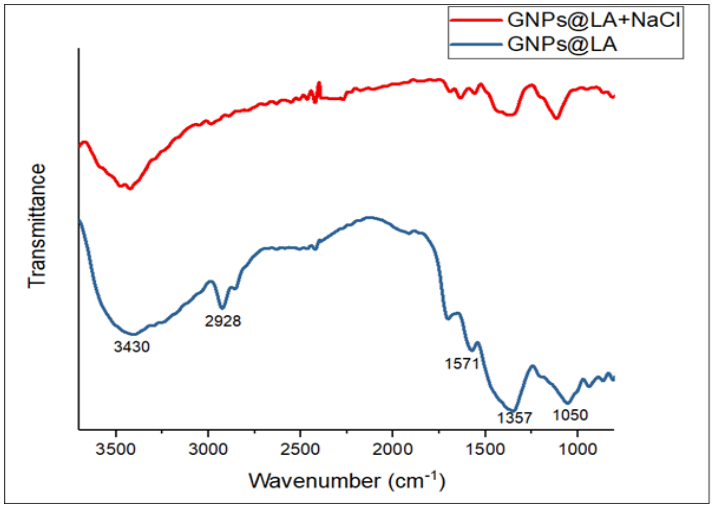


Figura 9. Espectros FTIR de GNPs@LA vs GNPs@LA+NaCl

Las bandas presentes en 3430 y aproximadamente 2928 cm^{-1}, se pueden atribuir a la presencia de agua en la superficie de nanopartículas y enlaces C-H presentes en hidrocarburos de cadena larga, respectivamente [53], [84]. El pico que aparece a 1571 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo [85]. El pico correspondiente al grupo funcional COOH se percibió a 1357 cm^{-1} [53]. Los picos observados a 1115 y 1050 cm^{-1} no fueron identificados.

b) Espectroscopia Raman

Las GNPs@LA se analizaron usando dispersión Raman a 532 nm, para identificar las vibraciones reales.

La Figura No.10 muestra dos bandas Raman fundamentales asimétricas alrededor de 400 y 100 cm^{-1}.

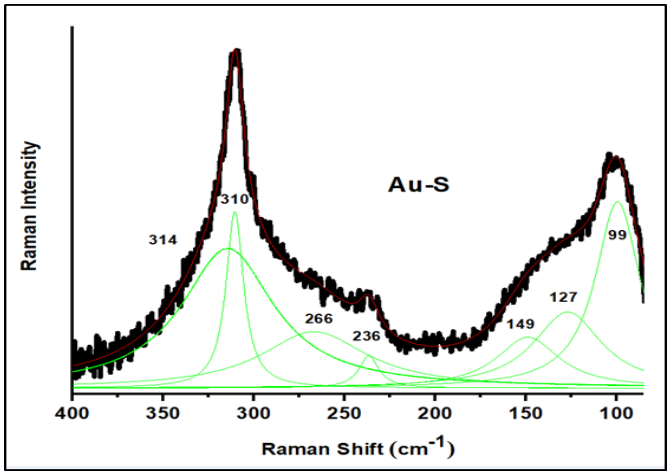


Figura 10. Espectros RAMAN de GNPs@LA

Dichas bandas se pueden desconvolucionar en siete señales de forma de línea de Lorentz, como se muestra en la Figura 5, que se observan en 314, 310, 266, 236, 149, 127 y 99 cm^{-1}, principalmente asociado con los modos de estiramiento y respiración Au-S debido a la naturaleza diferente de los enlaces Au-S involucrados. Los modos Au-S han sido asignados tanto experimental como teóricamente por Varnholt et al.[86].

4.1.4. Ensayo de Citotoxicidad

El efecto de GNPs@LA sobre la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. A través de la actividad mitocondrial se puede observar en la Figura 11 que las concentraciones inferiores a 100 (µg / ml) no presentan efectos tóxicos a nivel celular, lo que nos permite verificar que no hubo afectaciones del metabolismo celular después de la exposición a las nanopartículas.

Por otro lado, a concentraciones más altas de GNP@LA hay una reducción en el número de células viables que muestran un daño en la actividad mitocondrial, presentando un efecto tóxico de acuerdo con ISO 10993-5 [55].

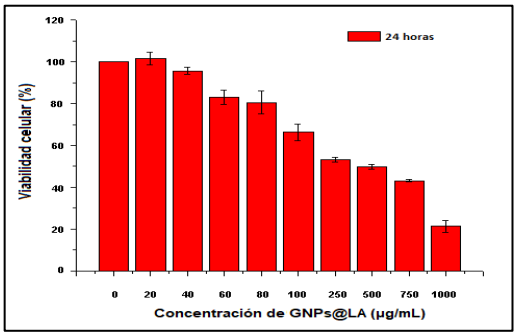


Figura 11. Viabilidad Celular a Diferentes Concentraciones

La Figura 12 muestra imágenes de los fibroblastos, de las diferentes concentraciones de GNPs@LA, a las 24 horas de cultivo. Se observaron más células en el control y concentraciones inferiores a 100 µg / ml, coincidiendo con los resultados del ensayo MTT.

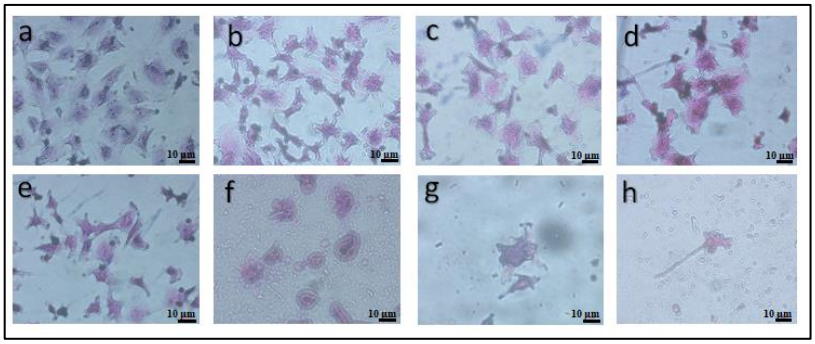


Figura 12. Morfología de Fibroblastos a Diferentes Concentraciones Después de 24 horas: a) Control b) 20 µg / ml c) 60 µg / ml d) 100 µg / ml e) 250 µg / ml f) 500 µg / ml g) 750 µg / ml h) 1000 µg / ml

Por otro lado, en las imágenes de concentraciones de nanopartículas superiores a 100 µg/ml, se observan menos células, con cambios en la morfología celular y daño de la membrana celular muy evidente a 500 µg/ml.

Con lo anterior, se cumplieron los objetivos planteados, es decir llevar a cabo la sinterización, fabricación, caracterización y la determinación de las concentraciones no toxicas a nivel celular en GNPs@LA. Con lo cual, pudimos comprobar que tenemos nanopartículas esféricas, dispersas, altamente estables con un tamaño menor de 5 nm, funcionales y no toxicas en concentraciones menores de 100 µg/ml. Estableciendo un material tentativo para llevar a cabo ensayos clínicos.

4.2. Análisis de Confiabilidad

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el trayecto para los modelos de degradación acelerada con los cuales se concluye el objetivo de estimar la vida útil de GNPs@LA.

4.2.1. Plan ADT de Esfuerzo Constante

Con el objetivo de aplicar un ADT de esfuerzo constante en GNPs@LA, los resultados del estudio exploratorio indican que el plan A que constaba del 12%, 16% y 20% de NaCl, las muestras al 20% de NaCl no se mezclaban de manera homogénea, presentando un choque de esfuerzo, debido a eso se optó por decrecer el porcentaje de sal estableciendo un plan B con un nivel bajo al 8%, medio al 12% y alto al 16% m/v con NaCl. También se determinó que 6 muestras de las 50 elaboradas no estaban bien estabilizadas mostrando una aglomeración al instante de colocar el NaCl. Por lo tanto, el ADT se realizó con 44 muestras.

Por consiguiente, el plan de prueba ADT de esfuerzo constante aplicado fue el siguiente, el número de muestras en cada nivel son: 19 muestras para el nivel bajo con un 8% de NaCl, 13 muestras para el nivel medio con 12% y 12 para el nivel alto al 16% de NaCl. Con un tiempo de censura de 69 días, distinto en comparación con el nivel bajo ya que este por condiciones de tiempo restante y por modificaciones del plan tuvo una censura de 51 días. Las mediciones de degradación se llevaron realizaron cada tercer día generando un total de 18

mediciones para el nivel bajo del 8% y 23 mediciones para el nivel medio y nivel alto respectivamente generando así señales de degradación en el transcurso del tiempo.

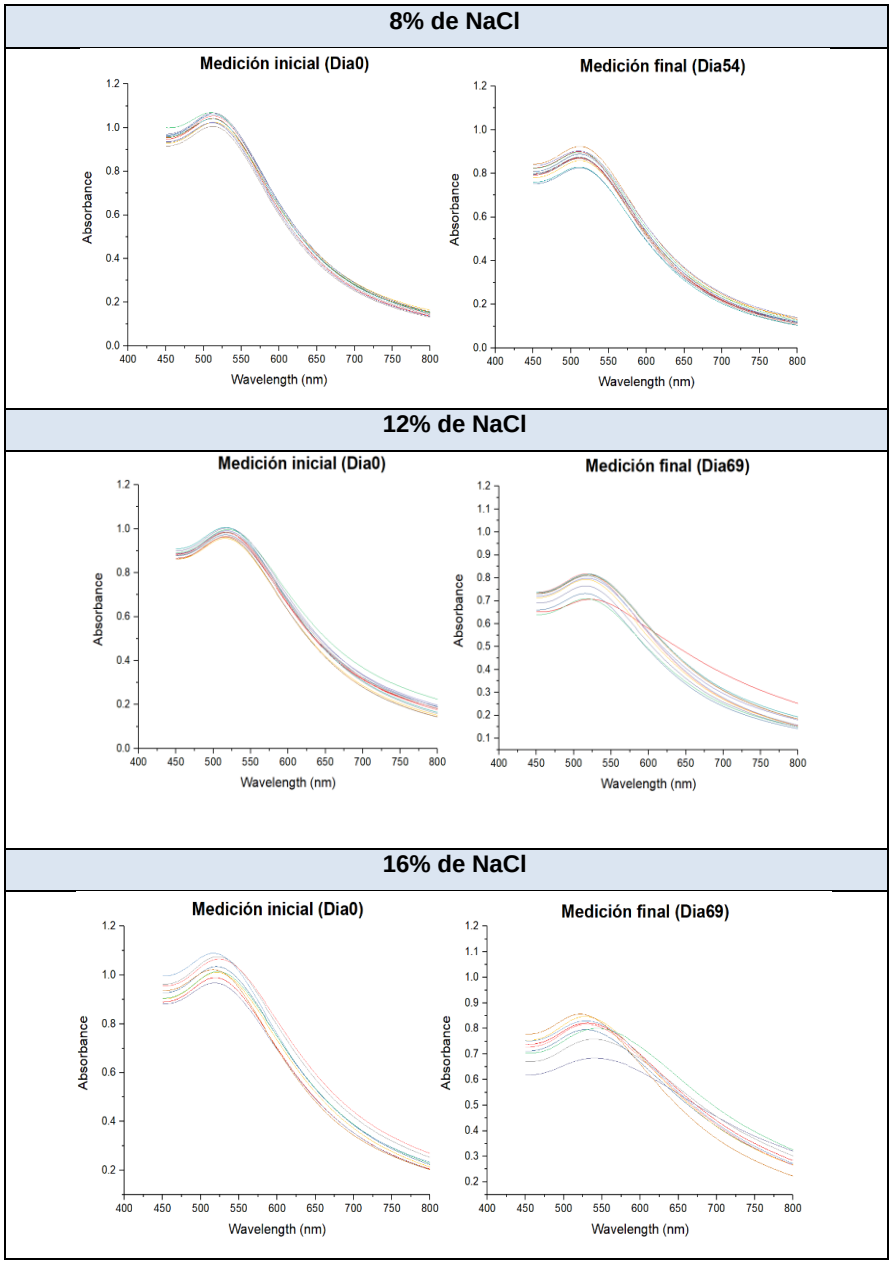


Figura 13 Espectros de Medición Inicial vs Medición Final del ADT en GNPs@LA

Finalmente, utilizando un análisis con el programa MetaSpecPro de absorbancia UV-Vis, las señales de degradación fueron obtenidas a través de los

espectros. En la Figura 13 se presentan gráficamente los cambios de los espectros de manera general comparando la primera medición contra la última medición en el rango de 400 a 800 nm en la longitud de onda.

Asimismo, se observa en las gráficas que a través del ADT, en los tres niveles de degradación, la amplitud de la absorbancia disminuye y la anchura de la banda se desplaza originando que el pico característico de la longitud de onda se recorra ocasionando la agregación de la nanopartícula que origina un aumento en el tamaño.

También se puede destacar que a mayores porcentajes de NaCl la degradación es más notoria que a porcentajes menores. En las muestras del 16% de NaCl, por ejemplo, se observó que los últimos días de medición, la consistencia de la solución coloidal ya estaba desestabilizada en su totalidad, no solo presentando agregación de nanopartículas si no también una aglomeración de estas. En la Figura 14 se presenta una imagen del material aglomerado al 16% de NaCl.

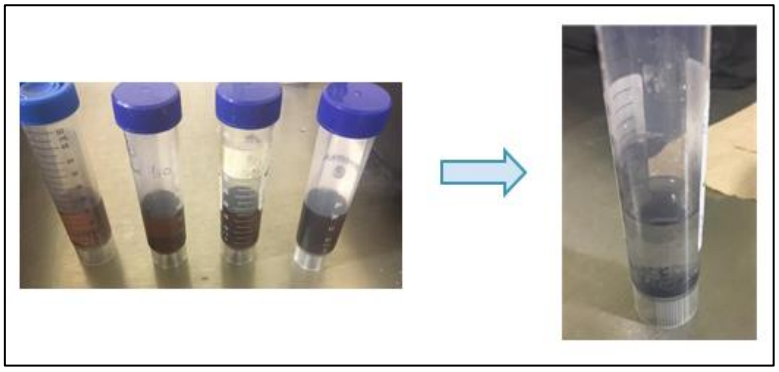


Figura 14. Consistencia del Material al 16% de NaCl los Últimos Días de Medición

En la Figura 15 se muestra la sección sombreada de 450 a 550 nm en la longitud de onda, siendo considerada la zona donde se realizó el análisis de datos la cual presenta el espectro promedio de la medición inicial contra la medición final donde se da a notar una disminución general en la amplitud de la absorbancia

del pico característico y un desplazamiento de este, causando un área cada vez más pequeña por debajo del espectro.

Asimismo, se hace énfasis a través de una línea vertical en las 525 unidades considerada como el umbral de falla en este estudio, es decir cuando el pico característico cruce esa línea de referencia consideramos a la nanopartícula aglomerada con un tamaño mayor de 25 nm según Haiss et al [53].

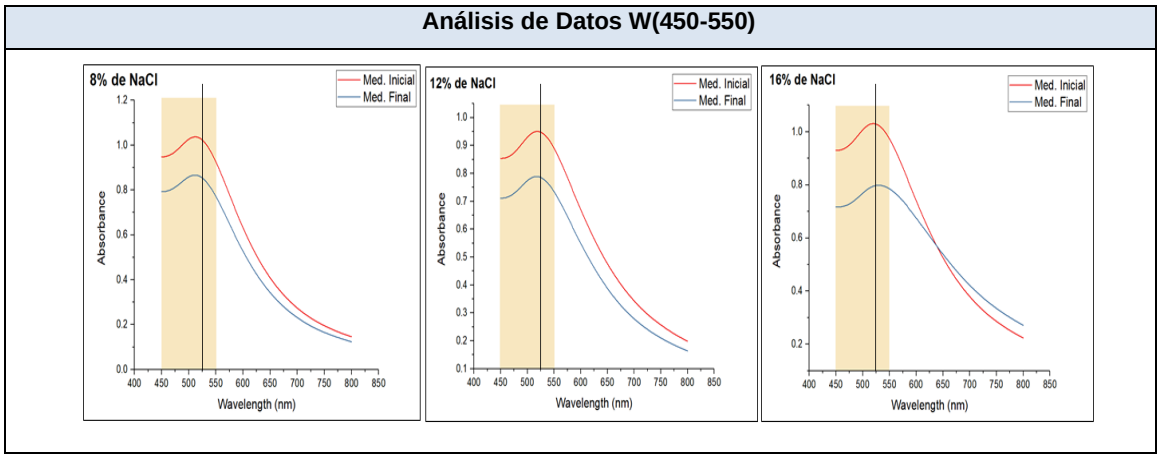


Figura 15. Espectros Promedio de Medición Inicial contra Medición Final

Por consiguiente, tenemos señales de degradación como son la disminución de la absorbancia, el desface del pico y la disminución en el área originada por la absorbancia y el desface del espectro. Estas características, son aprovechadas para conseguir datos de degradación los cuales podrán sobrepasar umbrales a partir de la agregación y aumento de la nanopartícula.

En la Figura 16. Se pueden observar los cambios en absorbancias, picos y áreas en los diferentes niveles de degradación conforme el tiempo transcurre originando señales de degradación que pueden ser caracterizadas como datos de degradación para el modelo que proporcione la vida útil de GNPs@LA.

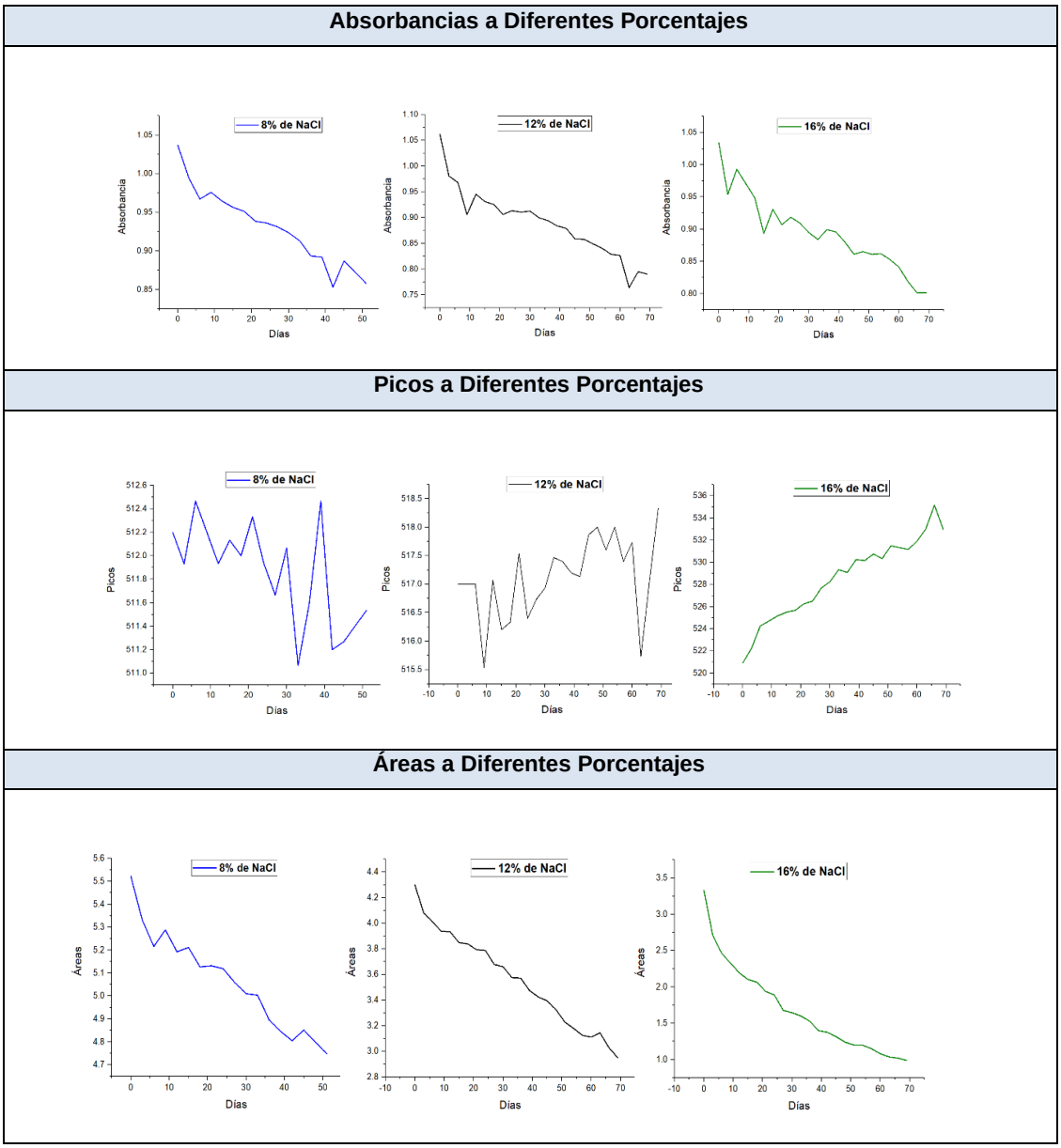


Figura 16. Señales de Degradación en Absorbancia, Picos y Áreas a Diferentes Porcentajes

4.2.2. Datos de Degradación

Se determino la degradación con la disminución del área cuantificada por la amplitud de la absorbancia y el desplazamiento del espectro en un dominio cerrado de 450 a 550 unidades en la longitud de onda, llegando al umbral de falla con el movimiento del pico característico hasta sobrepasar las 525 unidades.

Finalmente, se obtuvieron las áreas en las diferentes mediciones estableciendo datos de degradación, en la Tabla 3 se presentan las primeras cuatro mediciones y últimas tres mediciones del área cuantificada de 10 muestras en cada nivel.

Tabla 3. Mediciones Iniciales y Finales del Área en el ADT

Áreas del Espectro al 8% de NaCl

Dia	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
0	5.50165	5.26665	4.86065	5.3916	5.4005	5.8604	5.62905	5.30895	5.3311	5.6436
3	5.37395	5.0585	4.55985	5.23715	4.8998	5.6091	5.33015	5.1282	5.20905	5.04875
6	5.39295	4.9775	4.52205	4.90345	4.6434	5.64165	5.2187	5.0237	5.1632	5.45635
9	5.33085	4.98375	4.36105	4.91905	4.8535	5.4164	5.47385	5.2269	5.2551	5.33765
42	5.3151	4.4252	4.42795	4.9918	4.66755	5.045	5.2143	4.80885	4.7556	4.9843
45	5.24675	4.17875	4.50515	4.7241	4.36195	5.1335	5.08265	4.97705	4.9289	4.9062
51	5.24305	4.4662	4.33535	4.73645	4.6037	4.9256	4.93335	5.0234	4.64415	4.80265

Áreas del Espectro al 12% de NaCl

Dia	Muestra 20	Muestra 21	Muestra 22	Muestra 23	Muestra 24	Muestra 25	Muestra 26	Muestra 27	Muestra 28	Muestra 29
0	3.07395	4.48785	4.3704	5.0452	4.62065	4.3365	4.5837	3.9911	4.95855	4.2544
3	2.3426	3.87775	4.2327	4.6444	4.4027	4.1462	4.5884	3.9262	4.5858	4.3459
6	2.4253	3.90625	4.09915	4.3027	4.34095	4.27135	4.6241	3.69185	4.79905	4.24135
9	2.8924	4.08105	4.01815	4.51425	4.2638	4.08995	4.37755	3.66165	4.48285	4.1931
63	2.2334	3.29735	3.42055	3.5471	3.62975	3.17265	3.4497	2.83575	3.6845	3.4124
66	1.97545	3.4519	3.33725	3.468	3.3263	2.99265	3.3707	2.7696	3.63475	3.2209
69	2.0029	3.1518	3.22275	3.3318	3.42	2.90705	3.2721	2.7597	3.46555	3.16745

Áreas del Espectro al 16% de NaCl

Dia	Muestra 33	Muestra 34	Muestra 35	Muestra 36	Muestra 37	Muestra 38	Muestra 39	Muestra 40	Muestra 41	Muestra 42
0	3.2792	3.5287	3.38645	3.3131	3.0005	3.3088	2.1062	3.22485	2.643	4.0311
3	2.66	2.6652	2.6897	2.82615	2.09095	2.49745	1.3983	2.2697	2.2394	3.712
6	2.4659	2.51375	2.3945	2.66455	1.50165	2.30605	0.9798	1.8095	2.14195	3.6023
12	2.0422	2.10605	2.111	2.50685	1.1791	2.1207	0.58185	1.40755	2.0117	3.435
63	0.87345	1.13295	1.2204	1.50055	0.01545	0.1958	0.184	0.3247	1.21935	2.2911
66	0.89105	1.09925	1.22445	1.38345	0.01775	0.1357	0.15495	0.37575	1.2567	2.2574
69	0.661	1.0098	1.21885	1.48625	0.0403	0.28175	0.23965	0.2769	1.1511	2.122

4.2.3. Modelo de Degradación Acelerada

Considerando como degradación el área cuantificada y para mantener una notación acorde al modelado bajo el proceso Wiener propuesto en la formula (2.32), los incrementos de degradación fueron las diferencias entre el área obtenida el primer día de degradación con las obtenidas en los días subsecuentes, siendo estos los incrementos de degradación a modelar.

En la Tabla 4 se presentan las primeras cuatro y últimas tres mediciones del incremento por disminución del área de 10 muestras de cada nivel.

Tabla 4. Medición Inicial y Final del Incremento de Degradación en ADT

Incrementos de Degradación al 8% de NaCl

Dia	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.1277	0.20815	0.3008	0.15445	0.5007	0.2513	0.2989	0.18075	0.12205	0.59485
6	0.1087	0.28915	0.3386	0.48815	0.7571	0.21875	0.41035	0.28525	0.1679	0.18725
9	0.1708	0.2829	0.4996	0.47255	0.547	0.444	0.1552	0.08205	0.076	0.30595
42	0.18655	0.84145	0.4327	0.3998	0.73295	0.8154	0.41475	0.5001	0.5755	0.6593
45	0.2549	1.0879	0.3555	0.6675	1.03855	0.7269	0.5464	0.3319	0.4022	0.7374
51	0.2586	0.80045	0.5253	0.65515	0.7968	0.9348	0.6957	0.28555	0.68695	0.84095

Incrementos de Degradación al 12% de NaCl

Dia	Muestra 20	Muestra 21	Muestra 22	Muestra 23	Muestra 24	Muestra 25	Muestra 26	Muestra 27	Muestra 28	Muestra 29
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.73135	0.6101	0.1377	0.4008	0.21795	0.1903	-0.0047	0.0649	0.37275	-0.0915
6	0.64865	0.5816	0.27125	0.7425	0.2797	0.06515	-0.0404	0.29925	0.1595	0.01305
9	0.18155	0.4068	0.35225	0.53095	0.35685	0.24655	0.20615	0.32945	0.4757	0.0613
63	0.84055	1.1905	0.94985	1.4981	0.9909	1.16385	1.134	1.15535	1.27405	0.842
66	1.0985	1.03595	1.03315	1.5772	1.29435	1.34385	1.213	1.2215	1.3238	1.0335
69	1.07105	1.33605	1.14765	1.7134	1.20065	1.42945	1.3116	1.2314	1.493	1.08695

Incrementos de Degradación al 16% de NaCl

Dia	Muestra 33	Muestra 34	Muestra 35	Muestra 36	Muestra 37	Muestra 38	Muestra 39	Muestra 40	Muestra 41	Muestra 42
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.6192	0.8635	0.69675	0.48695	0.90955	0.81135	0.7079	0.95515	0.4036	0.3191
6	0.8133	1.01495	0.99195	0.64855	1.49885	1.00275	1.1264	1.41535	0.50105	0.4288
12	1.237	1.42265	1.27545	0.80625	1.8214	1.1881	1.52435	1.8173	0.6313	0.5961
63	2.40575	2.39575	2.16605	1.81255	2.98505	3.113	1.9222	2.90015	1.42365	1.74
66	2.38815	2.42945	2.162	1.92965	2.98275	3.1731	1.95125	2.8491	1.3863	1.7737
69	2.6182	2.5189	2.1676	1.82685	2.9602	3.02705	1.86655	2.94795	1.4919	1.9091

Con ello se presenta una notación acorde a la propiedad de incrementos independientes y normalmente distribuidos expuesta en el marco teórico sobre el proceso Wiener. Bajo esta consideración se obtuvieron las trayectorias de degradación para cada muestra en los diferentes niveles de porcentaje de NaCl.

En la Figura 17 se aprecian las diferentes trayectorias en cada nivel, desde el comienzo de la degradación, además se puede observar que desde la medición cero se tiene un comportamiento no monótono con tendencias de aumento y disminución. Así mismo, la degradación observada para productos de la misma población es distinta esto se puede atribuir a factores no observables como son la concentración, la variabilidad de unidad a unidad, la aleatoriedad inherente, así como la variabilidad de medición de cada muestra. Por ello, se opta por utilizar el

modelo estocástico Wiener con sus cuatro variantes ya que la teoría indica que tiene un gran potencial para capturar la dinámica estocástica además es aplicable a degradaciones no monótonas proporcionando una descripción satisfactoria y flexible a los datos de degradación.

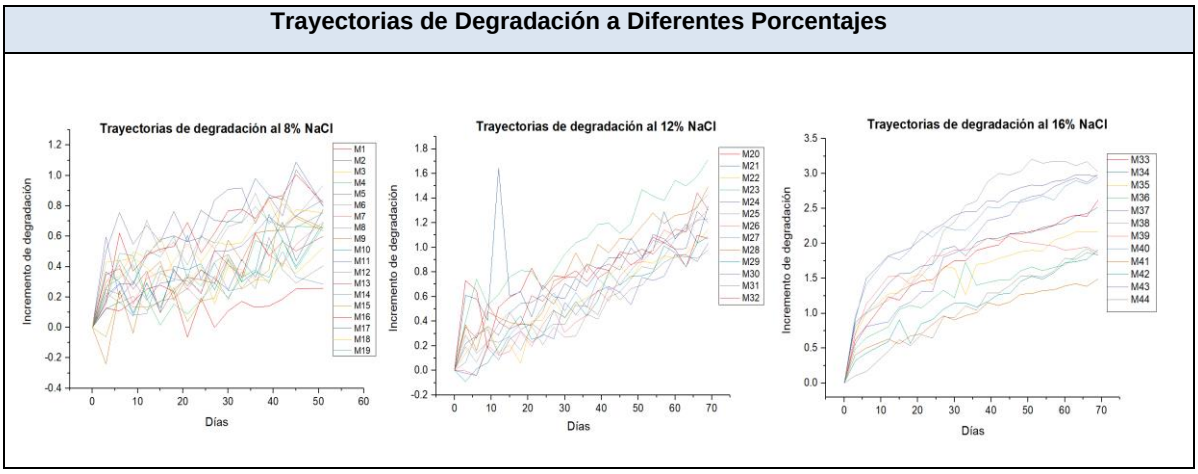


Figura 17. Trayectorias de Degradación

Recordando que bajo un modelo de degradación acelerada el paso central es configurar un modelo que describa el proceso de degradación. Para ello se propone el proceso Wiener no lineal que asume errores de medición, efectos aleatorios y diferentes funciones de enlace en la covariabilidad, generando tres distintos modelos a evaluar con los cuales se tratara de describir el comportamiento de las trayectorias recopiladas en el ADT.

Por consiguiente, en la Tabla 5 se muestran los valores kij representados en este trabajo bajo el plan compromiso obtenido.

Tabla 5. Valores kij representados en el ADT

Los niveles del porcentaje de NaCl como $k = 1, \dots, 3,$	$k = 1, 2, 3$ 1er Nivel 8% de NaCl 2do Nivel 12% de NaCl 3er Nivel 16% de NaCl
Las muestras como $i = 1, \dots, N_k$	$i = 1, \dots, N_1$ $N_1 = 19_{k=1}$ muestras $i = 1, \dots, N_2$ $N_2 = 13_{k=2}$ muestras $i = 1, \dots, N_3$ $N_3 = 12_{k=3}$ muestras
Los tiempos de medición $j = 1, \dots, M_{ki}$	$j = 1, \dots, M_{ki}$ $M_{ki} = 18$ mediciones para k=1 y para $i = 1, \dots, N_1$ $j = 1, \dots, M_{ki}$ $M_{ki} = 23$ mediciones para k=2 y para $i = 1, \dots, N_2$ $j = 1, \dots, M_{ki}$ $M_{ki} = 23$ mediciones para k=3 y para i= $1, \dots, N_3$

Asimismo, teniendo presente la metodología expuesta para la obtención de los modelos bajo el proceso Wiener con sus variantes mostradas en la Figura 4 y las consideraciones de la Tabla 5, suponemos que la degradación sigue una distribución normal con media $\lambda\omega$ y varianza $\sigma_B^2\omega$.

Por lo tanto, el modelo de degradación acelerada puede formularse como lo visto en la Tabla 2, generando un vector de parámetros a estimar $\widetilde{\Theta} = \{\mu_\eta, \sigma_\eta^2, \kappa, \beta, \tilde{\sigma}_\varepsilon^2\}$.

4.2.4. Estimación de Parámetros

En este apartado se presentan los resultados de la programación en R considerando la metodología expuesta en la Figura 4, para la obtención de los parámetros óptimos del proceso Wiener.

Para ello primeramente se deben determinar los parámetros iniciales cercanos a los estimados, así como el valor de b en la transformación del tiempo estos fueron obtenidos por un paquete preliminar que realiza una regresión individual utilizando mínimos cuadrados para cada trayectoria de degradación dando como parámetros iniciales $b = 0.61\,, \kappa = 0.65,\ \beta = -0.8479,\ \tilde{\sigma}_{\varepsilon}^{2} = .01$ asumiendo potencia inversa, para un modelo lineal fueron $b = 0.61\,, \kappa = 0.65,\ \beta = -0.18,\ \tilde{\sigma}_{\varepsilon}^{2} = .01$ y por último un modelo cuadrático siendo estos $b = 0.61\,, \kappa = 0.65,\ \beta_1 = 0.04,\ \beta_2 = 0.1\ \tilde{\sigma}_{\varepsilon}^{2} = .01.$ Estos fueron aplicados inicialmente para encontrar los valores óptimos, a través de la estimación de parámetros basados en máxima verosimilitud. Como respuesta a lo anterior se obtuvieron los parámetros óptimos los cuales son resaltados en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros Óptimos del Modelo de Degradación Acelerada

$M1$: **Covariabilidad Asumiendo Potencia Inversa**

μ_η	σ_η^2	κ	β	σ_ε^2
0.002508899	4.01E-08	0.000284	-1.49857	0.008011

$M2$: **Covariabilidad Asumiendo Modelo Lineal**

μ_η	σ_η^2	κ	β	σ_ε^2
0.0174058	2.02E-07	0.00181	-0.1428	0.00849

$M3$: **Covariabilidad Asumiendo Modelo Cuadrático**

μ_η	σ_η^2	κ	β_1	σ_ε^2	β_2
0.043855	6.38E-06	0.004603	0.01413	0.00838	0.006235

Finalmente, se obtiene un modelo general para el ADT planteado. Los valores resaltados en la Tabla 6 son los que se encuentran relacionados en el modelo. Por lo tanto, el modelo propuesto que describe las trayectorias de degradación de GNPs@LA obtenida por el ADT con NaCl como factor de aceleración bajo el proceso Wiener, esta presentado en la Tabla 7 por el modelo de degradación acelerada.

Tabla 7. Modelo de Proporción de Falla para la Degradación Acelerada

Modelo de Degradación Acelerada
$$y_{kij}(\omega_{kij}\|S_k) = \eta_i \varsigma_k \omega_{kij} + \sqrt{\kappa \varsigma_k} B(\omega_{kij}) + \varepsilon_{kij}$$
Con $\eta_i \sim N(\mu_\eta, \sigma_\eta^2)$ y $\varepsilon_{kij} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ donde $\varsigma_k =$ Función de enlace
$M1$: $\varsigma_k = exp(-\beta \ln(S_k))$
$M2$: $\varsigma_k = exp(-\beta(S_k))$
$M3$: $\varsigma_k = exp(-\beta_1(S_k) + \beta_2(S_k)^2)$

Por consiguiente, tenemos un modelo bajo el proceso Wiener no lineal que asume efectos aleatorios, errores de medición y covariabilidad asumiendo potencia inversa, un modelo lineal y un modelo cuadrático.

4.2.5. Vida Útil GNPs@LA y Evaluación de los Modelos Propuestos

Con los parámetros estimados del modelo en la Tabla 7 y estableciendo a w como el umbral de falla con un valor de 1.51 en el incremento de degradación. La distribución de vida está dada por (2.28). Por lo tanto, las funciones de densidad y densidad acumulada para cada nivel de degradación se muestran en la Figura No.18.

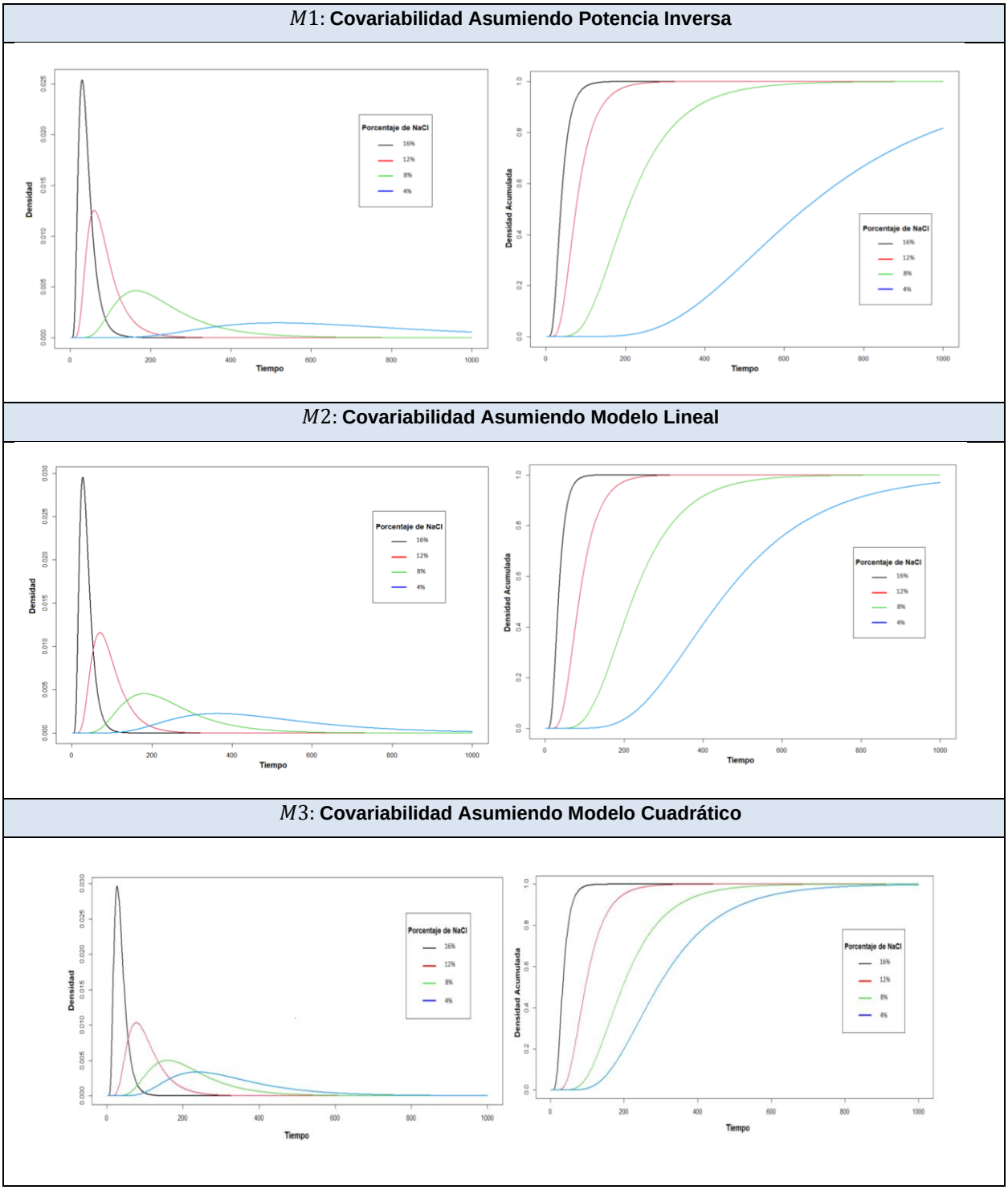


Figura 18. Densidad y Densidad Acumulada a 4%, 8%, 12%, 16% de NaCl de Abajo hacia Arriba Respectivamente

En la figura anterior, se observa que a porcentajes mayores la degradación es más notoria, también la masa de probabilidad se concentra más hacia el cero a medida que aumenta el porcentaje de NaCl, respondiendo a la prueba de degradación acelerada.

Dada la densidad acumulada del modelo, esta se puede evaluar para hacer inferencias deseadas y así estimar la vida útil en diferentes condiciones. Como ejemplo de ello, se presenta la Tabla 8 donde se muestran algunas proporciones de falla basados en la formula (2.28) utilizando como umbral de fallo el incremento de 1.51 que equivale a un área de 2.1 unidades la cual indica un deface de 525 nm en la longitud de onda.

Tabla 8. Proporción de Falla con Diferentes Porcentajes de NaCl para cada Modelo Propuesto

$M1$: Covariabilidad Asumiendo Potencia Inversa

Tiempo en días	Porcentaje de NaCl							
	1%	5%	8%	10%	12%	15%	16%	20%
30	2.33E-25	1.75E-12	1.20308E-05	0.001451	0.023435	0.210993	0.320997	0.755936
72	3.07E-18	5.52E-07	0.01216133	0.144256	0.457447	0.852555	0.916149	0.994221
360	0.000039458	0.1034275	0.8817988	0.990106	0.999452	0.999995	0.999999	1
720	0.0023586	0.5847553	0.9957677	0.99992	0.999999	1	1	1
1080	0.0125567	0.8569225	0.9997475	0.999998	1	1	1	1

$M2$: Covariabilidad Asumiendo Modelo Lineal

Tiempo en días	Porcentaje de NaCl								
	0%	1%	5%	8%	10%	12%	15%	16%	20%
30	1.27E-19	1.47E-15	2.58E-10	2.74E-06	0.000278	0.008722	0.215915	0.398593	0.97093
72	2.32E-12	3.30E-09	1.74E-05	0.005923	0.073099	0.346343	0.886156	0.960035	0.999973
360	0.000916554	0.02014277	0.3219994	0.872437	0.987258	0.999627	1	1	1
720	0.0622949	0.3145031	0.8679037	0.997232	0.999959	1	1	1	1
1080	0.2677017	0.6686216	0.9804374	0.999921	1	1	1	1	1

$M3$: Covariabilidad Asumiendo Modelo Cuadrático

Tiempo en días	Porcentaje de NaCl								
	0%	1%	5%	8%	10%	12%	15%	16%	20%
30	4.0617E-08	3.4217E-08	2.42787E-07	1.04E-05	0.000228	0.004944	0.191372	0.413277	0.997983
72	0.00046749	0.000420021	0.001403637	0.012609	0.065119	0.270244	0.858906	0.958466	1
360	0.6224423	0.6114609	0.7332443	0.912606	0.981237	0.998643	0.999999	1	1
720	0.96859	0.9664739	0.9852148	0.998279	0.999878	0.999998	1	1	1
1080	0.9972828	0.9970249	0.9990339	0.999944	0.999998	1	1	1	1

Los resultados obtenidos por los modelos difieren entre ellos, lo cual indica que algunos modelos propuestos en este trabajo pudieran no tener una alta precisión para la estimación de vida útil, como ejemplo en la Tabla 9 se muestran los resultados de los modelos, así como los datos experimentados, donde se observar que, el modelo M3 están más cercano a los valores reales.

Tabla 9. Comparación de Datos Experimentales vs Modelo Propuesto

Datos Experimentales vs Modelos Propuestos al 8% de NaCl

Días	Experimentado	M1: Pot. Inversa	M2: Mod. Lineal	M3: Mod.Cuadrático
15	0.000826734	2.46E-09	2.96819E-10	1.80851E-09
30	0.005574955	1.20E-05	2.74428E-06	0.000010446
45	0.01424884	0.000485821	0.00016033	0.000463049
51	0.018542765	0.001275171	0.000469182	0.001246791

Datos Experimentales vs Modelos Propuestos al 12% de NaCl

Días	Experimentado	M1: Pot. Inversa	M2: Mod. Lineal	M3: Mod.Cuadrático
15	0.004609365	0.000207397	3.52118E-05	1.45504E-05
30	0.045141355	0.02343532	0.008722226	0.004944342
45	0.1458425	0.133745	0.07256456	0.04818625
69	0.28057025	0.4219038	0.3115727	0.2398301

Datos Experimentales vs Modelos Propuestos al 16% de NaCl

Días	Experimentado	M1: Pot. Inversa	M2: Mod. Lineal	M3: Mod.Cuadrático
15	0.40765	0.0251291	0.03409092	0.03859255
30	0.62995	0.3209967	0.39859316	0.41327703
45	0.80432365	0.6528474	0.74677486	0.75251232
69	0.88569955	0.9015632	0.95068023	0.94924059

Por consiguiente, para continuar con la selección del modelo, así como para establecer que la covariabilidad tiene efecto en el modelado, se utiliza el criterio AIC a través de la comparación entre ellos. La Tabla 10 muestra los valores AIC obtenidos en cada uno de los modelos propuestos.

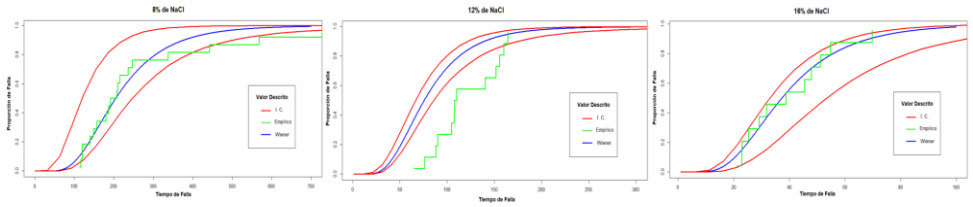
Tabla 10. Valores del Criterio AIC para Modelos Propuestos

Modelos de Degradación Acelerada			
Criterio Akaike para Modelos de Degradación	AIC: M1 Pot. Inversa	AIC:M2 Mod. Lineal	AIC: M3 Mod. Cuadrático
Modelo Propuesto con Covaribilidad	-993.771	-997.4386	-998.0174
Modelo Propuesto sin Covariabilidad	-931.703		

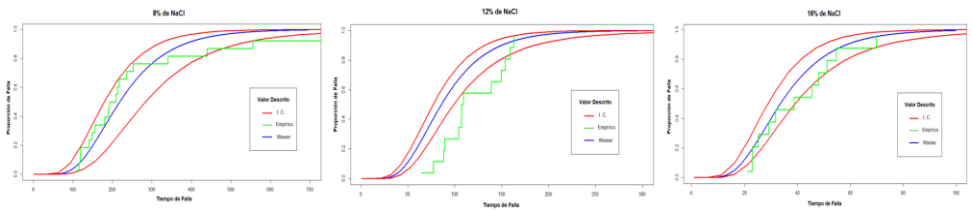
Con lo anterior, nos queda claro que la covariabilidad debe estar inmersa en el proceso y también que algunos modelos propuestos tienen un mejor ajuste entre las trayectorias de degradación modeladas. Donde la aplicación del criterio AIC sugiere que el M3 es una mejor opción para los datos de degradación obtenidos, así como el uso de la covariabilidad.

Asimismo, para continuar con la valoración, se hace uso de los parámetros estimados y con ello se procede a calcular los intervalos de confianza a través del método Bootstrap. Los resultados son mostrados en la Figura 19 para cada modelo y porcentaje de NaCl.

$M1$: **Covariabilidad Asumiendo Potencia Inversa**



$M2$: **Covariabilidad Asumiendo Modelo Lineal**



$M3$: **Covariabilidad Asumiendo Modelo Cuadrático**

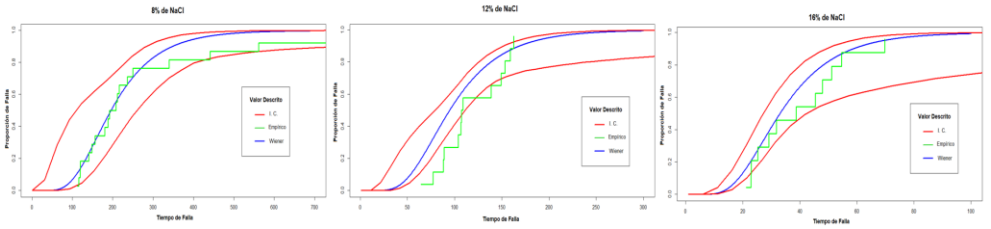


Figura 19. Resultados del Método Bootstrap en cada Modelo Propuesto

De acuerdo con los intervalos de confianza mostrados en la Figura 19, se aprecia que en los porcentajes del 8% y 16% los valores empíricos están cercanos a los teóricos y dentro del I.C. Por otro lado, se puede destacar que el porcentaje del 12% en los tres modelos se encuentran varios puntos distantes entre lo teórico y lo empírico, no obstante, el M3 pareciera tener más valores dentro del I.C. como también cercanos a los teóricos.

Por último, para juzgar la bondad de ajuste de cada modelo y tomar la decisión de cual tiene una mejor estimación, se utiliza el criterio de Cramer-von Mises formulas (2.40) y (2.41). Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Valores de P-Valor para Modelos Propuestos

Criterio Cramer-von Mises

Covariabilidad	Error Cuadrático			Sum error	P-Value
	16%	12%	8%		
M1: Pot. Inversa	0.067319	1.095690689	0.04488472	1.207895	0.000123
M2: Mod. Lineal	0.169103	0.63026364	0.049745008	0.849111	0.004957
M3: Mod. Cuadrático	0.05797	0.301367895	0.046279548	0.405617	0.108437

El estadístico de Cramer -von Mises indican que la hipótesis nula se ajusta a un modelo Wiener con distinta covariabilidad según sea el caso por evaluar, como resultado tenemos que el M1 y M2 propuestos tienen un p-valor menor de 0.05 lo que indica que el análisis no sigue ese modelo con el proceso indicado y

la función de enlace en la covariabilidad. En contraste M3 tiene un p-valor mayor de 0.05 con lo cual no tenemos evidencia de rechazo en la hipótesis nula por consiguiente los datos modelados se ajustan a un proceso Wiener con un modelo cuadrático en la covariabilidad. Por lo que concluimos que los datos se pueden modelar mediante el M3 de una manera confiable.

Con lo anterior, se cumplió con el objetivo de obtener la distribución de vida de GNPs@LA mediante pruebas de degradación acelerada con ello se estimó la vida útil del material en función del factor de degradación (NaCl) asimismo se analizaron los datos y se propuso un modelo de degradación estocástico Wiener con el cual se pudieron comprobar las hipótesis de que la vida útil si puede ser estimadas y que la covariabilidad en el modelo debe estar inmersa en él. Por lo tanto, las condiciones del método de prueba y análisis de degradación propuestos son adecuadas y eficientes.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se exponen las conclusiones del proyecto y las recomendaciones que describen las oportunidades para continuar la investigación.

5.1. Conclusiones

Este trabajo presenta la caracterización de GNPs@LA, donde se obtuvieron la morfología, tamaño, funcionabilidad, estabilidad y pruebas de citotoxicidad; confirmando que estas nanopartículas de oro tienen un alto potencial para aplicaciones industriales y biomédicas. Asimismo, se desarrolló una metodología para la prueba y análisis de degradación acelerada obteniendo la proporción de falla en función del porcentaje de NaCl para la estimación de vida útil de GNPs@LA, por lo que se logró el objetivo general planteado.

En lo que se refiere a los objetivos particulares se tiene que: Las nanopartículas de oro estabilizadas con ácido GNPs@LA se caracterizaron, determinando que LA se une a los GNPs a través de enlaces Au-S, originando una alta estabilidad y creando grupos COOH. Los resultados de TEM indican que las GNPs@LA están bien dispersas, con forma casi esférica, no aglomeradas y un tamaño promedio de 2.5 nm. Por medio de la espectroscopía UV-Vis, FTIR y Raman se determinó que LA está actuando como un agente de protección evitando la aglomeración temprana de las nanopartículas. La evaluación por el ensayo MTT permitió determinar que las GNPs@LA no presentan efectos tóxicos a nivel celular en concentraciones inferiores a 100 µg / ml. Estos resultados indican que se lograron totalmente los objetivos específicos en lo que refiere a la caracterización de GNPs@LA.

También se desarrolló la metodología y el modelo de análisis para la estimación de vida útil de GNPs@LA en función del NaCl, se diseñó y se realizó un plan de prueba ADT de esfuerzo constante de tres niveles con 8%, 12% y 16%

de NaCl con el cual se obtuvieron señales de degradación que fueron utilizadas bajo el proceso Wiener como datos de degradación. Asimismo, se determinaron las trayectorias de degradación que caracterizaban la degradación las cuales presentaron un comportamiento no monótono con tendencias oscilatorias, además la degradación observada para productos de la misma población fue distinta. Motivo por lo que se aplicó el proceso Wiener no lineal incorporando efectos aleatorios, errores de medición y distinta covariabilidad. Con lo cual proponemos tres modelos con distinta función de enlace, estos fueron obtenidos y evaluados. También, con las pruebas de ADT bajo el proceso Wiener propuesto se puede concluir que el modelo que aplica el proceso Wiener no lineal, con efectos aleatorios, mediciones de error y una covariabilidad que utiliza como función de enlace a un modelo cuadrático es efectivo y da la proporción de degradación de la vida útil de GNPs@LA en función del NaCl. Estos resultados nos motivan a brindar una garantía en GNPs@LA, brindando como herramienta la metodología propuesta.

Finalmente, con los resultados obtenidos en ambas áreas, este trabajo contribuye a que GNPs@LA viabilice su posible introducción al mercado como un material nanotecnológico con características establecidas y vida útil garantizada.

5.2. Recomendaciones

Como respuesta a lo anterior, este trabajo ha abierto áreas de oportunidad para seguir investigando tanto en el área de nanotecnología como en confiablidad.
En el área de nanotecnología:

- Con esta investigación se obtuvo información para ser descrita en hojas de seguridad de GNPs@LA, pero aún quedan muchos rubros pendientes en hojas de seguridad de otros nanomateriales ya en venta, por ello, hay que avanzar en el progreso de la regulación de esta ciencia con más investigación en estudios de acoplamiento y confiabilidad para la disminución de riesgos y obtención de beneficios en la aplicación.

- En este trabajo también, se observó que aún no están definidas algunas vibraciones encontradas en los resultados del FT-IR, motivo por el cual no fueron identificados algunos picos percibidos como 1115 y 1050 cm^{-1} que, aunque no era el propósito de este trabajo, queda pendiente para otros posteriores.

- Por último, en esta área se considera que las GNPs@LA tienen un gran potencial en el campo médico, el siguiente paso es la interacción de este material con algún otro que sea de interés para la aplicación médica, llevando con ello un análisis de acoplamiento para una aplicación determinada.

Por su parte, las principales recomendaciones referentes a estudios de confiabilidad son:

- Este trabajo ha generado otra vertiente de análisis para proporcionar garantías en nanomateriales, siendo una herramienta abierta para los interesados.

- Cuando sea necesario determinar un plan de prueba de degradación acelerada para materiales de reciente creación como los nanomateriales, es más conveniente aplicar un plan de prueba más flexible y con muestras más pequeñas, como el ADT de esfuerzo escalonado ya que este no requiere de un gran tamaño de muestras, es flexible y evita choques de esfuerzo.

- Es claro que este estudio realizado es parcial ya que solo se analiza con un factor de aceleración. No obstante, la metodología del modelo permite la incorporación de más factores de aceleración. Por consiguiente, es

necesario avanzar en esta línea para incorporar información que permita el análisis con más de un factor acelerante.

- Aplicar el modelo propuesto para mejorar la práctica industrial y la teoría de confiabilidad en modelos de aceleración en procesos y medios corrosivos.

6. ADENDUM

Existe una intensa investigación sobre cómo aprovechar las propiedades únicas de las GNPs incluidas las aplicaciones para la terapia del cáncer, la obtención de imágenes y el diagnóstico médico. Sin embargo, antes de que este material se pueda aplicar de forma segura en un entorno clínico, es necesario evaluar cuidadosamente su toxicidad, biocompatibilidad, biodistribución y biodegradación. Estos resultados permiten avalar la seguridad de estos productos para ser usados en el ámbito clínico.

La biocompatibilidad se describe como la cualidad que tiene un biomaterial de generar una respuesta biológica aceptable durante el tiempo y modo de contacto de una aplicación específica. La ausencia de rechazo de un implante o de un dispositivo por parte del organismo implica una aceptación tanto biológica, como química y mecánica.

En cuanto a la biodistribución es importante entender el mecanismo de absorción y dirección del material para comprender los posibles efectos adversos, como ejemplo, la irritabilidad es una propiedad que permite detectar cambios desfavorables de contacto a través de la sensibilidad protoplasmática en células. La irritabilidad se considera como la forma en que los seres vivos mantienen el equilibrio de bienestar tras la recepción de distintos estímulos.

La biodegradación de partículas es otro factor importante que debe tenerse en cuenta ya que puede ocurrir efectos adversos cuando las partículas no se biodegradan o eliminan fácilmente del cuerpo, en este tipo de ensayos se necesitan estudios in vivo a largo plazo en organismos ya que aborda las consecuencias de la acumulación del material en diferentes órganos y tejidos.

Además, también es importante evaluar el impacto en células humanas primarias para imitar más de cerca la situación humana y considerar las variaciones individuales en la reactividad antes de realizar estudios in vivo.

En general, comprender las características de los nanomateriales diseñados junto con una evaluación de seguridad en sistemas biológicos es la clave para el desarrollo de una implementación clínica.

7. PRODUCTOS OBTENIDOS

ISSN 1995-0780, Nanotechnologies in Russia, 2019, Vol. 14, Nos. 11–12, pp. 607–612. © Pleiades Publishing, Ltd., 2019.

NANOBIOMEDICINE AND NANOPHARMACEUTICALS

Facile Synthesis of Ultrasmall, Highly Stable, and Biocompatible Gold Nanoparticles Stabilized with Lipoic Acid: Cytotoxicity and Structural Characterization

Delfino Cornejo-Monroy[a], Betania Sánchez-Santamaria[a], Erwin Adán Martínez-Gómez[a], Imelda Olivas-Armendáriz[a], Alfredo Villanueva-Montellano[a], José Saúl Arias-Cerón[b], and Victor M. Castaño[c,*]

[a] *Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Colonia Partido Romero, Juárez, Chihuahua, C.P. 32310 México*

[b] *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, C.P. 07360 México*

[c] *Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Querétaro, C.P. 76230 México*

**e-mail: victor.m.castano@gmail.com*

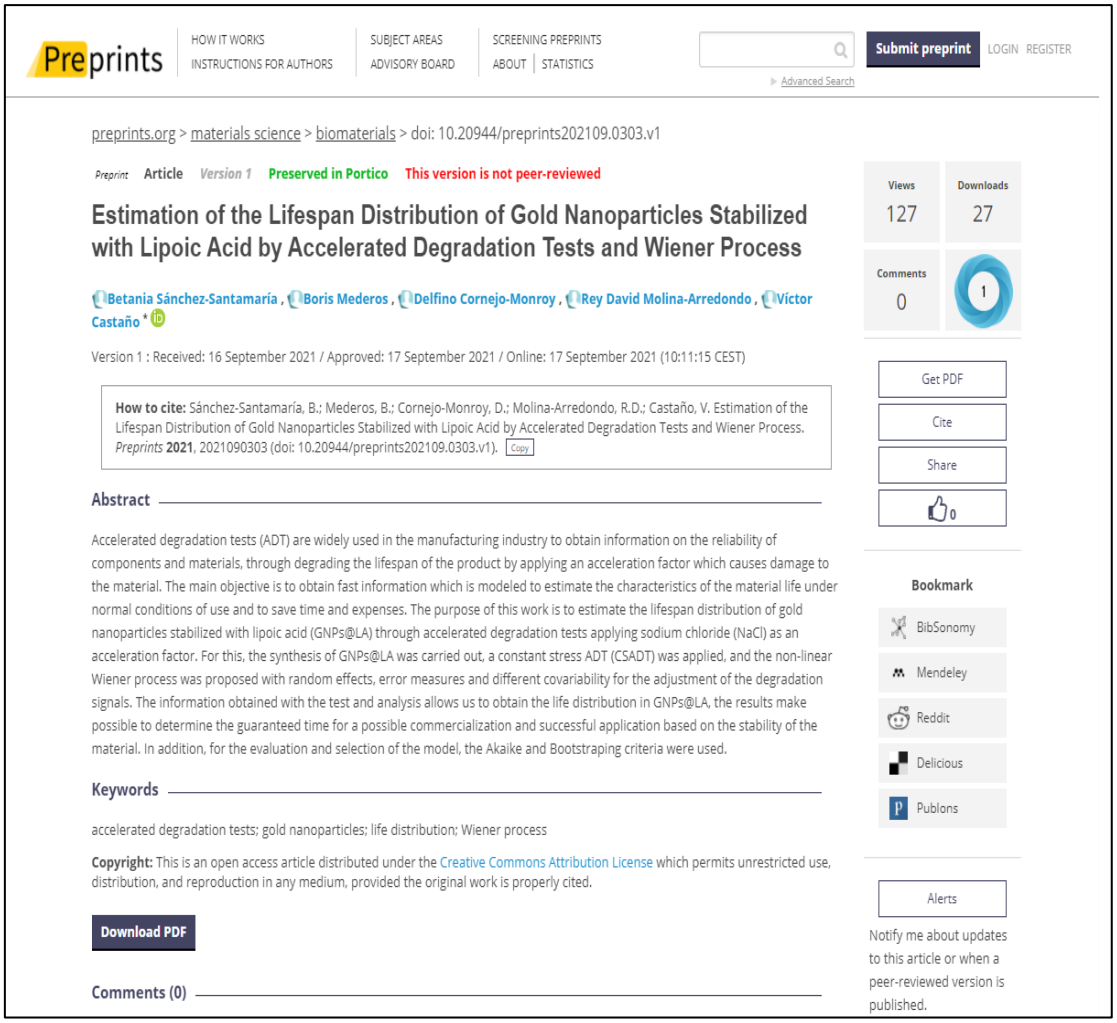
Received February 21, 2020; revised February 21, 2020; accepted March 25, 2020

Abstract—Using the colloidal method, and lipoic acid as a stabilizer, ultrasmall gold nanoparticles with an average size of 2.5 nm were synthesized. They are highly stable, have COOH functional groups, at concentrations lower than 100 μg/mL are non-cytotoxic, and the synthesis route is simple and economical. UV–Vis, FT-IR, Raman, and TEM spectroscopy were used to analyze their stability, composition and morphology. Furthermore, the cytotoxicity of the gold nanoparticles was evaluated by MTT assay.

DOI: 10.1134/S199507801906003X

1. INTRODUCTION

Nanogold is probably one of the most fascinating materials in the nanoscience and nanotechnology fields due to its physical and chemical properties [1, 2]. More specifically, due to its relatively simple synthesis, resistance to corrosion, biocompatibility, and uncomplicated functionalization, as well as conjugation with a great variety of chemical and biological entities [3]. Gold nanostructures have shown to have potential applications in many research areas. In medicine [4], ultrasmall nanoparticles below 5 nm have unique advantages in the human body due to their relatively rapid elimination, good uptake, and favorable interaction with radiation [2, 5]. For instance, gold nanostructures have been proven as effective sensors [6], chemical carriers [7, 8], and more recently as theranostic agents [4, 9, 10]. To be successful in any application, stability of nanogold has to be strong enough to resist aggressive conditions, such as laser irradiance, acid and basic mediums, salty medium, powder form, as well as biological conditions [11, 12]. Many chemical or biological entities have been used to give good stability to gold nanostructures, such as polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene glycol (PEG), xanthan gum, acacia gum, oleylamine and others [13–18]. In addition to the high stability, it is desired that the entity used to produce stability, also create functional groups. The functional groups are very useful tools to attach biological entities which give additional extraordinary physical and chemical properties that are necessary to achieve specific requirements for a determined application [19]. However, many entities used to stabilize do not create remarkable functional groups, and the processes generally require many steps, hazardous chemicals and they are time consuming [20–22]; all these entail expensive gold nanoparticles [2]. Furthemore, in biomedical applications, the interactions between surface funtionalized nanoparticles and cells can damage the integrity of the membrane structure [23], affecting viability or cellular functions [24, 25]. In this paper, a simple and economical method is presented to stabilize ultrasmall gold nanoparticles using lipoic acid. In medicine lipoic acid (LA) is used to treat many diseases, due to its antioxidant properties [26]. Our gold nanoparticles stabilized with lipoic acid (GNPs@LA) are very stable under different conditions, and have COOH functional groups on the nanoparticle's surface which can be used to conjugate biological entities for specific applications. UV–Vis, FT-IR, Raman spectroscopies, and TEM were used to analyze their stability, composition and morphology. Moreover, the cytotoxicity of GNPs@LA at different concentrations was tested at different concentrations giving favorable results.



Preprints

HOW IT WORKS
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS
SUBJECT AREAS
ADVISORY BOARD
SCREENING PREPRINTS
ABOUT | STATISTICS
Submit preprint
LOGIN REGISTER
Advanced Search

preprints.org > materials science > biomaterials > doi: 10.20944/preprints202109.0303.v1

Preprint Article Version 1 Preserved in Portico This version is not peer-reviewed

Estimation of the Lifespan Distribution of Gold Nanoparticles Stabilized with Lipoic Acid by Accelerated Degradation Tests and Wiener Process

Betania Sánchez-Santamaría , Boris Mederos , Delfino Cornejo-Monroy , Rey David Molina-Arredondo , Víctor Castaño *

Version 1 : Received: 16 September 2021 / Approved: 17 September 2021 / Online: 17 September 2021 (10:11:15 CEST)

How to cite: Sánchez-Santamaría, B.; Mederos, B.; Cornejo-Monroy, D.; Molina-Arredondo, R.D.; Castaño, V. Estimation of the Lifespan Distribution of Gold Nanoparticles Stabilized with Lipoic Acid by Accelerated Degradation Tests and Wiener Process. *Preprints* **2021**, 2021090303 (doi: 10.20944/preprints202109.0303.v1). Copy

Abstract

Accelerated degradation tests (ADT) are widely used in the manufacturing industry to obtain information on the reliability of components and materials, through degrading the lifespan of the product by applying an acceleration factor which causes damage to the material. The main objective is to obtain fast information which is modeled to estimate the characteristics of the material life under normal conditions of use and to save time and expenses. The purpose of this work is to estimate the lifespan distribution of gold nanoparticles stabilized with lipoic acid (GNPs@LA) through accelerated degradation tests applying sodium chloride (NaCl) as an acceleration factor. For this, the synthesis of GNPs@LA was carried out, a constant stress ADT (CSADT) was applied, and the non-linear Wiener process was proposed with random effects, error measures and different covariability for the adjustment of the degradation signals. The information obtained with the test and analysis allows us to obtain the life distribution in GNPs@LA, the results make possible to determine the guaranteed time for a possible commercialization and successful application based on the stability of the material. In addition, for the evaluation and selection of the model, the Akaike and Bootstraping criteria were used.

Keywords

accelerated degradation tests; gold nanoparticles; life distribution; Wiener process

Copyright: This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Download PDF

Comments (0)

Views 127
Downloads 27
Comments 0
1

Get PDF
Cite
Share
0

Bookmark
BibSonomy
Mendeley
Reddit
Delicious
Publons

Alerts
Notify me about updates to this article or when a peer-reviewed version is published.

8. BIBLIOGRAFÍA

[1] S. Ozcan and N. Islam, “Patent information retrieval: approaching a method and analysing nanotechnology patent collaborations,” *Scientometrics*, vol. 111, no. 2, pp. 941–970, 2017, doi: 10.1007/s11192-017-2325-y.

[2] C. Buzea, I. I. Pacheco, and K. Robbie, “Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity Nanomaterials and nanoparticles : Sources and toxicity,” vol. 17, no. 2007, 2017, doi: 10.1116/1.2815690.

[3] P. D. Lund, G. Hashmi, Y. Ma, J. Patakangas, and Y. Jing, “Degradation and stability of nanostructured energy devices,” *Microelectron. Eng.*, vol. 126, pp. 49–53, 2014, doi: 10.1016/j.mee.2014.05.002.

[4] M. J. Pitkethly, “Nanomaterials – the driving force,” *Mater. Today*, vol. 7, no. 12, pp. 20–29, 2004, doi: 10.1016/S1369-7021(04)00627-3.

[5] D. Cornejo-monroy, L. S. Acosta-torres, A. I. Moreno-vega, and C. Saldana, “Gold nanostructures in medicine : past , present and future,” *J. Nanosci. Lett.*, vol. 3, pp. 1–9, 2013.

[6] A. I. Oliva Arias, “New physical properties of nanostructured materials,” vol. 3, pp. 39–46, 2005.

[7] L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. S. Chen, and G. Chen, “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 5, pp. 595–601, 2015, doi: 10.1016/j.drudis.2014.11.014.

[8] C. A. Covarrubias Gordillo, L. Farías Cepeda, N. V Pérez Aguilar, and E. Hernández Hernández, “Nanocompuestos a Base De Polímeros Dispersos Y Nanofibras De Carbono,” *Rev. Iberoam. Polímero Vol. Iberoam. Polim*, vol. 14, no. 142, pp. 108–116, 2013.

[9] E. Rodríguez, R. Mejía de Gutiérrez, S. Bernal, and M. Gordillo, “Síntesis Y Caracterización De Polimeros Inorgánicos Obtenidos a Partir De La Activación Alcalina De Un Metacaolin De Elevada Pureza,” *X Congr. Iberoam. Metal. Y Mater. IBEROMET Oct. 2008*, vol. 1, no. 2, pp. 595–600, 2009.

[10] K. Jiang and A. O. Pinchuk, “Chapter Two - Noble Metal Nanomaterials: Synthetic Routes, Fundamental Properties, and Promising Applications,” vol. 66, R. E. Camley and R. L. B. T.-S. S. P. Stamps, Eds. Academic Press, 2015, pp. 131–211.

[11] Y. Xia and N. J. Halas, “S hape-Controlled Surface Plasmonic Nanostructures,” *MRS Bull.*, vol. 30, no. May, p. 338, 2005, doi: 10.1557/mrs2005.96.

[12] L. Tamayo, H. Palza, J. Bejarano, and P. Zapata, “Polymer composites with metal nanoparticles: synthesis, properties, and application polymer composites with functionalized nanoparticles,” in *Polymer composites*

with functionalized nanoparticles, Elsevier Inc., 2019, pp. 249–286.

[13] K. Haume *et al.*, "Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review," *Cancer Nanotechnol.*, vol. 7, no. 1, p. 8, Nov. 2016, doi: 10.1186/s12645-016-0021-x.

[14] S. Afonso *et al.*, "Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 121–126, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.054.

[15] J. Guo, K. Rahme, Y. He, L. L. Li, J. D. Holmes, and C. M. O'Driscoll, "Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6131–6152, 2017, doi: 10.2147/IJN.S140772.

[16] V. S. Sivasankarapillai *et al.*, "On facing the SARS-cov-2 (COVID-19) with combination of nanomaterials and medicine: Possible strategies and first challenges," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5, pp. 1–23, 2020, doi: 10.3390/nano10050852.

[17] S. Afonso, B. Pe, M. M. Costa, A. Merkoc, and A. X. Roig-sague, "Biosensors and Bioelectronics Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles," vol. 40, pp. 121–126, 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.06.054.

[18] S. Parveen, R. Misra, and S. Sahoo, "Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 147–166, 2012, doi: 10.1016/j.nano.2011.05.016.

[19] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Aval, M. Kouhi, and A. Akbarzadeh, "Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 410–422, 2014, doi: 10.3109/21691401.2014.955107.

[20] S. Patra, S. Mukherjee, A. Barui, A. Ganguly, B. Sreedhar, and C. Patra, "Green synthesis , characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 53, pp. 298–309, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.04.048.

[21] J. Guo, K. Rahme, Y. He, L. Li, J. Holmes, and C. O'Driscoll, "Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 6131–6152, 2017, doi: 10.2147/IJN.S140772.

[22] G. Brancolini and V. Tozzini, "Multiscale modeling of proteins interaction with functionalized nanoparticles," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 41, pp. 66–73, 2019, doi: 10.1016/j.cocis.2018.12.001.

[23] R. Handy, F. Von Der Kammer, J. Lead, M. Hassellöv, R. Owen, and M. Crane, “The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles,” *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 4, pp. 287–314, 2008, doi: 10.1007/s10646-008-0199-8.

[24] D. B. Warheit, “Debunking some misconceptions about nanotoxicology,” *Nano Lett.*, vol. 10, no. 12, pp. 4777–4782, 2010, doi: 10.1021/nl103432w.

[25] D. M. Mitrano, S. Motellier, S. Clavaguera, and B. Nowack, “Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products,” *Environ. Int.*, vol. 77, pp. 132–147, 2015, doi: 10.1016/j.envint.2015.01.013.

[26] Z. Zhu, Y. Li, F. Wu, and Y. C. Chan, “Enhanced electromigration (EM) reliability of Sn58Bi solder due to the incorporation of ZrO2nanoparticles,” *2016 6th Electron. Syst. Technol. Conf. ESTC 2016*, pp. 5–8, 2016, doi: 10.1109/ESTC.2016.7764722.

[27] W. Q. Meeker, “Trends in the Statistical Assessment of Reliability,” *Adv. Degrad. Model.*, pp. 3–16, 2010, doi: 10.1007/978-0-8176-4924-1_1.

[28] L. A. E. Scobar, “Statistical Prediction Based on Censored Life Data,” vol. 41, no. 2, 1999.

[29] S. M. Zaharia and I. Martinescu, “Management of accelerated reliability testing,” *Teh. Vjesn. - Tech. Gaz.*, vol. 23, no. 5, pp. 1447–1455, 2016, doi: 10.17559/TV-20141119153642.

[30] Q. Guan, Y. Tang, and A. Xu, “Objective Bayesian analysis accelerated degradation test based on Wiener process models,” *Appl. Math. Model.*, vol. 40, no. 4, pp. 2743–2755, 2016, doi: 10.1016/j.apm.2015.09.076.

[31] Y. Wang, C. Zhang, S. Zhang, X. Chen, and Y. Tan, “Optimal design of constant stress accelerated degradation test plan with multiple stresses and multiple degradation measures,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part O J. Risk Reliab.*, vol. 229, no. 1, pp. 83–93, 2015, doi: 10.1177/1748006X14552312.

[32] Z. Zhang, X. Si, C. Hu, and Y. Lei, “Degradation data analysis and remaining useful life estimation : A review on Wiener-process-based methods,” *Eur. J. Oper. Res.*, vol. 271, no. 3, pp. 775–796, 2018, doi: 10.1016/j.ejor.2018.02.033.

[33] M. Teimouri *et al.*, “Gold nanoparticles fabrication by plant extracts: synthesis, characterization, degradation of 4-nitrophenol from industrial wastewater, and insecticidal activity - A review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 184, pp. 740–753, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.02.268.

[34] M. Sengani, A. Grumezescu, and V. Rajeswari, “Recent trends and methodologies in gold nanoparticle

synthesis – A prospective review on drug delivery aspect," *OpenNano*, vol. 2, no. July, pp. 37–46, 2017, doi: 10.1016/j.onano.2017.07.001.

[35] P. Bergese and K. Hamad-Schifferli, *Nanomaterial interfaces in biology. Methods and protocols*, 1st ed., vol. 1025. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.

[36] L. S. Tanaka, "Regulando la nanotecnología Regulating nanotechnology," *Mundo Nano*, vol. 12, no. 22, pp. 37–57, 2019, doi: http://dx.doi.org/10.22201.

[37] S. Larsson, M. Jansson, and Å. Boholm, "Expert stakeholders' perception of nanotechnology: risk, benefit, knowledge, and regulation," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 21, no. 3, 2019, doi: 10.1007/s11051-019-4498-1.

[38] H. Terrones, "Nanociencia y Naotecnología en México," *D.R TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 8, pp. 50–51, 2005, [Online]. Available: http://www.redalyc.org/BusquedasAvanzadas.oa.

[39] R. Zanella, "Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño," *Www.Mundonano.Unam.Mx*, vol. 5, no. 1, pp. 69–81, 2012, doi: http://dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2012.1.

[40] Y. Wang and Y. Xia, "Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals," *Nano Lett.*, vol. 4, no. 10, pp. 2047–2050, 2004, doi: 10.1021/nl048689j.

[41] A. Biswas, I. S. Bayer, A. S. Biris, T. Wang, E. Dervishi, and F. Faupel, "Advances in top–down and bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 170, no. 1–2, pp. 2–27, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.CIS.2011.11.001.

[42] G. A. Ozin *et al.*, "Nanofabrication by self-assembly," *Mater. Today*, vol. 12, no. 5, pp. 12–23, 2009, doi: 10.1016/S1369-7021(09)70156-7.

[43] M. Trejo-Duran, D. Cornejo-Monroy, E. Alvarado-Mendez, A. Olivares-Vargas, and V. M. Castano, "Nonlinear optical properties of Au-nanoparticles conjugated with lipoic acid in water," *J. Eur. Opt. Soc. Rapid Publ.*, vol. 9, p. 14030, 2014, doi: 10.2971/jeos.2014.14030.

[44] L. Packer, E. H. Witt, and H. J. Tritschler, "Alpha-lipoic as a biologycal antioxydant," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 227–250, 1995, doi: 10.1016/0891-5849(95)00017-R.

[45] K. Huang *et al.*, "Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo," *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 4483–4493, 2012, doi:

10.1021/nn301282m.

[46] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, “Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV − Vis Spectra Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV - Vis Spectra,” *file:///C:/Users/betan/Desktop/fundamento/espectrofotometro/art7_52013.pdf*, vol. 79, no. October, pp. 4215–4221, 2015, doi: 10.1021/ac0702084.

[47] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, and D. G. Fernig, “Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV−Vis spectra,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 11, pp. 4215–4221, Jun. 2007, doi: 10.1021/ac0702084.

[48] N. A. Díaz *et al.*, “8 . Espectrofometría : Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas,” pp. 1–8.

[49] J. C. Martínez, N. A. Chequer, J. L. González, and T. Cordova, “Alternative Metodology for Gold Nanoparticles Diameter Characterization Using PCA Technique and UV-VIS Spectrophotometry,” *Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 6, pp. 184–189, 2013, doi: 10.5923/j.nn.20120206.06.

[50] Y. Yang, S. Matsubara, M. Nogami, and J. Shi, “Controlling the aggregation behavior of gold nanoparticles,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 140, no. 3, pp. 172–176, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.mseb.2007.03.021.

[51] J. C. H. Spence, *Experimental high-resolution electron microscopy*. 1988.

[52] H. H. Mantsch, P. W. Yang, and H. L. Casal, “Infrared spectrometry of living systems: current trends and perspectives.,” *J. Mol. Struct.*, vol. 141, pp. 237–242, 1986, doi: https://doi.org/10.1016/0022-2860(86)80328-3.

[53] G. Socrates, *Infrared and Raman Characteristics Group Frequencies*, Third edit. Wiley, 2001.

[54] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, and L. Tang, “Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent.,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, p. 22, Aug. 2010, doi: 10.1186/1743-8977-7-22.

[55] S. Enanv, H. Medical, S. Ab, and S. Bertling, *International standard*, vol. 2009. 2009.

[56] R. Mondragón, J. E. Juliá, A. Barba, and J. C. Jarque, “Preparación y caracterización de nanofluidos: Influencia de variables sobre su estabilidad, estado de aglomeración y propiedades físicas,” *Bol. la Soc. Esp. Ceram. y Vidr.*, vol. 53, no. 3, pp. 101–110, 2014, doi: 10.3989/cyv.142014.

[57] Ramdayal and K. Balasubramanian, “Antibacterial application of polyvinylalcohol-nanogold composite membranes,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 455, no. 1, pp. 174–178, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.04.050.

[58] Greg. T Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Editio. Rocford, Illinois USA, 1996.

[59] M. Shilo, A. Sharon, K. Baranes, M. Motiei, J. P. M. Lellouche, and R. Popovtzer, “The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: An in-vitro endothelial cell model,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1186/s12951-015-0075-7.

[60] K. Huang *et al.*, “Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 5, pp. 4483–4493, 2012, doi: 10.1021/nn301282m.

[61] J. Li, J. J. Li, J. Zhang, X. Wang, N. Kawazoe, and G. Chen, “Gold nanoparticle size and shape influence on osteogenesis of mesenchymal stem cells,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 15, pp. 7992–8007, 2016, doi: 10.1039/C5NR08808A.

[62] A. C. Lucioni, “Summary of Gold Nanoparticles Obtained By,” *Rev. la Soc. Química del Perú*, vol. 78, no. 2, pp. 79–90, 2012.

[63] K. Tseng, C. Hsieh, J. Huang, and D. Tien, “The Effect of NaCl / pH on Colloidal Nanogold Produced by Pulsed Spark Discharge,” *J. Nanometals*, vol. 2015, pp. 1–7, 2015, doi: http://dx.doi.org/10.1155/2015/612324.

[64] W. and L. E. Meeker, *Statistical Methods for Reliability Data*, 1998th ed. New York.

[65] X. Liu, K. Yeo, and J. Kalagnanam, *Statistical Modeling for Degradation Data*. 2017.

[66] Z. Ye and M. Xie, “Stochastic modelling and analysis of degradation for highly reliable products,” *Wiley Online Libr.*, no. October 2014, pp. 16–32, 2014, doi: 10.1002/asmb.2063.

[67] L. Sun, X. Gu, and P. Song, “Accelerated Degradation Process Analysis Based on the Nonlinear Wiener Process with Covariates and Random Effects,” vol. 2016, 2016.

[68] L. Liu, X. Li, F. Sun, and N. Wang, “A general accelerated degradation model based on the wiener process,” *Materials (Basel).*, vol. 9, no. 12, pp. 1–21, 2016, doi: 10.3390/ma9120981.

[69] Z. Ye, Y. Wang, S. Member, and K. Tsui, “Degradation Data Analysis Using Wiener Processes With Measurement Errors,” vol. 62, no. 4, pp. 772–780, 2013.

[70] X. Wang, “Wiener processes with random effects for degradation data,” *J. Multivar. Anal.*, vol. 101, no. 2, pp. 340–351, 2010, doi: 10.1016/j.jmva.2008.12.007.

[71] C. Y. Peng and S. T. Tseng, “Mis-specification analysis of linear degradation models,” *IEEE Transactions on Reliability*, vol. 58, no. 3. pp. 444–455, 2009, doi: 10.1109/TR.2009.2026784.

[72] X. S. Si, W. Wang, C. H. Hu, D. H. Zhou, and M. G. Pecht, “Remaining useful life estimation based on a nonlinear diffusion degradation process,” *IEEE Trans. Reliab.*, vol. 61, no. 1, pp. 50–67, 2012, doi: 10.1109/TR.2011.2182221.

[73] X.-S. Si, W. Wang, C.-H. Hu, M.-Y. Chen, and D.-H. Zhou, “A Wiener-process-based degradation model with a recursive filter algorithm for remaining useful life estimation,” *Mech. Syst. Signal Process.*, vol. 35, no. 1, pp. 219–237, 2013, doi: https://doi.org/10.1016/j.ymssp.2012.08.016.

[74] C.-C. Tsai, S.-T. Tseng, and N. Balakrishnan, “Mis-specification analyses of gamma and Wiener degradation processes,” *J. Stat. Plan. Inference*, vol. 141, no. 12, pp. 3725–3735, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.jspi.2011.06.008.

[75] J. Li, Z. Wang, Y. Zhang, H. Fu, C. Liu, and S. Krishnaswamy, “Degradation data analysis based on a generalized Wiener process subject to measurement error,” *Mech. Syst. Signal Process.*, vol. 94, pp. 57–72, 2017, doi: 10.1016/j.ymssp.2017.02.031.

[76] J. Nocedal, “Updating Quasi-Newton Matrices with Limited Storage,” *Math. Comput.*, vol. 35, no. 151, p. 773, 1980, doi: 10.2307/2006193.

[77] K. T. P. Nguyen, M. Fouladirad, and A. Grall, “Model selection for degradation modeling and prognosis with health monitoring data,” *Reliab. Eng. Syst. Saf.*, vol. 169, pp. 105–116, 2018, doi: 10.1016/j.ress.2017.08.004.

[78] R. Ledesma, “Introduccción al Bootstrap .,” *Tutor. Quant. Methods Psychol.*, vol. 4, no. 2, pp. 51–60, 2008.

[79] T. C. Hesterberg, “Bootstrap tilting confidence intervals and hypothesis tests,” *Comput. Sci. Stat. Proc. 31st Symp. Interface*, no. August 1999, pp. 389–393, 1999.

[80] T. W. Anderson, “On the Distribution of the Two-Sample Cramer-von Mises Criterion,” *Ann. Math. Stat.*, vol. 33, no. 3, pp. 1148–1159, 1962, doi: 10.1214/aoms/1177704477.

[81] E. V. Chimitova and E. S. Chetvertakova, “Goodness-of-Fit Testing for the Degradation Models in Reliability Analysis,” *2018 14th Int. Sci. Conf. Actual Probl. Electron. Instrum.*

Eng. APEIE 2018 - Proc., no. 1, pp. 45–48, 2018, doi: 10.1109/APEIE.2018.8546176.

[82] D. Cornejo-Monroy *et al.*, “Facile Synthesis of Ultrasmall, Highly Stable, and Biocompatible Gold Nanoparticles Stabilized with Lipoic Acid: Cytotoxicity and Structural Characterization,” *Nanotechnologies Russ.*, vol. 14, no. 11–12, pp. 607–612, 2019, doi: 10.1134/S199507801906003X.

[83] V. Amendola and M. Meneghetti, “Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 11, pp. 4277–4285, 2009, doi: 10.1021/jp8082425.

[84] D. Divakaran, J. R. Lakkakula, M. Thakur, M. Kumar, and R. Srivastava, “Dragon fruit extract capped gold nanoparticles : Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells,” *Mater. Lett.*, vol. 236, pp. 498–502, 2019, doi: 10.1016/j.matlet.2018.10.156.

[85] M. Noruzi, D. Zare, K. Khoshnevisan, and D. Davoodi, “Rapid green synthesis of gold nanoparticles using Rosa hybrida petal extract at room temperature,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 79, no. 5, pp. 1461–1465, 2011, doi: 10.1016/j.saa.2011.05.001.

[86] B. Varnholt, P. Oulevey, S. Luber, C. Kumara, A. Dass, and T. Bürgi, “Structural information on the Au-S interface of thiolate-protected gold clusters: A raman spectroscopy study,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 18, pp. 9604–9611, 2014, doi: 10.1021/jp502453q.