



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Ingeniería Química

*Síntesis de nanopartículas de oro funcionalizadas con
1-dodecanotiol en un sistema bifásico.
Desarrollo de sensores electroquímicos.*

Autor:

González Antón, Rocío

Tutor:

Rodríguez Méndez, Dra. María Luz

Departamento de Química-Física y
Química Inorgánica

Valladolid, Marzo del 2016.





AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. María Luz Rodríguez Méndez catedrática de la Universidad de Valladolid el brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación UVaSens durante más de medio año, así como toda la confianza y apoyo que ha puesto en mí por ejemplo pudiendo exponer en la jornada de investigadoras de la UVA.

A Silvia Rodríguez Sánchez, investigadora del grupo UVaSens, por todo su apoyo y enseñanzas durante el desarrollo del proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio por su amistad y ayuda durante estos meses.

A la Dra. Blanca Calvo Cabezón y su equipo del Departamento de Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid.

Mis agradecimientos a MINECO y FEDER (grant CICYT-AGL2012-33535) y la Junta de Castilla y León (VA-032U13) por su financiación.

Este proyecto se lo dedico a mi familia.





ABSTRACT/RESUMEN

In the last decades, gold nanoparticles (AuNPs) have attracted much research attention due to their unique electric, catalytic, and optical properties originating from the quantum scale dimensions, therefore, synthesis of colloidal gold nanoparticles has evolved into an important field in nanoscience and nanotechnology. Through the efforts of research, it has shown that AuNPs allow obtaining complex structures that can be used to create a variety of electronic devices such as sensors. This fact, has promoted the project, it has been addressed synthesis of thiol-derivatised AuNPs in a two phase liquid-liquid, it has also been addressed their characterization and study using techniques ultraviolet-visible spectroscopy, infrared and electron microscopy, and ultimately the development of electrochemical sensors with functionalized AuNPs for the analysis of antioxidants in foods.

En las últimas décadas, las nanopartículas de oro (AuNPs) han despertado la atención de la comunidad científica debido a sus propiedades eléctricas, catalíticas y ópticas únicas procedentes de la dimensión cuántica, esto ha llevado a que la síntesis de nanopartículas coloidales de oro represente un campo importante en la nanociencia y la nanotecnología. Gracias al esfuerzo de la investigación, se ha demostrado que las AuNPs permiten obtener estructuras complejas que pueden ser empleadas para crear una variedad de dispositivos electrónicos como los sensores. Este hecho, ha promovido el desarrollo de este proyecto, donde se ha abordado la síntesis de AuNPs funcionalizadas con un alcanotiol en un sistema bifásico líquido-líquido, donde también se ha abordado su caracterización y estudio mediante técnicas de espectroscopia ultravioleta-visible, infrarroja y microscopía electrónica y en última instancia el desarrollo de sensores electroquímicos con AuNPs funcionalizadas para el análisis de antioxidantes en alimentos.

Keywords: gold nanoparticles (AuNPs), functionalized, thiol, sensor, voltammetry.

Palabras clave: nanopartículas de oro (AuNPs), funcionalizar, tiol, sensor, voltametría.





ÍNDICE

Capítulo 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	17
Capítulo 2. DESARROLLO.....	21
1.- Estado del arte.....	23
1.1- Nanociencia y nanotecnología.....	23
1.1.1.- Clasificación de los nanomateriales.....	26
1.1.2.- Técnicas de fabricación de la nanociencia y nanotecnología.....	28
1.2.- NPs metálicas y sus propiedades.....	29
1.3.- Síntesis de NPs metálicas.....	35
1.3.1.- Síntesis de AuNPs en fase acuosa. Método Turkevich.....	37
1.3.2.- Síntesis de AuNPs en fase orgánica. Método Brust-Schiffrin.....	39
1.4.- Caracterización de AuNPs.....	43
1.4.1.- Espectroscopia de absorción Uv-vis.....	43
1.4.2.- Espectroscopia de absorción infrarroja.....	46
1.4.3.- Microscopía electrónica.....	48
1.5.- Sensores electroquímicos.....	50
1.6.- Antioxidantes.....	56
2.- Desarrollo experimental.....	59
2.1.- Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich.....	59
2.2.- Síntesis de AuNPs por el método de Brust-Schiffrin.....	60
2.3- Caracterización de AuNPs.....	66
2.4- Preparación y caracterización de sensores electroquímicos.....	69
3.- Resultados y discusión de resultados.....	75
3.1.- Síntesis de AuNPs mediante el método de Turkevich.....	75
3.2.- Síntesis de AuNPs mediante el método de Brust-Schiffrin.....	78



3.3.- Caracterización de AuNPs mediante espectroscopia de absorción Uv-vis.....	99
3.3.1.- Uv-vis de AuNPs obtenidas por el método de Turkevich.....	102
3.3.2.- Uv-vis de AuNPs obtenidas por el método de Brust-Schiffrin.....	103
3.4.- Caracterización de AuNPs mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.....	108
3.5.- Caracterización de AuNPs mediante microscopía electrónica de transmisión.....	115
3.6.- Caracterización de sensores voltamétricos modificados con AuNPs mediante voltametría cíclica.....	121
Capítulo 3. CONCLUSIONES.....	147
Capítulo 4. BIBLIOGRAFÍA.....	151
Capítulo 5. ANEXOS.....	155
1.- Espectros Uv-vis de disolventes y ligandos.....	157
2.- Puesta en marcha de un rotavapor.....	157
3.- Protocolo 1: preparación de muestras sólidas con KBr para análisis en FT-IR.....	158
4.- Protocolo 2: colocación de pastillas de KBr para análisis FT-IR en distintos soportes.....	168
5.- Protocolo 3: preparación de muestras líquidas para análisis FT-IR en distintos soportes.....	171



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de tamaños desde el ångström al centímetro.....	23
Figura 2. Nanociencia, ejemplo de la estructura del grafeno.....	24
Figura 3. Nanotecnología, ejemplo de dispositivo electrónico.....	25
Figura 4. Principales campos de aplicación de la nanotecnología.....	25
Figura 5. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.....	27
Figura 6. Técnicas de fabricación en la nanoescala: top-down y bottom-up.....	28
Figura 7. Copa romana de Licurgo del siglo IV cuyo cristal está formado por nanopartículas de oro y plata.....	30
Figura 8. Paso del espectro de un estado discreto desde el átomo a un estado continuo de bandas del material masivo (<i>bulk</i>).....	31
Figura 9. Efecto de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) en las NPs metálicas.....	32
Figura 10. Espectro Uv-vis normalizado de AuNPs con distintos tamaños en solución acuosa.....	33
Figura 11. Tipos de nanoestructuras formadas con oro.....	36
Figura 12. Mezclas coloidales de AuNPs en fase acuosa mediante el método de Turkevich de distintos tamaños.....	38
Figura 13. Complejo formado entre la dicarboxiacetona y el AuCl.....	38
Figura 14. A) Turkevich: reducción con citrato del AuCl ₄ ⁻ en solución acuosa. B) Brust-Schiffrin: reducción con borohidruro del AuCl ₄ ⁻ en solución orgánica transferida de una fase acuosa mediante un agente de transferencia de fase.....	40
Figura 15. Etapas de formación de las AuNPs con nucleación y crecimiento.....	41
Figura 16. Espectro electromagnético.....	44
Figura 17. Distintos modos de vibración de una molécula triatómica.....	47
Figura 18. Tabla con absorciones de enlaces en el espectro infrarrojo.....	47
Figura 19. A) Fotografía de un TEM. B) Esquema general del interior de un TEM.....	49
Figura 20. Rejilla de cobre con entramado cuadrado para análisis en TEM.....	50



Figura 21. Ejemplo de proceso un electroquímico del NaCl en una celda electrolítica de dos electrodos.....	51
Figura 22. Esquema de configuración de una celda electrolítica de 3 electrodos.....	52
Figura 23. Esquema general de un sensor electroquímico.....	52
Figura 24. Potencial de barrido aplicado de forma triangular en una VC.....	55
Figura 25. Ejemplos de polifenoles.....	56
Figura 26. Estructura molecular del catecol.....	56
Figura 27. Nucleación y crecimiento de AuNPs esféricas funcionalizadas en el método de Brust-Schiffirin.....	61
Figura 28. Estructura molecular del cloruro de oro trihidratado.....	62
Figura 29. Estructura molecular del bromuro de tetraoctilamonio.....	63
Figura 30. Estructura molecular del tolueno.....	63
Figura 31. Estructura molecular del borohidruro de sodio.....	63
Figura 32. Estructura molecular del etanol.....	63
Figura 33. Estructura molecular del 1-dodecanotiol.....	63
Figura 34. Estructura molecular de la glicina.....	63
Figura 35. Estructura molecular del cloroformo.....	64
Figura 36. Estructura molecular del hexano.....	64
Figura 37. Estructura molecular del metanol.....	64
Figura 38. Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1603.....	66
Figura 39. Espectrofotómetro Bruker Tensor 27 FT-IR.....	67
Figura 40. TEM Jeol Jem 1001HR Electron Microscope.....	68
Figura 41. Equipo Mikasa Spincoater 1H-D7.....	69
Figura 42. Potenciostato EG&G instruments 263A.....	69
Figura 43. Material necesario para montar un WE y un CE.....	71
Figura 44. WE y CE tras su montaje.....	71
Figura 45. Material necesario para montar un RE.....	72
Figura 46. Disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado, 0.25 mM.....	75
Figura 47. Disolución acuosa de citrato de sodio dihidratado, 17 mM.....	75
Figura 48. Caso 1: de izquierda a derecha, antes de añadir el citrato de sodio dihidratado y pasados 10 minutos tras añadir el citrato de sodio dihidratado.....	76



Figura 49. Caso 2: de izquierda a derecha, antes de añadir el citrato de sodio dihidratado y pasados 10 minutos tras añadir el citrato de sodio dihidratado.....	77
Figura 50. Degradación de AuNPs obtenidas mediante la síntesis de Turkevich.....	78
Figura 51. Disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado, 30 mM.....	79
Figura 52. Transferencia de fase de los aniones AuCl_4^- de la fase acuosa a la fase orgánica.....	79
Figura 53. Fase orgánica con $\text{AuCl}_4^- \cdot \text{TOAB}$ en tolueno.....	80
Figura 54. Adición del ligando 1-dodecanotiol a las AuNPs en fase orgánica.....	80
Figura 55. De izquierda a derecha, antes de añadir el borohidruro de sodio, instante de cambio y al finalizar la adición del borohidruro de sodio.....	81
Figura 56. Segunda separación de la fase orgánica.....	82
Figura 57. Etapa de concentración de las AuNPs-tiol en el rotavapor.....	83
Figura 58. Volumen final de las AuNPs-tiol tras la etapa de concentración en el rotavapor.....	83
Figura 59. Adición de etanol en las AuNPs-tiol para purificar.....	83
Figura 60. Aspecto de las AuNPs-tiol tras la congelación.....	84
Figura 61. Filtración a vacío en Kitasatos de la mezcla coloidal de AuNPs-tiol.....	84
Figura 62. Aspecto de las AuNPs-tiol en el filtro.....	84
Figura 63. Mezcla coloidal final de AuNPs-tiol en etanol.....	85
Figura 64. Aspecto de las AuNPs-tiol en estado sólido.....	87
Figura 65. Muestras en distintas etapas del proceso (19/10/15, 17:35 horas).....	88
Figura 66. Muestras en distintas etapas del proceso (19/10/15, 17:50 horas).....	88
Figura 67. AuNPs-tiol en estado sólido con capa cerosa al evaporarse a temperatura ambiente.....	89
Figura 68. AuNPs-tiol en estado sólido separadas de la capa cerosa.....	89
Figura 69. AuNPs-tiol en etanol tras congelar.....	90
Figura 70. AuNPs-tiol en metanol tras congelar.....	90
Figura 71. De izquierda a derecha, antes de añadir el borohidruro de sodio, instante de cambio y al finalizar la adición del borohidruro de sodio.....	92



Figura 72. Muestras en las tres etapas durante la adición del agente reductor a las AuNPs-glicina.....	92
Figura 73. Etapa de concentración en el rotavapor de las AuNPs-glicina.....	92
Figura 74. Mezcla coloidal de AuNPs-glicina y aparición de puntos cuánticos.....	93
Figura 75. Puntos cuánticos de AuNPs-glicina adheridos al matraz de destilación de fondo redondo.....	93
Figura 76. Mezcla coloidal AuNPs-glicina en etanol.....	94
Figura 77. Aspecto de las AuNPs-glicina en estado sólido en el matraz de destilación de fondo redondo.....	94
Figura 78. Aspecto de la glicina en el matraz de destilación de fondo redondo.....	95
Figura 79. De izquierda a derecha: AuNPs-tiol y AuNPs-glicina en estado sólido.....	95
Figura 80. Aspecto final de la mezcla coloidal AuNPs-glicina pasado un día.....	96
Figura 81. AuNPs-glicina sólidas a temperatura ambiente.....	97
Figura 82. AuNPs-glicina en tolueno.....	97
Figura 83. AuNPs-glicina en buffer fosfato 0.01 M.....	97
Figura 84. AuNPs-glicina en cloroformo.....	97
Figura 85. AuNPs-glicina en distintos disolventes (buffer fosfato, cloroformo y tolueno) tras ultrasonidos.....	98
Figura 86. AuNPs-glicina en distintos disolventes (buffer fosfato, cloroformo y tolueno) una hora después tras ultrasonidos.....	98
Figura 87. Aspecto de distintas membranas tras filtrar a vacío AuNPs-glicina.....	98
Figura 88. Chequeo parámetros del espectrofotómetro Uv-Vis Shimadzu 1603.....	99
Figura 89. Icono del programa UvProbe 2.43.....	99
Figura 90. Ventana del programa UvProbe 2.43.....	99
Figura 91. Ventana Spectrum Method del programa UvProbe 2.43.....	100
Figura 92. Ventana de chequeo del espectrofotómetro en el programa UvProbe 2.43.....	100
Figura 93. Baseline (línea base).....	101
Figura 94. Ventana Baseline Parameters del programa UvProbe 2.43.....	101
Figura 95. Colocación de las cubetas en el espectrofotómetro, la cubeta de abajo es la muestra y la cubeta de arriba es el blanco.....	101



Figura 96. Espectro Uv-vis con: a) AuNPs de gran tamaño formadas por la adición de 0.2 mL de citrato de sodio dihidratado en fase acuosa. b) AuNPs de pequeño tamaño formadas por la adición de 1 mL de citrato de sodio dihidratado en fase acuosa.....	102
Figura 97. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en etanol sin diluir. b) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en cloroformo con dilución de cloroformo al 50%.....	104
Figura 98. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de fase orgánica de AuCl ₄ -TOAB en tolueno al 25% b) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en tolueno al 25%. c) 3 mL de AuNPs-tiol tras la etapa de reducción con BHNA al 25%. d) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol antes de congelar al 25%. e) 3 mL de AuNPs-tiol finales en etanol al 25%.....	105
Figura 99. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol al 33%. b) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol al 25%. c) 3 mL de AuNPs-tiol en metanol al 33%. d) 3 mL de AuNPs-tiol en metanol al 25%.....	106
Figura 100. Espectro Uv-vis con 3 mL de AuNPs-glicina en etanol sin diluir.....	107
Figura 101. Espectro Uv-vis comparativo entre AuNPs-tiol finales en distintos disolventes (cloroformo, etanol, metanol) y AuNPs-glicina en etanol en 3 mL cada muestra.....	108
Figura 102. Pastillas de KBr con AuNPs-tiol en el desecador.....	109
Figura 103. Espectro por FT-IR de 3 gotas de 1-dodecanotiol.....	110
Figura 104. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 3 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en cloroformo.....	111
Figura 105. Espectro por FT-IR de 3 gotas de cloroformo.....	111
Figura 106. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 3 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en hexano.....	112
Figura 107. Espectro por FT-IR de 3 gotas de hexano.....	113
Figura 108. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 5 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en etanol.....	114
Figura 109. Espectro por FT-IR de 3 gotas de etanol.....	114
Figura 110. De izquierda a derecha, deposición de AuNPs sobre rejilla de cobre para análisis en TEM y aspecto de la rejilla de cobre tras depositar AuNPs.....	116
Figura 111. Caja para 50 rejillas de TEM.....	116
Figura 112. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 250000X.....	117
Figura 113. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 400000X.....	117



Figura 114. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 1000000X.....	118
Figura 115. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 150000X.....	119
Figura 116. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 1000000X.....	120
Figura 117. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 800000X.....	120
Figura 118. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 50000X.....	121
Figura 119. Sensores modificados con AuNPs-tiol mediante spincoating.....	123
Figura 120. Celda electroquímica montada con 3 electrodos y toma de nitrógeno.....	124
Figura 121. Icono del programa CorrWare.....	125
Figura 122. Ventana inicial del programa CorrWare.....	125
Figura 123. Ventana Setup Cell del programa CorrWare.....	126
Figura 124. Ventana Setup Open Circuit Experiment del programa CorrWare.....	126
Figura 125. Ventana Setup Cyclic Voltammogram Experiment del programa CorrWare.....	127
Figura 126. Voltamograma del sensor sin modificar sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.....	128
Figura 127. Voltamograma del sensor sin modificar sumergido en 50 mL de disolución de catecol 10^{-3} M.....	128
Figura 128. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs de Turkevich sumergido en 50 mL de disolución de catecol 10^{-3} M.....	129
Figura 129. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.....	130
Figura 130. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en metanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.....	131
Figura 131. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en cloroformo, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.....	132
Figura 132. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de catecol 10^{-3} M.....	133
Figura 133. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en cloroformo, sumergido en 50 mL de catecol 10^{-3} M.....	134



Figura 134. Voltamogramas solapados del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M. Estudio cinético de velocidad de barrido de 25 mV/s a 200 mV/s.....135

Figura 135. Ajustes lineales de gráficas para el estudio cinético en el pico de oxidación.....137

Figura 136. Ajustes lineales de gráficas para el estudio cinético en el pico de reducción.....138

Figura 137. Voltamogramas solapados del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de catecol para el estudio de límites de detección.....140

Figura 138. Ajustes lineales de gráficas para el estudio del límite de detección de onda anódica y catódica del sensor modificado con AuNPs-tiol.....142

Figura 139. Voltamogramas solapados del sensor sin modificar, sumergido en 50 mL de catecol para el estudio de límites de detección.....143

Figura 140. Ajustes lineales de gráficas para el estudio del límite de detección de onda anódica y catódica del sensor sin modificar.....144

Figura 141. Espectro Uv-vis con 3 mL de distintos disolventes y ligandos.....157

Figura 142. Esquema típico de un rotavapor.....157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores obtenidos de las intensidades correspondientes a cada velocidad de barrido del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio cinético.....136

Tabla 2. Valores obtenidos de las intensidades correspondientes a cada velocidad de barrido del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio cinético.....138

Tabla 3. Concentraciones de disolución de catecol seleccionadas para el estudio de los límites de detección.....139

Tabla 4. Cálculo de la desviación típica de la respuesta del sensor modificado con AuNPs-tiol en buffer fosfato para el estudio de los límites de detección.....141

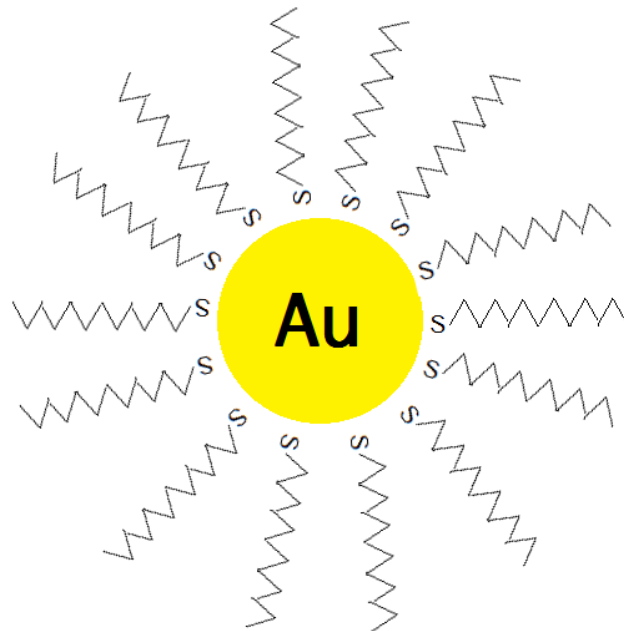
Tabla 5. Valores obtenidos del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio de los límites de detección.....142

Tabla 6. Valores obtenidos del sensor sin modificar para el estudio de los límites de detección.....144



ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Energía cuántica de un fotón.....	44
Ecuación 2. Ley de Lambert-Beer.....	45
Ecuación 3. Límite de detección.....	140



Capítulo 1. Justificación y objetivos.





El trabajo de investigación llevado a cabo en este proyecto, se encuadra dentro de las líneas de investigación propias llevadas a cabo por el grupo UVaSens perteneciente al departamento de Química-Física y Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid.

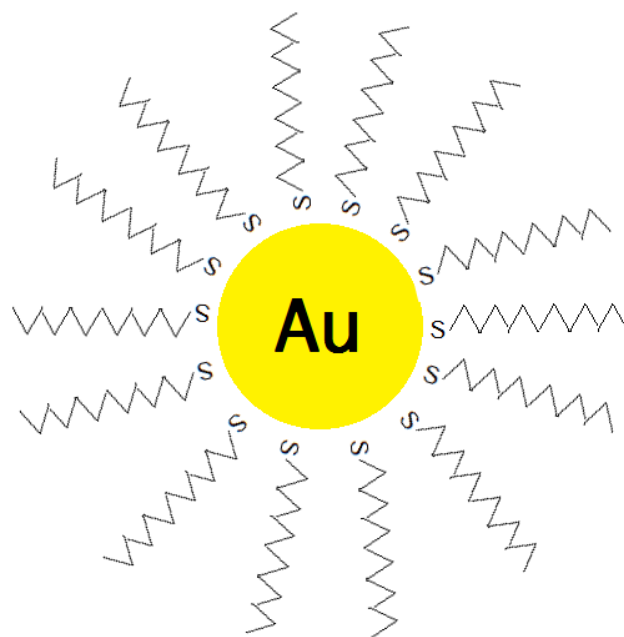
El grupo UVaSens, se compone de un equipo multidisciplinar de científicos de distintas ramas de la ciencia y de la tecnología cuyas líneas de investigación están dirigidas al desarrollo y diseño de sensores.

UVaSens lleva años trabajando con éxito y reconocimiento en el desarrollo de sensores químicos y en concreto en el caso de sensores voltamétricos modificados con películas nanoestructuradas, como pueden ser las nanopartículas (NPs) metálicas y de óxidos metálicos. Hasta la fecha se han estado desarrollando en UVaSens, sensores modificados con NP metálicas sin compuestos funcionalizantes, a día de hoy, se pretende abrir, nuevas líneas de investigación para obtener sensores con nuevas propiedades. Debido a ello, este proyecto ha abordado una nueva síntesis de AuNPs funcionalizadas las cuales posteriormente se han empleado en sensores voltamétricos.

Objetivos:

- Sintetizar AuNPs esféricas funcionalizadas con un alcanotiol en un sistema bifásico líquido-líquido mediante el método de Brust-Schiffrin.
- Mejorar y adaptar el método de Brust-Schiffrin para obtener AuNPs funcionalizadas adecuadas a los requerimientos para su aplicación en sensores voltamétricos.
- Caracterizar estas nuevas AuNPs funcionalizadas mediante espectroscopia Uv-vis, espectroscopia infrarroja de absorción y microscopía de transmisión electrónica.
- Desarrollar sensores electroquímicos voltamétricos con estas AuNPs funcionalizadas analizando así su capacidad y sensibilidad en el análisis de antioxidantes alimentarios.
- Caracterizar estos sensores mediante voltametrías cíclicas (VC), estudiando los límites de detección del sensor en presencia de antioxidantes para conocer la mínima concentración a la que el sensor es capaz de detectar el antioxidante, así como realizar un estudio cinético del sensor para poder determinar el mecanismo controlante del proceso.





Capítulo 2. Desarrollo.



1.- ESTADO DEL ARTE:

1.1- Nanociencia y nanotecnología:

La etimología del prefijo nano, procede del griego y significa 'diminuto'. Dicho prefijo hace referencia a la milmillonésima parte de un metro, por tanto, 1 nm son 10^{-9} m.

Algunas visualizaciones de esta escala submicroscópica pueden ser las siguientes: un único átomo es la quinta parte del nanómetro, lo que significa que cinco átomos consecutivos suman un nanómetro, o por ejemplo, el ancho de un cabello humano mide entre cincuenta y cien mil nanómetros.

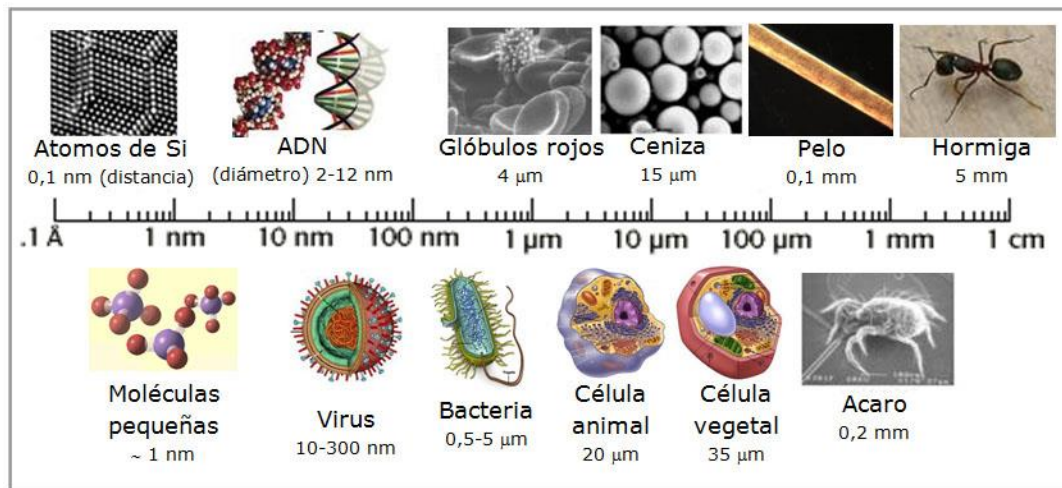


Figura 1. Escala de tamaños desde el ángström al centímetro.

La nanociencia y nanotecnología trabajan por tanto con nanomateriales, que son aquellos donde al menos una de sus dimensiones debe ser inferior a los 100 nm (1).

En 1959, el físico ganador del premio Nobel, Richard Feynman, vaticinaba en un ensayo titulado 'There is plenty of room at the bottom' ('Aún hay mucho espacio en el fondo') que existiría una gran cantidad de descubrimientos si el hombre pudiera fabricar materiales de dimensiones atómicas o moleculares. Sin embargo, a pesar de ser el primer científico en hablar de nanociencia, Richard Feynman nunca llegó a trabajar en dicho campo ni conocer el nombre de esta emergente disciplina.

En aquel momento, Richard Feynman, ofreció un premio de mil dólares a quien escribiera la información que cabe en una cuartilla, en una superficie veinticinco mil veces menor, así como otro premio para quien construyera un motor del tamaño de un cubo de menos de diez micras de lado.

El segundo premio se logró, al año siguiente, de la mano de un mecánico, mientras que el primer premio se logró en 1985 por un estudiante de doctorado de la Universidad de Stanford (2).

Tiempo después, en torno a los años 80, aparecieron nuevas técnicas experimentales que convirtieron rápidamente a la nanociencia en un importante campo científico, entre estas técnicas, se puede hablar de la microscopía de barrido con efecto túnel (STM, del inglés *Scanning Tunneling Microscope*) o la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscope*), que permitieron observar los materiales a escala atómica y, después, poder manipular átomos individuales. Este conjunto de microscopios, se conocen como microscopios de campo cercano (SPM, del inglés *Scanning Probe Microscope*) (1).

Las nuevas técnicas microscópicas aparecen debido a que los microscopios ópticos convencionales no son útiles en nanociencia por mucho que se mejoren técnicamente, ya que trabajan con la longitud de onda de la luz y su resolución está restringida por el límite de difracción en el rango de micras y no de nanómetros como es en este caso, y por ello se hizo necesario el desarrollo de nuevos microscopios.

La nanociencia es por tanto, la ciencia que trata de la obtención y estudio de las propiedades de los nanomateriales.

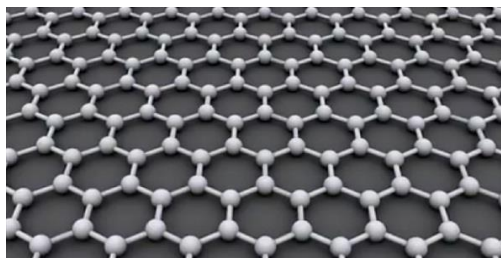


Figura 2. Nanociencia, ejemplo de la estructura del grafeno.

En cambio, la nanotecnología se puede definir como la aplicación práctica de la nanociencia. Aborda el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas de control de forma y tamaño nanométricos. La nanotecnología, brinda la posibilidad de manipular la materia con átomos (1).

La nanociencia y la nanotecnología, son dos caras de la misma moneda, son necesarios avances tecnológicos para seguir investigando nanociencia, y también son necesarios avances en nanociencia para seguir creando nanotecnología.

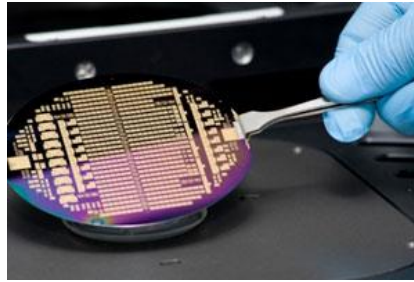


Figura 3. Nanotecnología, ejemplo de dispositivo electrónico.

El término nanotecnología, se originó en 1974 gracias al profesor Norio Taniguchi, de la Tokyo University of Science, en un artículo titulado ‘*On the Basic Concept of Nanotechnology*’ (‘*Sobre el Concepto Básico de la Nanotecnología*’) donde se describía la fabricación de materiales con precisión nanométrica (2).

El ejemplo más claro y representativo del éxito de la nanotecnología, es la electrónica, pero no sólo es la única beneficiaria, también, se producen nanopartículas (NPs) de sílice para mejorar las propiedades del cemento, existen pinturas con NPs para aumentar su resistencia al rayado, existen tejidos nanoestructurados que repelen manchas o bacterias, así como en el mundo de la cosmética, las NPs de óxido de titanio o de zinc que bloquean los rayos ultravioletas.

A pesar, de los múltiples campos donde actúa o puede actuar la nanotecnología, se pueden destacar seis grandes grupos donde presenta un mayor impacto: química, física, ingeniería, informática, biología y medicina (1).

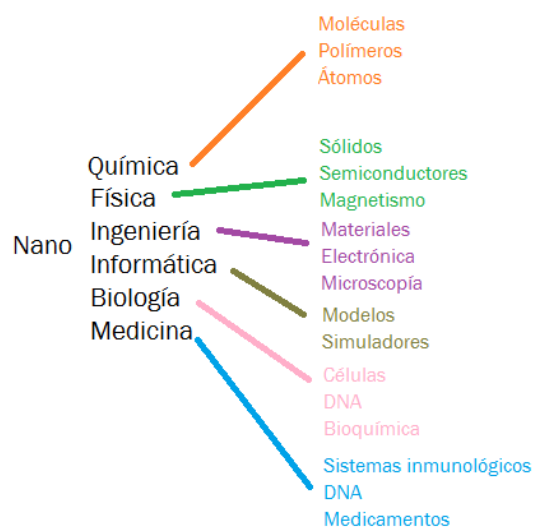


Figura 4. Principales campos de aplicación de la nanotecnología.



Actualmente, la mayoría de las aplicaciones emplean nanomateriales cuyo papel es fundamentalmente pasivo, ya que se emplean para mejorar las prestaciones de otros materiales existentes. Uno de los retos de las investigaciones actuales, consiste en dar al elemento '*nano*' un papel más activo como por ejemplo en el desarrollo de sensores con NPs.

A pesar de que sólo hace apenas una década de la materialización de la revolución de este nuevo campo científico, hoy existen cerca de tres mil productos generados con nanotecnología. Por lo que esta disciplina se muestra hoy en día como una potente herramienta capaz de transformar la sociedad (1).

Aunque conviene resaltar que actualmente este campo se encuentra aún en una etapa principalmente científica a pesar del amplio abanico de productos que se van generando, pero con el paso del tiempo, ya se comienzan a observar más aplicaciones nanotecnológicas eminentemente activas, sin olvidar que aún queda mucho por descubrir.

Un aspecto sustancial tanto de la nanociencia como de la nanotecnología es su ambiente multidisciplinar, así como su carácter convergente. Su ambiente multidisciplinar, es debido a la presencia de físicos, químicos e ingenieros, los cuales son los científicos y profesionales más directamente relacionados con estas disciplinas. El carácter convergente se debe a la importancia de señalar la fuerte interacción con las tecnologías de la información y comunicación, ciencia de materiales, medicina, farmacia, etc., lo que confiere tanto a la nanociencia como a la nanotecnología en disciplinas cada vez más extensas y de mayor impacto.

1.1.1.- Clasificación de los nanomateriales:

Una clasificación muy frecuente de los nanomateriales es en base a sus dimensiones o a la de alguno de sus componentes, generándose cuatro categorías, donde su nomenclatura, en este caso, indica cuántas dimensiones superan la nanoescala, es decir, los 100 nm: 0D (cero dimensiones), 1D (una dimensión), 2D (dos dimensiones) y 3D (tres dimensiones).

Como se observa, no se debería considerar nanomaterial, aquellos situados en la clasificación 3D (ya que todas sus dimensiones superan los 100 nm), pero se pueden considerar nanomateriales si están formados a partir de estructuras 0D, 1D o 2D replicándose en las tres dimensiones del espacio de una forma ordenada (3).

Esto significa que los materiales de 0D tienen todas sus dimensiones por debajo de los 100 nm, donde destacan las NPs, los fullerenos, los puntos cuánticos (QDs, del inglés *Quantum Dots*), los clústeres, etc. En los materiales de 1D, una dimensión supera los 100 nm y destacan los nanotubos o fibras poliméricas entre otros. Para 2D, hay dos dimensiones que superan los 100 nm y destacan las películas delgadas o nanorecubrimientos y en 3D, las tres dimensiones superan los 100 nm y se pueden encontrar materiales estructurados como policristales o composites.

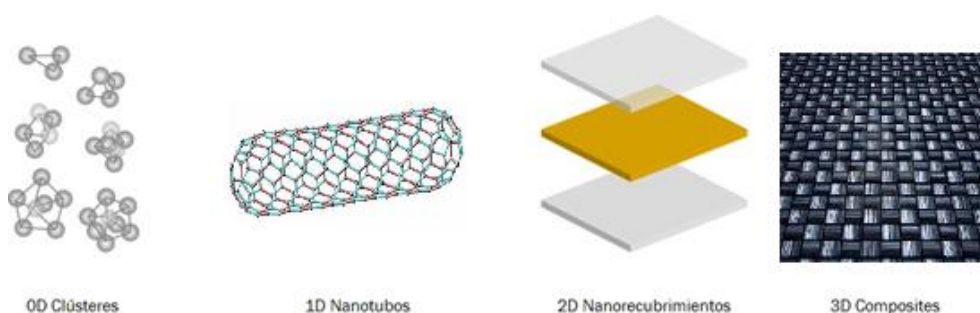


Figura 5. Clasificación de los nanomateriales según sus dimensiones.

Pero esta no es la única clasificación de los nanomateriales, también, se pueden clasificar por su naturaleza química (orgánico, inorgánico o mixto), por su procedencia (natural o artificial) o por su tamaño.

Conviene destacar que, nanomateriales idénticos son aquellos que poseen la misma composición química, así como la misma dimensión, ya que normalmente nanomateriales de la misma composición química, pero diferentes dimensiones, presentan propiedades completamente diferentes.

Existen tres razones principales por las que un material nanométrico se comporta de modo diferente a uno macroscópico (1):

- Cuanto menor es el tamaño, se accede más fácil a lugares pequeños.
- A medida que se reduce el tamaño, la importancia de su superficie en relación con su volumen aumenta, ya que en proporción, el área de la superficie disminuye menos que el volumen, y se convierten los elementos más en 'superficie', es decir, hay más átomos en la superficie y esto repercute directamente en las propiedades electrónicas, magnéticas, mecánicas, físicas, químicas u ópticas, como se verá más adelante.

- Las propiedades electrónicas de un nanomaterial, por tanto, no se rigen por la mecánica 'clásica' del mundo macroscópico, sino por la mecánica cuántica, donde el tamaño de un material afecta profundamente a sus propiedades. Por ejemplo, en el caso del oro, el cual es un material considerablemente inerte y estable, se vuelve reactivo cuando se reduce su tamaño a unos nanómetros, pero en cambio, su actividad química vuelve a disminuir por debajo de los tres nanómetros aproximadamente.

1.1.2.- Técnicas de fabricación de la nanociencia y nanotecnología:

Existen dos grandes grupos, técnicas *top-down* (descendente) donde se parte de una material grande o a granel (*bulk*) para obtener uno pequeño y técnicas *bottom-up* (ascendente) que consiste en ir de lo pequeño a lo grande, partiendo normalmente de átomos (1).

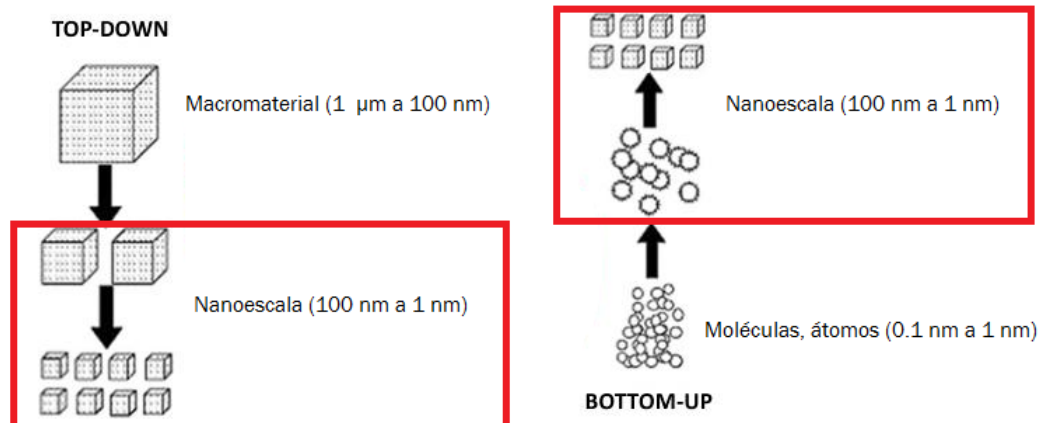


Figura 6. Técnicas de fabricación en la nanoescala: top-down y bottom-up.

Top-down: se realiza fundamentalmente por métodos físicos, destacan las técnicas de molienda, desgaste o litográficas/fotolitográficas, donde se adelgaza un material hasta su forma final mediante haces de electrones, iones o fotones (1).

Bottom-up: actualmente se centran en metodologías químicas, algunas de ellas son:

- PVD (del inglés, *Physical Vapor Deposition*) o MBE (del inglés, *Molecular Beam Epitaxy*), donde los átomos se obtienen de sublimar desde un material de partida.



- CVD (del inglés, *Chemical Vapor Deposition*) que consiste en obtener átomos a partir de la descomposición de moléculas que forman un gas y se reordenan en una superficie para obtener otro material.
- Reacciones químicas de nucleación con posterior crecimiento para promover la formación de clústeres (agrupaciones de unos pocos átomos) (3).
- Técnicas de autoensamblado molecular, donde se aprovecha la propia capacidad de las moléculas para establecer enlaces no covalentes, autoensamblándose hasta formar compuestos de mayor tamaño o depositarse en superficies ordenadas.

También, existen técnicas biológicas, las cuales no son objetivo del presente proyecto y por tanto no se profundizará en su estudio.

1.2.- NPs metálicas y sus propiedades:

Según la IUPAC (*'Unión Internacional de Química Pura y Aplicada'*), una NP es una partícula cuyo tamaño se mide en nanómetros, a menudo, también se llaman partículas nanométricas.

El término NP metálica designa a una agrupación de átomos o moléculas metálicas, de óxidos metálicos o sales metálicas que dan lugar a una partícula con dimensiones entre 1 y 100 nm y con nuevas propiedades respecto al material masivo (*bulk*).

Las NPs metálicas se pueden producir de distintos tamaños y formas, así como funcionalizarse, esto es que pueden recubrirse por capas exteriores de diversos compuestos de distinta procedencia en forma de monocapa o multicapa y así ofrecer nuevas características de gran interés para posibles aplicaciones tecnológicas, es decir, formar autoensamblados moleculares. Además, estos compuestos funcionalizantes contribuyen a la estabilización de la NP como consecuencia del aumento de la relación superficie/volumen que vuelve inestable a la NP. Este aspecto, se profundizará posteriormente.

Desde la antigüedad ya se han usado NPs sobre todo de metales nobles como el oro, la plata o el cobre con fines principalmente decorativos. Se puede encontrar la presencia de NPs en copas y vasijas del Imperio Romano, destaca la copa de Licurgo (siglo IV), la cual presenta un color verde con luz reflejada y un color rojo con luz transmitida debido a la presencia de una aleación de NPs de oro (30%) y plata (70%) de unos 70 nm en su cristal.

También, está el caso de vidrieras de muchas catedrales, donde se aprovechaban las propiedades ópticas de las NPs, para obtener una gran diversidad de colores.

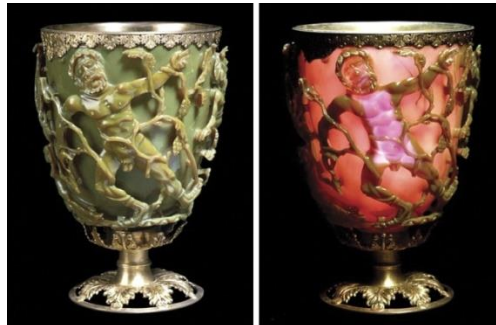


Figura 7. Copa romana de Licurgo del siglo IV cuyo cristal está formado por nanopartículas de oro y plata.

Pero no fue hasta el siglo XIX cuando Michael Faraday determinó que suspensiones coloidales de oro preparadas por reducción química en concentraciones diferentes, presentaban distintas coloraciones debido a una variación en el tamaño de estas. Este fenómeno observado y estudiado por Michael Faraday, no se culminó con una completa explicación hasta el siglo XX.

Se emplea la palabra '*coloide*' (Thomas Graham, 1861) para describir ciertas soluciones que presentan velocidades de difusión muy lentas y/o incapacidad para atravesar una membrana semipermeable. Por tanto, son aquellos sistemas en los que un componente se encuentra disperso en otro, siendo la proporción de NPs dispersas mucho mayor que la de moléculas del disolvente.

Los coloides, se componen por tanto de NPs individuales más grandes que las dimensiones atómicas, pero lo suficientemente pequeñas para exhibir movimiento browniano (movimiento aleatorio de partículas en un medio fluido).

Se pueden destacar dos propiedades significativas en el caso de NPs metálicas, una de ellas (anteriormente comentada), es que la relación superficie/volumen aumenta, lo que conlleva a un aumento considerable de la reactividad química. Este fenómeno provoca una aglomeración de las NPs como mecanismo para disminuir su energía superficial, ya que esta energía, se encuentra en exceso en comparación con la energía de formación de las NPs, convirtiéndose en compuestos termodinámicamente inestables.

La otra propiedad, se basa en que los efectos cuánticos se realzan debido al efecto del confinamiento cuántico que modifica las propiedades de electrones y huecos. Por ello las NPs adoptan unas propiedades químicas, ópticas, eléctricas, térmicas y magnéticas únicas (3).

El estudio concreto de NPs metálicas de tamaño inferior a 3 nm, resulta de gran interés debido a que estos clústeres, constituidos por unos cientos de átomos, presentan la particularidad de que su carácter metálico se pierde paulatinamente a medida que el tamaño de la NP metálica disminuye, haciéndose más patente el carácter molecular de esta (4).

Para comprender mejor cómo cambian las propiedades electrónicas de un material metálico al reducir su tamaño, hay que analizar los niveles electrónicos. Se sabe, que la distancia entre los estados energéticos contiguos, aumenta de manera inversa al aumentar el volumen de las partículas. Esto lleva a que el espectro continuo de bandas (que refleja la situación del material masivo *bulk*), cambie a un conjunto de estados discretos al disminuir el tamaño hasta la escala nanométrica, esto se debe a que las NPs metálicas no pueden ser tratadas como elementos diminutos de un bloque de metal, y la banda de conducción presente en un metal (*bulk*), está ausente en estos sistemas y por tanto, se dan los estados discretos de banda.

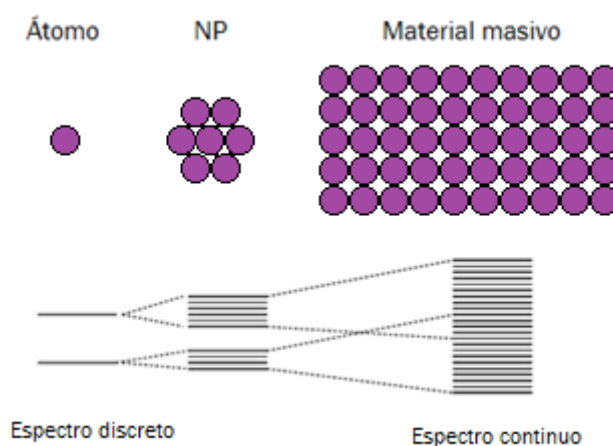


Figura 8. Paso del espectro de un estado discreto desde el átomo a un estado continuo de bandas del material masivo (*bulk*).

Como consecuencia del cambio del espectro a un estado discreto, se producen profundas modificaciones en las propiedades físicas que dependen como puede verse, de los electrones, como ocurre en el caso de las propiedades ópticas o magnéticas (5) (6).

Queda de manifiesto que los electrones en esta situación sufren un confinamiento a un número finito de estados energéticos cuánticos disponibles, mostrando las propiedades de los puntos cuánticos (QDs). La palabra ‘cuántico’ enfatiza las propiedades ópticas y electrónicas inesperadas de las NPs, mientras que el término ‘punto’ se refiere a que el confinamiento se da en las tres dimensiones.

Además, las NPs metálicas no presentan un enlace metálico bien definido, sino que suelen ser aglomeraciones de átomos rodeados de una capa estabilizadora para evitar su aglomeración debida al aumento de la energía superficial.

Al cambiar las propiedades electrónicas, las propiedades ópticas cambian ya que dependen de los estados electrónicos. En concreto, las NPs metálicas, se caracterizan por la resonancia del plasmón de superficie (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*).

La resonancia del plasmón de superficie, consiste en una oscilación colectiva de los electrones de conducción libres como resultado de su interacción con la radiación electromagnética (luz visible). El campo eléctrico de la radiación electromagnética induce a la formación de un dipolo en la NP, creándose en esta una fuerza restauradora para compensar el efecto del dipolo producido, resultando en una longitud de onda de resonancia que confiere el color tan característico de las disoluciones coloidales de las NPs metálicas (8).

La oscilación dipolar, está en resonancia con la radiación incidente a una frecuencia específica que dependerá del tamaño y forma de las NPs metálicas.

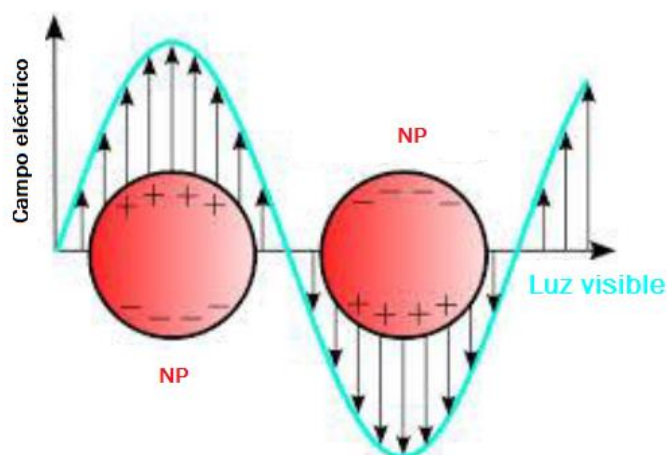


Figura 9. Efecto de la resonancia del plasmón de superficie (SPR) en las NPs metálicas.

Estos coloides de NPs de metálicas, y en especial de NPs de metales nobles, muestran colores visibles y por tanto poseen un plasmón en la región espectral visible. La figura 10, muestra un conjunto típico de espectros Uv-vis normalizados para diferentes tamaños de AuNPs (nanopartículas de oro). Tal y como se observa, la longitud de onda del plasmón, claramente depende del tamaño de la AuNP.

Además, la correlación de tamaños y longitud de onda del plasmón se logró analizar con la teoría de Mie, que consiste en una ecuación que depende de distintos parámetros como el coeficiente de extinción, la concentración o la constante dieléctrica del medio para el caso de NPs esféricas (3).

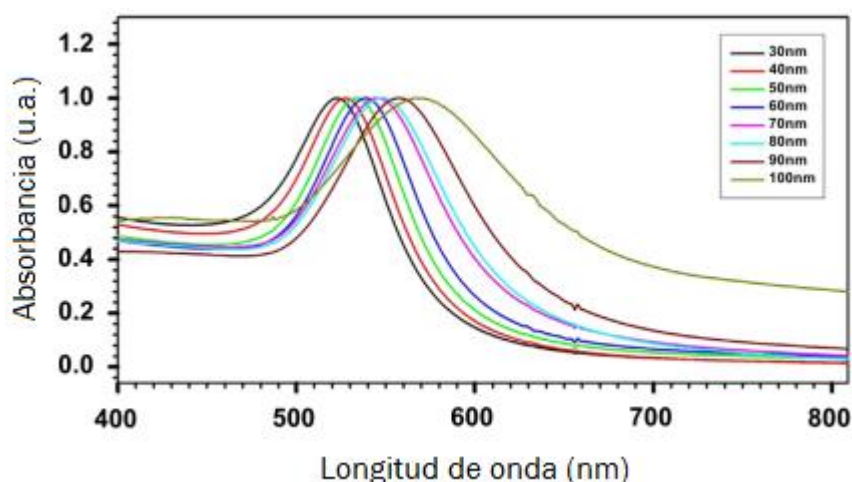


Figura 10. Espectro Uv-vis normalizado de AuNPs con distintos tamaños en solución acuosa.

El caso de las NPs de metales nobles, y especialmente las AuNPs, presentan unas propiedades físicas, químicas, biológicas, eléctricas, ópticas, catalíticas y de reconocimiento molecular, excepcionales, lo que justifica su síntesis en este proyecto. Estas novedosas propiedades son inherentes a su tamaño nanométrico y no son equivalentes al material masivo *bulk* ni al átomo por separado (9). Esto hace que las AuNPs se puedan usar en múltiples aplicaciones tecnológicas debido a sus propiedades únicas, además de ser las NPs metálicas más estables que se conocen actualmente.

Una peculiar propiedad que poseen las AuNPs es su capacidad fototérmica, ya que al incidir luz láser se 'activan', desprendiendo calor, lo que, por ejemplo, les confiere un futuro esperanzador como agentes fototerapéuticos en el tratamiento del cáncer (3).



Gracias a la resonancia del plasmón de superficie (SPR), las AuNPs también poseen unas propiedades ópticas únicas, así como una mejora del campo electrónico de su superficie (3).

Otra propiedad interesante en las AuNPs es la patente sensibilidad a los cambios en el medio ambiente donde se encuentra, a la variación de su tamaño o al cambio de forma de estas (10).

Al igual, que en el resto de NPs, en las AuNPs, al aumentar la relación superficie/volumen se vuelven más reactivas y tienden a la aglomeración para disminuir su energía superficial y este es un aspecto crucial en la síntesis química coloidal, ya que se debe lograr la estabilización de las AuNPs en el medio de dispersión.

Esta tendencia a la aglomeración de las NPs, encuentra su explicación en que si se tienen NPs separadas a una pequeña distancia, pueden ser atraídas entre sí por fuerzas de Van der Waals. En ausencia de fuerzas repulsivas que contrarresten a las de Van der Waals, las NPs se aglomeran y la dispersión se vuelve inestable. Las fuerzas de Van der Waals que actúan entre NPs coloidales son del mismo tipo que las que actúan entre átomos, moléculas o iones, pero debido a la gran cantidad de átomos que contiene cada NP, son de mayor magnitud y actúan a mayores distancias, lo que hace tan crucial el lograr la estabilización de la suspensión coloidal (6), ya que las NPs deben ser estables tanto termodinámicamente como cinéticamente por medio de agentes protectores, que son capaces de superar las fuerzas atractivas de Van der Waals que existen entre las NPs por medio de fuerzas repulsivas electroestáticas y estéricas.

Además, los átomos o moléculas que se encuentran en la superficie de un material experimentan un entorno diferente a aquellos que están en el seno del material, y por tanto, tienen diferente energía, estados electrónicos, reactividades, etc., tendiendo así a la atracción por fuerzas de Van der Waals (11).

Otra propiedad de las AuNPs (entre otras NPs) es su posibilidad de funcionalizarse (autoensamblados moleculares) con distintos ligandos, así, se estabiliza la disolución coloidal frente a la aglomeración y se obtienen AuNPs con nuevas propiedades.

Las NPs mixtas o funcionalizadas se pueden definir como nanomateriales organizados que consisten en dos o más tipos de nanocompuestos individuales (13). Estos nanocompuestos se pueden unir a través de puentes moleculares orgánicos o inorgánicos. Las AuNPs funcionalizadas mejoran las propiedades superficiales de las AuNPs sin funcionalizar debido a su alto ordenamiento.



La funcionalización de NPs metálicas con ligandos orgánicos es una práctica muy común, usándose además como agentes estabilizantes de cadena alquílica larga con grupos funcionales como tioles, carboxilatos, fosfinas o aminas, pero no todos tienen la misma afinidad, los tioles son los más afines, seguido de aminas, fosfitos y bisulfitos. La funcionalización impide por tanto, la agregación de las NPs en disolventes orgánicos y se abre la posibilidad de ejercer un control en el tamaño, forma y monodispersidad (distribución estrecha de tamaños) de estas (8).

Cabe resaltar por tanto, que la funcionalización más interesante es la de AuNPs con tioles, las cuales poseen multitud de aplicaciones tecnológicas como en microelectrónica, materiales magnéticos, reconocimiento molecular, dispositivos ópticos, etc. y por ello son las sintetizadas en este proyecto.

1.3.- Síntesis de NPs metálicas:

Como se expuso anteriormente, se pueden seguir las dos técnicas existentes de fabricación: top-down y bottom-up.

La síntesis de NPs metálicas se realiza principalmente por técnicas *bottom-up*, las cuales se pueden clasificar en químicas y en biológicas.

En este caso, se emplearán las técnicas químicas ya que son las más utilizadas por excelencia en la síntesis de NPs metálicas y las que presentan un mayor número de modificaciones en sus procedimientos. Entre las técnicas químicas, se pueden encontrar la síntesis electroquímica, la descomposición térmica, fotoquímica o sonoquímica, la deposición del metal en fase vapor, la reducción química de una sal metálica, etc.

En la síntesis de AuNPs, actualmente los esfuerzos se centran en controlar el tamaño, forma, estructura y propiedades de las AuNPs para posteriormente implementarlo en aplicaciones tecnológicas y es en esta etapa donde tiene que resaltar la habilidad del investigador para diseñar autoensamblados de AuNPs multifuncionales para reconocimiento químico o biológico, o para la aplicación pertinente en cada caso.

Por tanto, en el caso del diseño de sensores químicos o biológicos, la capacidad de reconocimiento molecular de las AuNPs así como sus propiedades electrónicas constituyen un punto de estudio muy interesante.

Las AuNPs, al igual que otras NPs, se pueden obtener con diferentes geometrías o disposiciones. Normalmente se obtienen por síntesis coloidal, dando lugar por ejemplo a NPs esféricas mediante técnicas de reducción química de una sal metálica.

Pero también, existen otros métodos como técnicas de síntesis electroquímica o deposición electroquímica de oro en el interior de los poros de plantillas de policarbonato o alúmina, que permiten obtener AuNPs con forma de nanocilindro o técnicas de recubrimiento de sílica que permiten obtener nanocubiertas, etc.

En el caso de este proyecto, la síntesis de las NPs se abordará mediante el método coloidal con reducción química de una sal metálica para obtener AuNPs esféricas.

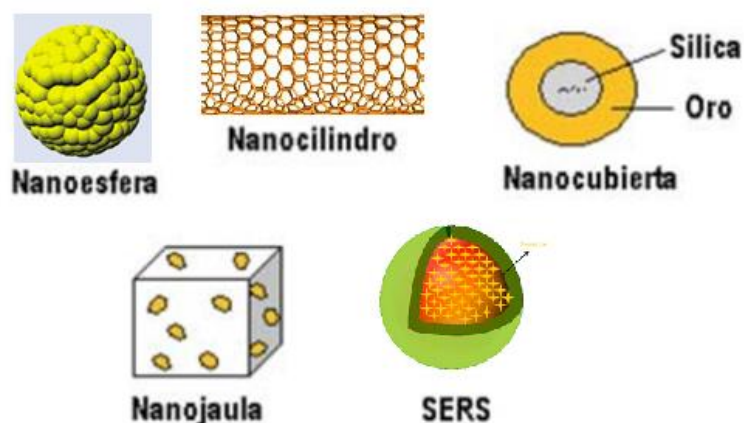


Figura 11. Tipos de nanoestructuras formadas con oro.

Debido al claro interés que presentan las AuNPs, se han ido generando numerosos artículos a lo largo de los años, con multitud de rutas diferentes, donde las AuNPs finales tienen por tanto diferentes características. El número de artículos se ha incrementado especialmente en la última década (1). El presente proyecto, se centrará en los artículos recientes de obtención de AuNPs esféricas.

El método más común en la síntesis de AuNPs esféricas es por reducción química de una sal metálica al átomo metálico cerovalente y quien publicó el método por primera vez fue Michael Faraday en 1957, el cual provocó la reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a unas AuNPs de tamaño muy pequeño. La principal ventaja del método de Faraday es su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides altamente monodispersos.

Cuando se forman AuNPs esféricas, se reduce la sal metálica y a continuación, estos átomos metálicos actúan como centros de nucleación dando lugar a clústeres cuyo crecimiento continúa a medida que se mantenga el suministro de átomos, formándose así las AuNPs, las cuales son sólo estables cinéticamente, por ello se hace necesario estabilizar las AuNPs con moléculas que se absorben en su superficie y prevenir así su aglomeración (6).



Un factor también importante durante la formación de las AuNPs, además del agente estabilizador para prevenir la aglomeración, es la relación reductor/oro y la velocidad de adición del reductor, ya que influyen directamente en el tamaño final de las AuNPs, ya que a mayor velocidad de adición, se favorece la nucleación y se obtienen AuNPs más pequeñas y monodispersas, mientras que a menor velocidad de adición, se suprime o inhibe la nucleación y se obtienen AuNPs más grandes y polidispersas (mayor distribución de tamaños). Pero la adición paso a paso del agente reductor es más efectiva, que la adición en un solo paso (3).

La formación de NPs metálicas de tamaño uniforme se logra, en muchos casos, con una combinación de una baja concentración de soluto de un complejo o sal metálica como precursor, un agente reductor y una monocapa de un agente estabilizante, para evitar la aglomeración, adherido durante el crecimiento de la NP metálica.

Por tanto, en los procesos de síntesis de NPs, las sustancias que actúan como estabilizadores para evitar la aglomeración, controlan tanto la velocidad de reducción de los iones metálicos como el proceso de agregación de los átomos metálicos ya que neutralizan las fuerzas electroestáticas.

Actualmente, existen dos estrategias para la síntesis coloidal de AuNPs evitando su aglomeración: estabilización con citrato y estabilización con alcanotioles. Ambas estrategias son métodos adecuados y suficientes para la mayoría de aplicaciones tecnológicas (2).

Por lo tanto, se comenzará por el método de Turkevich desarrollado en 1951 para preparar disoluciones coloidales de oro obteniendo AuNPs esféricas.

1.3.1.- Síntesis de AuNPs en fase acuosa. Método Turkevich:

Para la síntesis de NPs en fase acuosa, se pueden emplear multitud de agentes reductores, así como de agentes estabilizantes. La mayoría de los métodos actuales en fase acuosa son variaciones del método de Turkevich (10).

El método de Turkevich, consiste en un mecanismo de crecimiento de agregación formado por una nucleación y un posterior crecimiento.

El método original obtiene AuNPs de 20 nm a partir de la reducción de los aniones cloroáuricos (AuCl_4^-) en una solución acuosa con citrato sódico.

En 1973, Frenz (10) obtiene AuNPs entre 17 y 147 nm variando la concentración del citrato. Para ello, provoca la reducción de 95 mL de disolución acuosa de oro con 5 mL de citrato de trisodio a 100°C y con vigorosa agitación. El citrato se añade cuando comienza la ebullición y no antes. Pasados unos 15 minutos, la mezcla se enfría a temperatura ambiente.

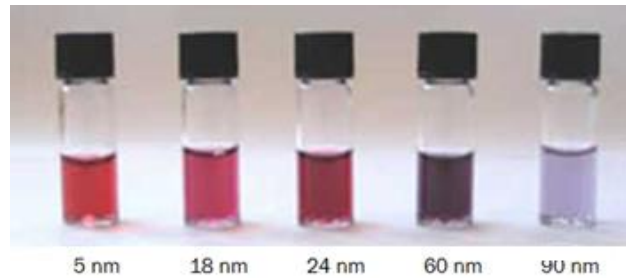


Figura 12. Mezclas coloidales de AuNPs en fase acuosa mediante el método de Turkevich de distintos tamaños.

En el caso del método de Turkevich, la formación de AuNPs ocurre mediante la reducción de Au^{3+} a Au^{1+} por la oxidación del citrato de trisodio a dicarboxiacetona, esta última se descompone con la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. La nucleación requiere de un complejo multimolecular entre la dicarboxiacetona y el AuCl , por lo que, la velocidad de nucleación se ve afectada por la degradación que sufre la dicarboxiacetona por la temperatura. Esto indica que en este caso, el factor que determina el tamaño de las AuNPs no es el balance entre la velocidad de nucleación y de crecimiento, sino el balance entre la velocidad de nucleación y la de la degradación de la dicarboxiacetona (7).

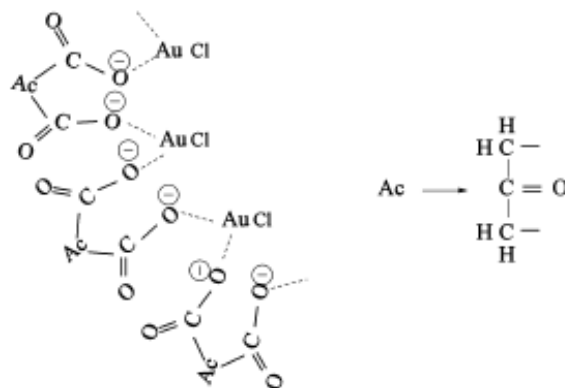


Figura 13. Complejo formado entre la dicarboxiacetona y el AuCl .

Otra posibilidad de síntesis por el método de Turkevich es provocar la reducción del precursor de oro con citrato a temperatura ambiente mediante radiación ultravioleta.

El citrato, además de reducir, tiene la capacidad de pasivar las AuNPs formadas. Una alta concentración del reductor, permite la estabilización de las AuNPs más pequeñas, mientras que a menores concentraciones, el recubrimiento es insuficiente y se induce a la aglomeración de las AuNPs (10).



1.3.2.- Síntesis de AuNPs en fase orgánica. Método Brust-Schiffrin:

Las AuNPs de tamaño más pequeño (inferior a unos 3 nm) y carácter altamente monodisperso, a menudo se sintetizan en fase orgánica por una reducción directa de los iones metálicos en presencia de ligandos orgánicos que interaccionan fuertemente con el metal evitando el crecimiento de la NP formada (4). Esta adsorción de ligandos orgánicos sucede por autoensamblaje molecular, donde se produce un proceso de quimisorción entre la superficie de la AuNP y el ligando.

Esta forma de autoensamblaje, es adecuada, ya que las superficies de metales como el oro, tienden a adsorber ligandos orgánicos y por ello viene la tendencia a funcionalizar NPs metálicas con estos ligandos, ya que, de esta manera se disminuye la energía libre de la interfase metal-ambiente contribuyendo a la estabilización.

En estos casos de disoluciones coloidales de alta fuerza iónica o en fase orgánica, se hace por tanto necesario el uso de agentes estabilizantes para no sólo proteger a las NPs y prevenir su aglomeración, sino para ejercer un control en el tamaño y forma de la NP (8).

Nuzzo y Allara, descubrieron que los tioles forman autoensamblados moleculares en superficies de oro, diez años después, Giersig y Mulvaney, usaron los tioles para estabilizar coloides de oro y un año después, en 1994, Brust-Schiffrin y colaboradores, reportaron la síntesis de AuNPs funcionalizadas con tiol en un sistema bifásico líquido-líquido. Estas AuNPs-tiol tenían la ventaja de permanecer estables indefinidamente en disolventes orgánicos, además de la capacidad de poder redisolverse después de haber sido aisladas como polvo seco y sin agregación o descomposición del material, así como la capacidad de poder modificarse químicamente (11).

Este tipo de AuNPs-tiol se estudian en aplicaciones de reconocimiento molecular, dispositivos electrónicos e incluso catálisis (4), ya que la posibilidad de manejar las AuNPs-tiol como si fueran compuestos químicos estables, facilita el estudio de sus propiedades y el desarrollo de nuevas aplicaciones.

Pero como ya se comentó, no sólo se pueden funcionalizar las AuNPs con tioles, también se emplean ligandos como aminas, silanos, disulfuros o fosfinas, otorgando cada ligando diferentes propiedades en la AuNP, pero la alta afinidad de los tioles por las superficies de metales nobles como el oro, hace que sea esta la funcionalización más común y eficaz.

Los factores de tamaño y dispersión constituyen dos de las principales diferencias de formación de AuNPs en fase orgánica con respecto a la fase acuosa del método de Turkevich (3). Pero tanto el método de Turkevich como el de Brust-Schiffrin son los dos métodos más representativos para sintetizar AuNPs esféricas controlando su tamaño. A continuación, se muestra en la figura 14, un esquema de obtención de AuNPs por cada método.

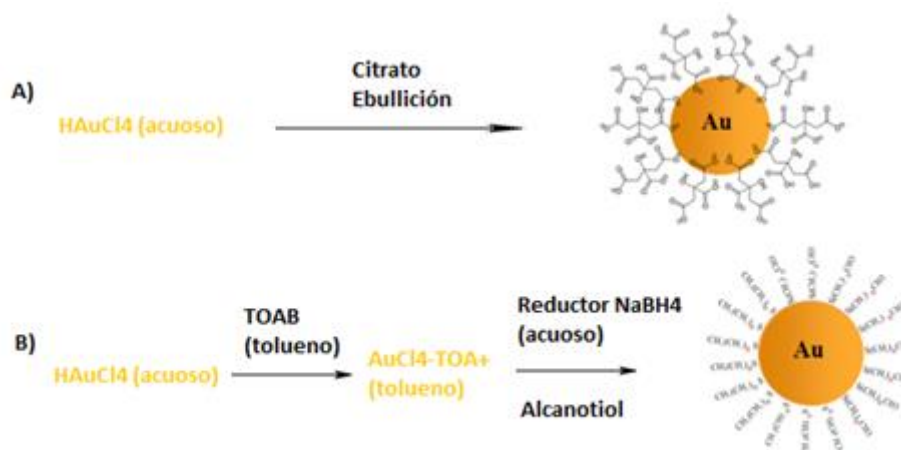


Figura 14. A) Turkevich: reducción con citrato del AuCl₄⁻ en solución acuosa.
B) Brust-Schiffrin: reducción con borohidruro del AuCl₄⁻ en solución orgánica transferida de una fase acuosa mediante un agente de transferencia de fase.

Como queda constancia, el tamaño, forma y propiedades de la superficie de las AuNPs depende de la combinación de parámetros como la concentración, la velocidad de reducción, la temperatura, la agitación, la adición de ligandos, etc. Controlando todos estos parámetros, se puede asegurar que la formación de oro reducido, se deposite en la superficie de las partículas de siembra sin posterior nucleación.

En la síntesis en fase orgánica, el hecho de que la AuNP se encuentre expuesta y no pasivada, permite que moléculas orgánicas puedan adsorberse en su superficie y funcionalizar a la AuNP (4).

En todo proceso de síntesis de NPs en fase líquida, el mecanismo de formación comprende una nucleación que requiere alta energía de activación y un posterior crecimiento que requiere una baja energía de activación.

Cualquier modificación del tamaño final de las NPs, así como de su distribución y forma, se puede realizar alterando cada una de estas etapas, aunque el tamaño final depende sobre todo del proceso de nucleación y la distribución y forma final depende sobre todo de la etapa de crecimiento.

Además, para que las NPs sean monodispersas, ambas etapas deben estar separadas en el tiempo y la nucleación debe ser instantánea para que los núcleos tengan un tamaño similar (monodispersos).

Hay dos aproximaciones comunes para alcanzar una nucleación rápida: la descomposición del metal a alta temperatura y la adición rápida del reductor como se expuso anteriormente (12).

Pero en el método Brust-Schiffrin, al ser el tamaño de las AuNPs muy pequeño, domina el crecimiento mononuclear, ya que las capas se completan rápidamente.

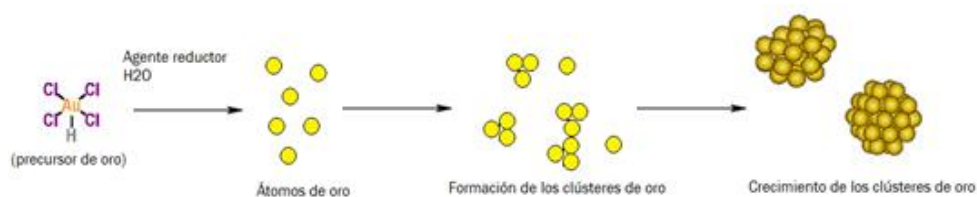


Figura 15. Etapas de formación de las AuNPs con nucleación y crecimiento.

Entrando en una mayor profundidad en el énfasis del uso de agentes estabilizantes en las AuNPs en el medio de dispersión, otro ejemplo, a parte de los compuestos funcionalizantes, es el uso de los agentes surfactantes, que son un tipo de moléculas estabilizantes de bajo peso molecular con un grupo de anclaje que se adsorbe fácilmente, lo que sirve para controlar la velocidad de crecimiento de la AuNP y lograr la estabilización.

La acción protectora del surfactante presenta dos aspectos diferenciados: el primero es que cuando dos moléculas surfactantes unidas a la superficie de las AuNPs se acercan entre sí, el aumento local de concentración, da lugar a un aumento de la energía libre y como consecuencia una repulsión (efecto osmótico) y el segundo es cuando algunas moléculas de surfactante no entran en el espacio que queda en las AuNPs, se produce una pérdida de entropía (efecto de restricción de volumen) y una nueva contribución a la repulsión (7).

Los surfactantes proporcionan una barrera física que evita que las superficies metálicas contacten. También, pueden cambiar la carga superficial de una NP y así cambiar su estabilidad frente a la agregación. Por tanto, la combinación de la estabilización energética de la superficie metálica por el surfactante, las consecuencias de las interacciones carga-carga y la repulsión estérica entre las NPs, evita la agregación.



La mayoría de los surfactantes usados para estabilizar AuNPs se asocian a la superficie a través de interacciones Van der Waals o interacciones electrónicas débiles, esto permite un proceso dinámico para controlar el tamaño y forma de las AuNPs. Además, algunas clases de surfactantes también pueden actuar como reductores en la formación de AuNPs.

Por ello, la estabilidad de las suspensiones coloidales en el medio viene determinada por el balance de fuerzas atractivas y repulsivas a las que se ven sometidas las AuNPs (14).

Por otro lado, la presencia de un disolvente en el proceso de autoensamblado, añade parámetros adicionales al equilibrio como son las interacciones disolvente-sustrato y disolvente-ligando. Así, las interacciones disolvente-sustrato pueden ralentizar la velocidad de adsorción de los tioles desde la disolución, ya que las moléculas de disolvente tienen que ser desplazadas de la superficie previamente a la adsorción de los tioles.

Los efectos del disolvente en la cinética de formación y en el mecanismo de autoensamblado molecular, son complejos y aún no se entienden en su totalidad (11). Al igual que se conoce poco sobre los efectos que puede ocasionar el oxígeno en la velocidad de formación y en la estructura de la NP. Si se desplaza el oxígeno por medio de un gas inerte como argón o nitrógeno, previamente a preparar las disoluciones de los tioles y se mantiene una atmósfera inerte sobre la disolución durante la formación, se mejora la reproducibilidad de las propiedades de las AuNPs-tiol. Al reducir la concentración de oxígeno en la disolución, se limita la oxidación de los tioles a sulfonatos ($-\text{SO}_3$) y a otras especies oxigenadas (12).

Para mejorar la monodispersidad de las NPs, se pueden separar en base a su tamaño y/o forma. Para ello existen técnicas como electroforesis capilar, cromatografía, centrifugación, ultracentrifugación o filtración.

El inconveniente de las técnicas de centrifugación y ultracentrifugación, es la posible aglomeración o agregación irreversible de las NPs.

El caso de la filtración (técnica de purificación empleada en el método de Brust-Schiffrin), consiste en un proceso de separación impulsado por presión, donde la membrana porosa retiene las NPs más grandes, permitiendo una rápida separación. Para esta técnica, destaca el desarrollo de la membrana de Krieg y colaboradores, donde se crearon unas membranas supramoleculares preparadas por el autoensamblado del compuesto PP2b (5,5'-bis(1-ethynyl-7-polyethyleneglicol-N,N'-bis(ethylpropyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide)-2,2'-bipyridine) en agua/tetrahidrofurano, las cuales son muy robustas y adecuadas para separar las AuNPs (15).



1.4.- Caracterización de AuNPs:

La caracterización, se puede definir en general como la identificación y/o cuantificación de propiedades específicas o características de una muestra o material.

Las propiedades ópticas de las NPs metálicas son las propiedades más relevantes, y por tanto, las técnicas espectroscópicas son de las más importantes, pero no son las únicas.

Las tendencias actuales de caracterización llevan a combinar las técnicas microscópicas y espectroscópicas fundamentalmente para así obtener información del tamaño y composición química de los materiales.

A continuación, se explicarán las técnicas de caracterización empleadas para el desarrollo de este proyecto.

1.4.1.- Espectroscopia de absorción Uv-vis:

Las técnicas espectroscópicas describen la interacción entre la radiación, principalmente la electromagnética y la materia. Realizan por tanto, la medición de la radiación electromagnética emitida por la materia o que interacciona con ella.

Poseen una amplia gama de aplicaciones en el estudio concreto de las NPs, la más importante consiste en el análisis de la posición del plasmón (SPR) para poder relacionarlo con el tamaño de la NP y esto se emplea comúnmente para realizar un control del tamaño de las NPs en el proceso de síntesis. Además, las concentraciones de NPs también pueden ser cuantificadas a partir de mediciones de absorción.

La radiación electromagnética es un tipo de energía que viene determinada por una longitud de onda (λ), una frecuencia (ν) y una energía (E), ya que la radiación además de tener naturaleza ondulatoria posee naturaleza fotónica, esto es debido a que la radiación electromagnética consiste en una corriente de paquetes discretos de ondas, que se comportan como si fueran fotones. Todas estas variables, se relacionan mediante la ecuación de Planck y cada término viene a representar lo siguiente:

- Longitud de onda (λ): es la distancia entre dos puntos de la onda que han pasado un ciclo completo, se expresa en cualquier unidad de longitud, aunque generalmente en nanómetros (nm).

- Frecuencia (ν): es el número de ciclos por unidad de tiempo, se expresa en segundo recíproco (s^{-1}) o Hertz (Hz).

Luego, la energía del fotón es proporcional a la frecuencia de radiación mediante la ecuación de Planck:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Ecuación 1. Energía cuántica de un fotón.

Siendo h la constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s} \cdot \text{fotón}^{-1}$) y c la velocidad de propagación que dependerá del medio.

La relación anterior indica que la energía de un fotón de una sola frecuencia depende únicamente de su longitud de onda o de su frecuencia, de forma que un haz de radiación puede ser más o menos intenso en función de la cantidad de fotones por unidad de área, pero la energía del fotón es siempre la misma para una determinada frecuencia (16).

El espectro electromagnético comprende un amplio intervalo de longitudes de onda y energías. En la figura 16, se muestran las regiones más importantes del espectro electromagnético donde al pasar de una región a otra no existen discontinuidades en las propiedades de la radiación.

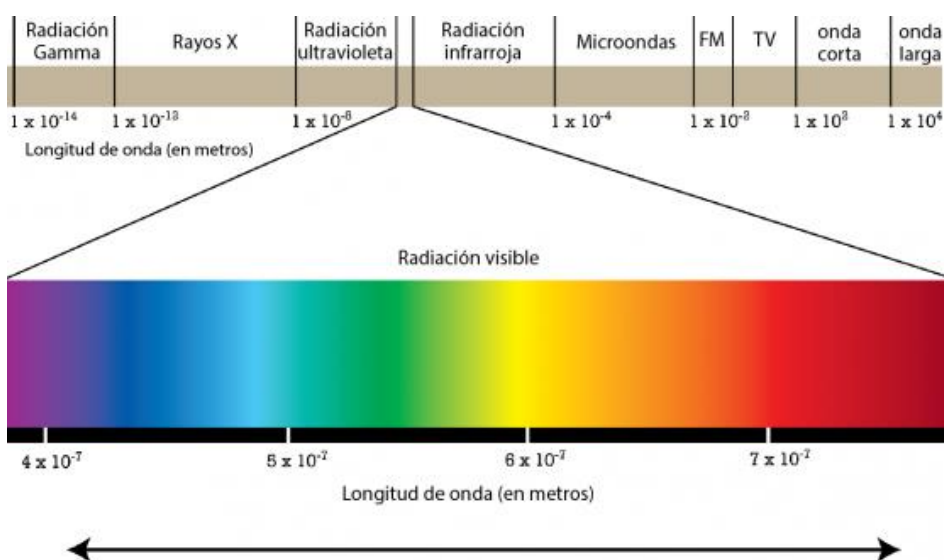


Figura 16. Espectro electromagnético.



El procedimiento de dicha técnica espectroscópica consiste por tanto en que cuando la luz visible o ultravioleta (I_0) incide sobre la muestra, una parte del haz la atraviesa (I) y otra es absorbida por los electrones de valencia de la muestra.

Cuando el haz es absorbido por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados de mayor contenido energético, y para que esto suceda, la energía del fotón debe corresponder exactamente a alguno de los desniveles de energía entre el estado fundamental y alguno de los estados superiores de la partícula, después de un corto intervalo de tiempo, casi instantáneo, la especie excitada vuelve a su estado fundamental mediante la liberación de ese exceso de energía por descomposición fotoquímica o por una reemisión fluorescente o fosforescente.

Por otro lado, la fracción de radiación que logra traspasar la muestra se conoce como transmitancia, que se define como la fracción de radiación incidente transmitida por la muestra.

Finalmente, la absorción de luz por las moléculas puede relacionarse con la concentración de la especie absorbente de la muestra mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = a \cdot l \cdot c = -\log T = -\log \frac{I}{I_0}$$

Ecuación 2. Ley de Lambert-Beer.

Siendo A la absorbancia, a el coeficiente de absorción, l el camino óptico, c la concentración de la especie absorbente, I la intensidad de luz transmitida a través del material e I_0 la intensidad de luz monocromática (una única longitud de onda) incidente.

El espectro de absorción representa la absorbancia (u.a.) frente a la longitud de onda (nm). Los espectros de absorción que se obtienen en este caso se centran en el plasmón, donde como se sabe, la posición y forma del plasmón dependen del metal, del medio, del tamaño y forma de las NPs, de la dispersión de la mezcla, etc.

Cuando se obtiene un espectro, se pueden sacar las siguientes conclusiones para NPs:

- La concentración de la mezcla coloidal se relaciona con la absorbancia en el pico máximo de absorción, la cual aumenta con la concentración.



- La dispersión de tamaños de las NPs, depende del ancho del pico máximo de absorción, es decir, del plasmón. A mayor anchura, mayor dispersión de tamaños.
- El tamaño de la NP depende la posición del pico máximo de absorción, es decir, del plasmón desplazándose a longitudes de onda menores cuando el tamaño de la NP decrece y presentando la NP una coloración más rojiza.

1.4.2.- Espectroscopia de absorción infrarroja:

Esta rama de la espectroscopia trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético, siendo la técnica más común la de absorción, que será la utilizada en este caso.

La espectroscopia infrarroja sirve para identificar un compuesto y conocer la composición de una muestra. Se puede dividir en tres regiones: en el infrarrojo cercano, medio y lejano, nombrados así por su distancia al espectro visible:

- Infrarrojo lejano: su intervalo va de los 400 a los 10 cm^{-1} , está seguido de la región microondas, es de baja energía y se usa en espectroscopia rotacional.
- Infrarrojo medio: su intervalo va de los 4000 a los 400 cm^{-1} , se puede emplear para analizar vibraciones fundamentales y estructuras rotacionales vibracionales.
- Infrarrojo cercano: su intervalo va de los 14000 a los 4000 cm^{-1} , es de alta energía y puede excitar frecuencias mayores de la fundamental o vibraciones armónicas.

En general, la radiación infrarroja no tiene suficiente energía para producir transiciones electrónicas como se consiguen con el Uv-vis, sino que producen transiciones entre estados vibracionales y rotacionales propios del estado fundamental de la molécula, ya que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan o vibran sus enlaces.

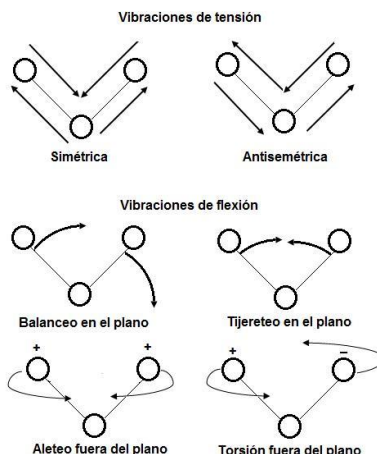


Figura 17. Distintos modos de vibración de una molécula triatómica.

Cada grupo atómico o molécula tiene un espectro de absorción infrarrojo característico y está compuesto por distintas bandas de absorción, cada una de ellas debidas a un tipo de enlace determinado (caracterizado por la fuerza de enlace y los átomos que lo forman) y a su modo de vibrar, lo que permite asociar esta información a un tipo de enlace como se observa en la figura 18.

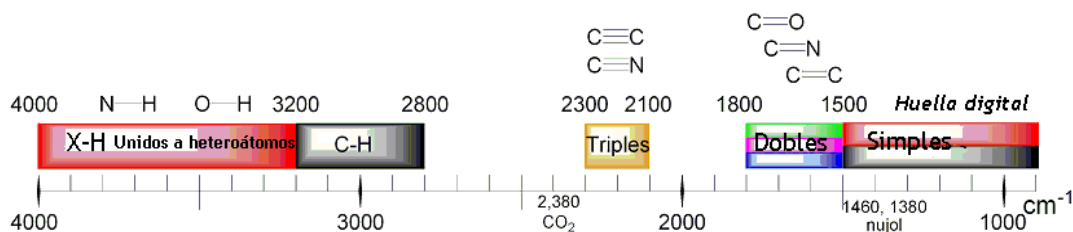


Figura 18. Tabla con absorciones de enlaces en el espectro infrarrojo.

Para que la vibración sea registrada en el espectro debe haber un cambio neto en el momento dipolar de la molécula o grupo atómico, es decir, en el espectro infrarrojo no se pueden registrar los modos de vibración de moléculas diatómicas formadas por el mismo átomo, tales como por ejemplo el H₂ o el N₂.

La frecuencia a la que aparece cada vibración es inversamente proporcional a la masa reducida de los átomos que lo forman y directamente proporcional a la fortaleza del enlace.



A la hora de medir la muestra, un rayo de luz infrarroja atraviesa la muestra y cuando la frecuencia de excitación de un enlace o grupo de enlaces coincide con alguna de las frecuencias del rayo, se absorbe y se registra la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda. Una forma de lograr estas mediciones es usando la transformada de Fourier (FT-IR) para poder ir midiendo todas las longitudes de onda a la vez y por tanto, poder trazar un espectro de transmitancia o absorbancia. Esta técnica espectroscópica funciona sólo con enlaces covalentes.

El espectro FT-IR muestra las longitudes de onda a las que la muestra absorbe en el infrarrojo y esto permite interpretar qué enlaces están presentes.

Cuando se disponen de estructuras moleculares complejas, como es el caso de NPs funcionalizadas, se forman más bandas de absorción y dan un espectro más complejo y difícil de interpretar.

El espectro infrarrojo representa la absorbancia (u.a.) o transmitancia (%) frente al número de onda (cm^{-1}).

1.4.3.- Microscopía electrónica:

Las técnicas microscópicas permiten observar la forma, el tamaño, la rugosidad o la cristalinidad de las NPs. Todos los microscopios electrónicos poseen un cañón de electrones y una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra, mientras que hay un sistema que registra las micrografías producidas al interaccionar con la muestra.

Existen varios tipos de microscopios electrónicos como los SEM (del inglés *Scanning Electron Microscope*), o los TEM (del inglés *Transmission Electron Microscopy*), en el caso del presente proyecto, se utilizará el microscopio TEM, ya que el SEM no alcanza la suficiente resolución como para poder obtener micrografías adecuadas de las NP.

Por tanto, los TEM, permiten la caracterización estructural y morfológica de las muestras mediante la adquisición de micrografías. A partir de estas micrografías se puede calcular el tamaño de las NPs o su distribución de tamaños, su estructura interna y a través de difracción de electrones, las especies químicas de las NPs, además de poder visualizar la forma o el estado de agregación de las NPs. Las imágenes de los TEM pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

El microscopio TEM se compone de un sistema de vacío para que los electrones no puedan ser desviados por las moléculas del aire al chocar, de una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y de una cámara fotográfica o pantalla de ordenador que tiene la función de registrar la imagen.

Dentro del sistema de vacío se encuentra un cañón que produce un haz de electrones que se dirige hacia la superficie de la muestra, y posee también un sistema de lentes electromagnéticas.

Luego para la obtención de la imagen, el cañón electrónico produce un haz de electrones que es acelerado mediante una diferencia de potencial que puede oscilar entre los 80 y los 600 kV según el modelo del microscopio. El haz es dirigido y focalizado por las lentes condensadoras hacia una rejilla de cobre donde está depositada la muestra, una vez que se alcanza, los electrones interactúan con la muestra, unos chocando con ella (difracción) y otros atravesándola (transmisión), formándose así una imagen o micrografía gracias a las lentes objetivo. Esta micrografía se forma debido a los electrones transmitidos por la muestra y posteriormente será aumentada y proyectada en las lentes proyectoras.

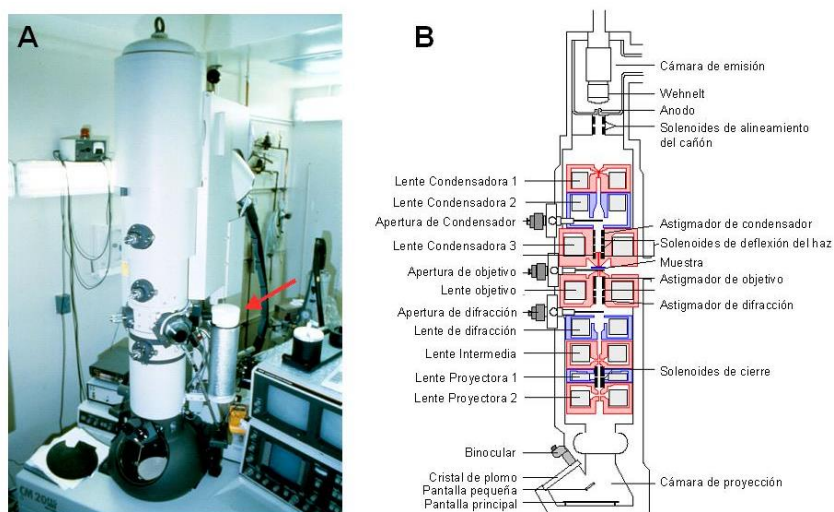


Figura 19. A) Fotografía de un TEM. B) Esquema general del interior de un TEM.

Se pueden obtener dos tipos de micrografías en el TEM, las de campo oscuro (micrografías producidas por los electrones difractados o dispersados) y las de campo claro (micrografías producidas por los electrones que se propagan a través de la muestra, lo que forma el haz transmitido) (3).

Para visualizar las NPs, hay que preparar una suspensión diluida, para ello, se toma una sola gota de la suspensión y por último se deposita sobre una rejilla de cobre recubierta de una película de carbono y/o plástico. La gota se deposita comúnmente en la cara de la película de carbono y/o plástico dejándola secar a temperatura ambiente.

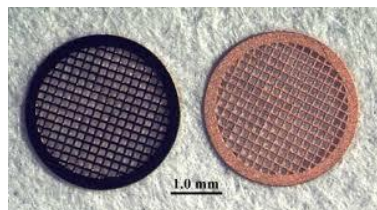


Figura 20. Rejilla de cobre con entramado cuadrado para análisis en TEM.

Las rejillas pueden ser de muchos tipos, con entramados cuadrados, como la de la figura 20, hexagonales, rectangulares, etc. y suelen ser de unos 3 mm de diámetro. La unidad de medida de las rejillas es el 'mesh', donde 1000 mesh = 100 celdas/pulgada. Lo normal es usar rejillas entre 100 y 300 'mesh'.

La elección del disolvente donde se suspenden las partículas es crítica ya que de ello depende su correcta visualización. El disolvente debe de ser de bajo punto de ebullición y que logre estabilizar total o parcialmente a las NPs.

Generalmente, la microscopía electrónica es un método destructivo, por lo que la misma muestra no puede ser analizada dos veces.

1.5.- Sensores electroquímicos:

Para abordar este apartado, se comenzará explicando los principios de los sensores electroquímicos.

La electroquímica es la ciencia que estudia las reacciones químicas que suceden en la interfase de un electrodo (que será un material conductor eléctrico) y un medio electrolítico (que será una disolución donde se produce la conducción iónica ya que contendrá iones libres).

Existen dos tipos de sistemas electroquímicos: celdas galvánicas o baterías (cuando la caída de potencial entre electrodos se debe a una reacción química espontánea produciéndose por tanto, una acumulación de energía eléctrica) y celdas electrolíticas (cuando la reacción se provoca debido a la aplicación de una diferencia de potencial por un sistema de instrumentación electrónico como puede ser el potencióstato, provocando así una electrólisis).

La electrólisis consiste en un proceso donde se transforma una sustancia química (analito) presente en el medio electrolítico a consecuencia del paso de corriente eléctrica.

En el caso que ocupa para el desarrollo del proyecto, el sistema electroquímico seleccionado está formado por una celda electroquímica y un potencióstato.

Las celdas electroquímicas están constituidas por un recipiente que contiene la disolución electrolítica y varios electrodos. Las celdas más sencillas poseen dos electrodos como en la figura 21, donde un electrodo hace de cátodo (lugar donde se da la reducción) y el otro electrodo hace de ánodo (lugar donde se da la oxidación), estos electrodos poseen un material conductor para generar una corriente de electrones que circula del ánodo al cátodo y la disolución electrolítica generará así una corriente iónica.

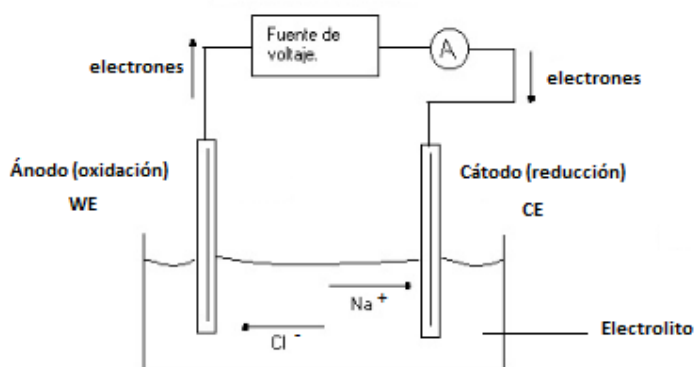


Figura 21. Ejemplo de proceso un electroquímico del NaCl en una celda electrolítica de dos electrodos.

Entre las superficies de los electrodos y la disolución electrolítica pueden ocurrir diferentes reacciones electroquímicas que posteriormente dan lugar a corrientes eléctricas, pero la única reacción objeto de interés, es la que tiene lugar en la superficie del electrodo anódico conocido como electrodo de trabajo (WE, del inglés *Working Electrode*), mientras que el electrodo catódico se conoce como contraelectrodo (CE, del inglés *Counter Electrode*) y se emplea para cerrar el circuito.

Sin embargo, en las celdas electrolíticas, es muy frecuente introducir un tercer electrodo denominado electrodo de referencia (RE, del inglés *Reference Electrode*) cerca de la superficie del WE y de potencial estable y valor conocido para completar el circuito. Gracias a este RE, se minimizan los errores de tensión debidos a la pérdida óhmica a través del medio electrolítico.

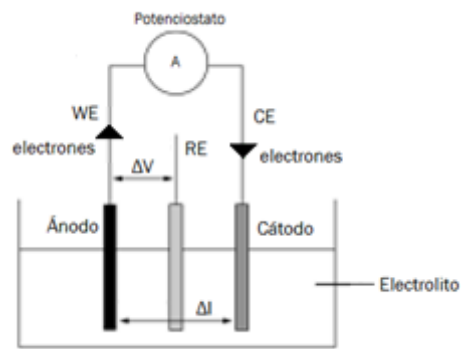


Figura 22. Esquema de configuración de una celda electroquímica de 3 electrodos.

En cuanto al potencióstato, su función consistirá en aplicar variaciones de potencial entre los electrodos y medir la intensidad de corriente producida por las reacciones redox (reacciones de oxidación y reducción) del analito ocurridas en la superficie del WE. Esta corriente será la respuesta a la variación del potencial aplicado por el potencióstato.

Las reacciones redox, son aquellas reacciones donde uno o más electrones del analito se transfieren al WE, provocando cambios en sus estados de oxidación, luego, en la superficie del WE, se dan los fenómenos de transferencia de electrones del analito al WE y de difusión del analito hasta el WE.

Para el desarrollo del proyecto, se elige la opción de un sistema de tres electrodos, donde el WE consiste en un sensor electroquímico basado en NPs, por tanto, un sensor electroquímico se puede definir como un dispositivo capaz de traducir la información química de un analito en una señal útil procesable (18).

Los sensores electroquímicos están formados principalmente por un sistema de reconocimiento o receptor que interacciona con el analito y un transductor sobre el que se conecta el receptor, formando así el sensor completo.

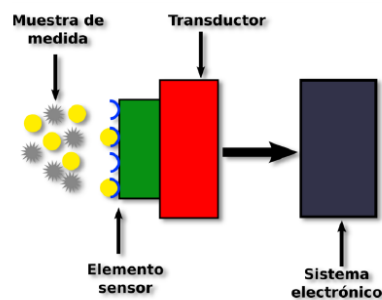


Figura 23. Esquema general de un sensor electroquímico.



El receptor reconoce selectivamente la información química del analito y el transductor transforma esta señal primaria en una secundaria útil (señal eléctrica).

Este tipo de sensores electroquímicos son robustos, de fabricación simple, económicos, poseen un amplio rango de linealidad y un tiempo de respuesta relativamente corto. Se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración del analito y la corriente eléctrica registrada al sufrir procesos redox el analito sobre la superficie del receptor.

Dentro de los sensores electroquímicos, se pueden distinguir tres tipos, según la técnica electroquímica empleada para obtener la información del analito, estos pueden ser los conductimétricos, los voltamétricos y los amperométricos.

Los sensores conductimétricos se basan en la variación de la conductividad, o de alguna propiedad asociada a esta, producida por el analito.

Los sensores amperométricos, se aplica un potencial fijo sobre el WE, respecto al RE para medir las intensidades, además, se incorpora un CE para completar el circuito.

Los sensores voltamétricos, son un tipo particular de sensores amperométricos cuyo fundamento consiste en la variación del potencial de trabajo en función del tiempo para obtener información del analito a partir de intensidades de corriente. Estos sensores se utilizan con distintos métodos de medición como barrido lineal, barrido cíclico, barrido de onda cuadrada, etc. y en función de estas señales se obtienen distintas voltametrías, como puede ser la voltametría cíclica (VC) en barridos lineales, igualmente, un CE, suele ser necesario para completar el circuito.

Los sensores electroquímicos, se pueden modificar por ejemplo, depositando AuNPs, con objeto de mejorar de las propiedades electrocatalíticas del sensor. El tamaño de las AuNPs y su morfología, tienen una gran repercusión en su aplicación en sensores. El hecho de añadir AuNPs a los sensores, supone además un aumento de la relación superficie/volumen del sensor, provocando así una mayor rapidez de la adsorción y desadsorción del analito.

La mejor opción para modificar sensores electroquímicos con AuNPs, es emplear las AuNPs obtenidas por el método de Turkevich y de Brust-Schiffrin, el cual permite obtener AuNPs funcionalizadas con diferentes grupos como pueden ser los grupos tiol. Las AuNPs obtenidas por ambos métodos, tienen la posibilidad de ser depositadas directamente en la superficie del sensor. Este tipo de AuNPs además, mejoran la detectabilidad y sensibilidad del sensor, y a veces incluso modifican la selectividad de la respuesta.

En el caso concreto de la presencia de AuNPs obtenidas del método de Brust-Schiffrin funcionalizadas con un grupo tiol, proporcionan una elevada relación señal/ruido en las mediciones, así como una buena reproducibilidad (19).



Por tanto, para lograr los objetivos de este proyecto, se desarrollarán sensores electroquímicos voltamétricos modificados con AuNPs esperando que estos sensores modificados ofrezcan una buena selectividad, buena sensibilidad, alta relación señal/ruido y bajo límite de detección. Además se elige este tipo de sensores voltamétricos ya que el grupo de UVaSens es donde posee una mayor experiencia.

En cuanto a la caracterización de los sensores, existen actualmente diversas técnicas electroquímicas como las técnicas amperométricas (miden intensidades) o las técnicas potenciométricas (miden potenciales).

Dentro de las técnicas amperométricas, la voltametría cíclica (VC), se ha convertido en los últimos quince años en una herramienta popular, muy útil en el estudio de las reacciones electroquímicas. Con esta técnica, se analizan tanto compuestos orgánicos, como inorgánicos. Además, es el método de detección más comúnmente utilizado para el diagnóstico de las propiedades electroquímicas de sensores modificados de diferentes maneras con AuNPs y por tanto será la técnica empleada.

La VC se basa por tanto, en aplicar un barrido de voltaje lineal como ya se comentó y medir las variaciones de intensidad producidas por la presencia de especies electroactivas (analito) en la disolución electrolítica o en el propio electrodo (en este caso las AuNPs), estas mediciones se plasman en un gráfico intensidad/potencial, conocido como voltamograma.

Los voltamogramas son un reflejo de la concentración del analito, del electrodo elegido, de la velocidad de reacción a la que transcurre la electrólisis, etc.

Luego con la VC, se obtiene una respuesta de intensidad medida entre el WE y el CE frente a una diferencia de potencial aplicado entre el RE y el WE y medida por el RE en un medio electrolítico donde se producirá la electrólisis de un analito y que sucede sobre la superficie del WE modificado con AuNPs. Estos WE tendrán por tanto las propiedades electrocatalíticas de las AuNPs (20).

Mediante un estudio de las respuestas de intensidad, se determina la mínima cantidad de analito que detecta el sensor, es decir, el límite de detección, así como la etapa limitante (difusión del analito hasta el electrodo o transmisión de electrones del analito al electrodo) mediante un estudio cinético.

El barrido de voltaje de la VC aplicado entre el WE y el RE, se escanea linealmente desde un valor inicial E_i a un límite predeterminado E_b , conocido como potencial de conmutación o potencial de barrido, donde, posteriormente se invierte la dirección a su valor de inicio E_i . La señal puede ser de distintas formas y en este caso tendrá una forma triangular (20). Luego, en la VC el potencial se mueve entre dos puntos, una vez alcanzado el potencial máximo o mínimo, se lleva a cabo un nuevo barrido en sentido inverso.

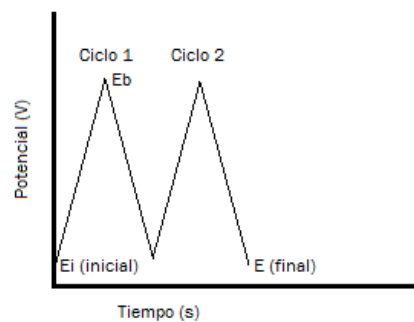


Figura 24. Potencial de barrido aplicado de forma triangular en una VC.

La dirección de barrido puede ser positiva o negativa, por lo que se hace necesario establecer un convenio:

- Intensidad positiva: corriente anódica.
- Intensidad negativa: corriente catódica.
- Picos a intensidades positivas: picos de oxidación.
- Picos a intensidades negativas: picos de reducción.

La eficacia de la VC resulta de su capacidad para observar rápidamente el comportamiento redox de un analito en un amplio rango de potenciales.

El establecer una línea base correcta es esencial para una medición precisa de las corrientes de pico. La línea base nos permite ver que no hay procesos redox indeseados, así como ver a qué potenciales se produce la descomposición del medio electrolítico y conocer por tanto, cuál es el intervalo de potencial de trabajo para cada caso.

Los procesos además pueden ser reversibles: intercambio rápido de los electrones con el WE, e irreversibles: intercambio lento de los electrones con el WE, los picos de oxidación y reducción se separarán con los ciclos y la intensidad necesaria para la oxidación no coincide con la intensidad empleada para la reducción (20).

Por tanto, como conclusión, en la VC se reflejan sólo los procesos redox del analito o de las AuNPs del sensor mediante picos en el voltamograma y el flujo de corriente que se produce entre el CE y el WE no se muestra en los voltamogramas.

1.6.- Antioxidantes:

El objetivo de desarrollar sensores modificados con AuNPs es detectar antioxidantes presentes en los alimentos y sus concentraciones. Especialmente en el vino, como pueden ser los polifenoles.

Los polifenoles son constituyentes fundamentales del mundo vegetal, se encuentran en gran variedad de alimentos retardando o previniendo su oxidación. Dentro de este grupo, existen cientos de compuestos, pero todos se basan en poseer varios grupos bencénicos que llevan asociados grupos hidroxilo (-OH). Además, los antioxidantes son fundamentales en la preservación de los alimentos.

La principal fuente de polifenoles son las bayas, el té, la cerveza, el vino, el aceite de oliva, las nueces, etc.

Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos, ligninas y flavonoides y juegan un papel importante en los atributos organolépticos del alimento.

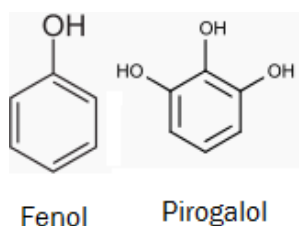


Figura 25. Ejemplos de polifenoles.

Entre los polifenoles, este proyecto, se centra en el estudio del catecol, que además de tener capacidad antioxidante con potenciales beneficios para la salud, actúa como dilatador venoso.

El catecol se usa principalmente en las industrias del caucho, química, fotográfica, colorantes, grasas, aceites, cosméticos y productos farmacéuticos.

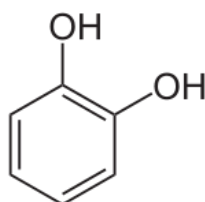


Figura 26. Estructura molecular del catecol.



El catecol al poder sufrir procesos redox, se puede analizar mediante VC. Anteriormente a la VC, las técnicas usadas para detectar antioxidantes se enfocaban en análisis de muestras a nivel de laboratorio con técnicas lentas y complejas, por lo que la VC supone un gran avance en este aspecto al ser una técnica rápida y sencilla para la industria (25).





2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL:

2.1.- Síntesis de AuNPs por el método de Turkevich:

En este apartado se procederá a describir los reactivos, disolventes, materiales e instrumentación empleados para la síntesis de Turkevich.

Este método consiste en la reducción de una sal de oro por medio de citrato (agente reductor) en un sistema de una única fase acuosa (10).

Actualmente, Turkevich sigue siendo uno de los métodos más frecuentemente aplicados debido a su sencillez para llevarse a cabo.

Hay tres enfoques para producir AuNPs de tamaño definido mediante reducción química en una única fase. Uno es por reducción con citrato, otro por reducción con ácido ascórbico y otro por reducción con citrato mediante exposición a la radiación ultravioleta (10).

Aunque el método estándar, consiste en la reducción por citrato a 100°C, donde el tratamiento térmico es lo que inicia la reacción y esta es la metodología que se desarrollará para obtener las AuNPs esféricas. Por tanto, el procedimiento consistió en mezclar 20 mL disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado 0.25 mM a 100°C con 1 mL de disolución acuosa de citrato de sodio dihidratado 17 mM para obtener AuNPs de coloración roja o 0.2 mL para obtener AuNPs de coloración roja. Finalmente, se dejó la mezcla reaccionando a 100°C durante 20 minutos (manteniendo el volumen constante con agua destilada).

Los reactivos y disolventes empleados son los disponibles comercialmente y se han empleado en la forma comercial en la que se adquirieron. Además, se tuvo en cuenta las fichas de seguridad de los distintos reactivos y disolventes.

- Cloruro de oro trihidratado, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 16961-25-4).
- Citrato de sodio dihidratado $\geq 99\%$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 6132-04-3).
- Agua desionizada, H_2O (Equipo Millipore, Direct-Q).



Por otro lado, el material e instrumentación empleado fue:

- Espátula de plástico.
- Espátula de metal.
- Balanza analítica.
- Frasco lavador con agua desionizada.
- Vidrios de reloj.
- Matraz aforado de 50 mL y tapón.
- Matraz aforado de 5 mL y tapón.
- Vasos de precipitados de 25 mL.
- Vaso de precipitados de 100 mL.
- Micropipeta (100 a 1000 μ L) y puntas.
- Embudo de vidrio.
- Probeta de 50 mL.
- Placa calefactora con agitación y agitador magnético.
- Frascos de vidrio de 50 mL con tapones.
- Refrigerador.
- Papel de aluminio y Parafilm.
- Guantes, bata, gafas y tijeras.

2.2.- Síntesis de AuNPs por el método de Brust-Schiffrin:

En este otro apartado se procederá a describir los reactivos, disolventes, materiales e instrumentación empleados para la síntesis de Brust-Schiffrin que permite obtener AuNPs funcionalizadas con distintos ligandos como pueden ser los alcanotioles.

Con este método, a diferencia del método de Turkevich, las AuNPs se pueden volver a resuspender y el coloide formado posee una alta estabilidad durante semanas sin mostrar signos de descomposición o de degradación tanto almacenándose a temperatura ambiente, como bajo refrigeración.

Con el método de Brust-Schiffrin, se obtienen AuNPs-tiol esféricas que presentan estructuras de cuboctaedro (14 caras cuadradas y triangulares) e icosaedros (20 caras triangulares) (21).

Además, un tercio de los átomos de oro están en la superficie unidos al tiol, y esto sugiere que la unión Au-tiol, no tiene el carácter del Au-sulfuro (21). También, se manifiesta que la cinética de crecimiento de las AuNPs-tiol se controla por las condiciones del método y no por la cinética de reducción del oro.

La estrategia seguida en el método de Brust-Schiffrin, consiste en un crecimiento de las AuNPs con un ataque simultáneo de monocapas de tiol autoensambladas (agente capante o funcionalizante) en los núcleos de crecimiento. Posteriormente se añade un agente reductor o surfactante con el fin de permitir que la reacción superficial tenga lugar durante la nucleación y crecimiento del metal en un sistema de bifásico (21).

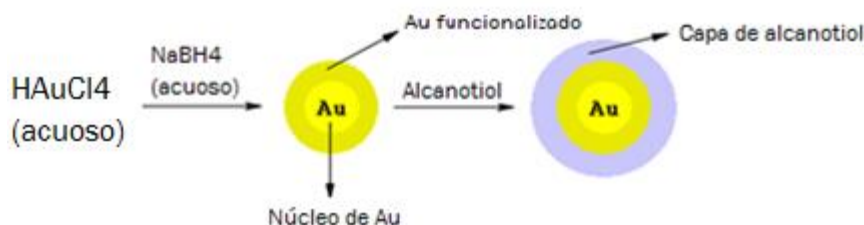


Figura 27. Nucleación y crecimiento de AuNPs esféricas funcionalizadas en el método de Brust-Schiffrin.

Los reactivos y disolventes empleados son los disponibles comercialmente y se han empleado en la forma comercial en la que se adquirieron. Además, se tuvo en cuenta las fichas de seguridad de los distintos reactivos y disolventes.

- Cloruro de oro trihidratado, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 16961-25-4).
- Bromuro de tetraoctilamonio al 98%, $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7)_4\text{N}(\text{Br})$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 14866-33-2).
- Tolueno al 99.8%, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 108-88-3).
- Borohidruro de sodio al 98%, NaBH_4 (Alfa-Aesar, CAS Number: 16940-66-2).
- Etanol absoluto, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Fluka, CAS Number: 64-17-5).
- Agua desionizada, H_2O (Equipo Millipore, Direct-Q).



- 1-dodecanotiol $\geq 98\%$, $C_{12}H_{26}S$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 112-55-0).

En la siguiente lista, aparece la glicina que será otro compuesto que hará la función de ligando (agente capante o funcionalizante), con el objetivo de obtener una funcionalización diferente usando una amina en vez de un tiol. También, se listan los distintos disolventes empleados en variaciones del método original de Brust-Schiffrin con el fin de obtener mejoras y optimizaciones para obtener AuNPs diferentes para su posterior aplicación en sensores electroquímicos:

- Glicina $\geq 98.5\%$, NH_2CH_2COOH (Sigma-Aldrich, CAS Number: 56-40-6).
- Cloroformo, $CHCl_3$ (Panreac, CAS Number: 67-66-3).
- Hexano al 96%, C_6H_{14} (Scharlau, CAS Number: 110-54-3).
- Metanol, CH_3OH (SDS, CAS Number: 67-56-1).

A partir de ahora, se utilizará la siguiente nomenclatura para algunos de los reactivos por ser la nomenclatura empleada en los artículos científicos:

- Bromuro de tetraoctilamonio: TOAB.
- Borohidruro de sodio: BHNA.
- 1-dodecanotiol: DT.

Además, a continuación, se muestra la estructura molecular de los reactivos y disolventes empleados, para obtener una comprensión de las reacciones que tienen lugar durante la síntesis:

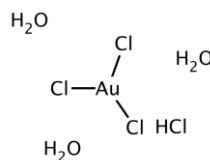


Figura 28. Estructura molecular del cloruro de oro trihidratado.

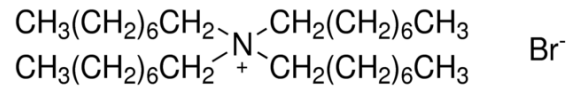


Figura 29. Estructura molecular del bromuro de tetraoctilamonio.

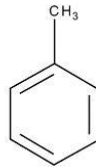


Figura 30. Estructura molecular del tolueno.

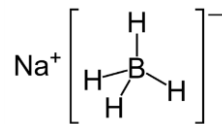


Figura 31. Estructura molecular del borohidruro de sodio.

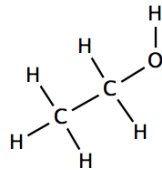


Figura 32. Estructura molecular del etanol.

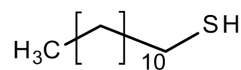


Figura 33. Estructura molecular del 1-dodecanotiol.

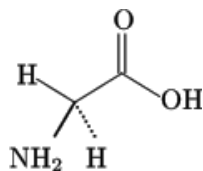


Figura 34. Estructura molecular de la glicina.

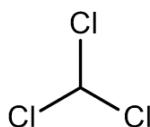


Figura 35. Estructura molecular del cloroformo.

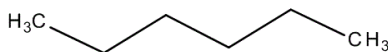


Figura 36. Estructura molecular del hexano.



Figura 37. Estructura molecular del metanol.

Para la síntesis del método de Brust-Schiffrin, el material e instrumentación empleado fue:

- Espátula de plástico.
- Espátula de metal.
- Balanza analítica.
- Campana extractora.
- Frasco lavador con agua desionizada.
- Vidrios de reloj.
- Matraces aforados de 50 mL y tapones.
- Matraz aforado de 100 mL y tapón.
- Vasos de precipitados de 250 mL.
- Vaso de precipitados de 250 mL de fondo estrecho.
- Vaso de precipitados de 500 mL.
- Micropipeta (100 a 1000 μ L) y puntas.
- Embudo de decantación de 500 mL con tapón y soporte.
- Embudo de vidrio.



- Varilla agitadora.
- Probeta de 100 mL.
- Placa agitadora y agitador magnético.
- Rotavapor con gomas, pinzas y baño termostático.
- Matraz de bola de destilación de 250 mL.
- Matraz de bola colector de 1000 mL.
- Matraz Kitasatos de 500 mL con placa filtradora cerámica y gomas.
- Frasco de vidrio con tapón de 500 mL.
- Congelador.
- Refrigerador.
- Papel de aluminio y Parafilm.
- Papel de filtro.
- Membrana de nylon de 0.2 μm .
- Membrana de celulosa entre 0.2 μm y 1 μm .
- Membrana de PTFE (Politetrafluoroetileno) de 0.5 μm .
- Guantes, bata, gafas, mascarilla y tijeras.

Para el desarrollo del método de Brust-Schiffrin, se siguió su artículo original (21), pero además, en este trabajo se han realizado modificaciones diseñadas por el grupo UVaSens.

Para la síntesis, se mezclaron 30 mL de disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado 30 mM con 80 mL de disolución de TOAB en tolueno, formándose un sistema bifásico. La fase orgánica se separó de este sistema ya que el TOAB es un agente de transferencia de fase, pasando el oro de la fase acuosa a la fase orgánica. Después, se añadieron 0.2 mL de DT y se agitó vigorosamente la mezcla para añadir 25 mL de disolución acuosa de BHNA 0.4 M. En este instante, se produjo la reducción del oro y la formación de las AuNPs funcionalizadas.

Tras la adición del BHNA, se mantuvo la mezcla en agitación durante 3 horas más para asegurar la completa reacción. Luego, se separó nuevamente la fase orgánica y se concentró en un rotavapor, se mezcló con 400 mL de etanol para eliminar impurezas y se almacenó bajo congelación durante 4 horas.

Tras dicho tiempo, la mezcla coloidal se filtró, se lavó con etanol y para terminar el proceso, se añadieron 10 mL de tolueno y 400 mL de etanol.

Además, conviene resaltar que existen otros muchos disolventes donde mantener la suspensión coloidal de AuNPs-tiol y algunos de ellos se probaron para así conocer la influencia del disolvente en el comportamiento de las AuNPs-tiol. Aunque el disolvente más usado sigue siendo el etanol y su uso se justifica por cuatro motivos fundamentales:

- Su capacidad para solvatar diferentes alcanotioles.
- Su precio, el cual resulta muy atractivo.
- Su disponibilidad para obtenerlo de alta pureza.
- Su baja toxicidad con respecto a otros disolventes.

2.3- Caracterización de AuNPs:

Una vez sintetizadas las AuNPs por ambos métodos, se procedió a su caracterización. Las AuNPs obtenidas por el método de Turkevich, no se caracterizaron más allá de la espectroscopia de absorción Uv-vis, debido a que están completamente caracterizadas en el grupo de investigación UVaSens, por lo que las AuNPs que se caracterizaron más a fondo, fueron las desarrolladas por el método de Brust-Schiffrin. Los equipos empleados fueron:

Espectrofotómetro Uv-Vis Shimadzu 1603: es un equipo disponible en el laboratorio que posee una lámpara de deuterio y otra de wolframio. Las condiciones de trabajo fueron con un rango espectral de 190 nm a 1000 nm y un valor de resolución medio.



Figura 38. Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1603.

En este caso, se usó el material siguiente:

- Tubos de vidrio cilíndricos de 1 cm de paso óptico.
- Micropipeta (100 a 1000 μL) y puntas.
- Gradilla metálica.

Espectrofotómetro Bruker Tensor 27 FT-IR: este equipo está disponible en el Departamento de Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid. Las condiciones de trabajo fueron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en el infrarrojo medio (de 4000 a 400 cm^{-1}), con una resolución de 4 cm^{-1} y con 15 acumulaciones.



Figura 39. Espectrofotómetro Bruker Tensor 27 FT-IR.

Se empleó bromuro potásico $\geq 99\%$, grado FT-IR, KBr (Sigma-Aldrich, CAS Number: 7758-02-3) para la preparación de las AuNPs en pastillas y el siguiente material:

- Mortero de ágata.
- Micropipeta (100 a 1000 μL) y puntas.
- Vidrio de reloj.
- Espátula.
- Molde de pastillas de KBr al vacío.
- Prensa de laboratorio (hasta 15 Tm).

- Balanza analítica.
- Desecador.
- Cartas para pastillas de KBr.

TEM Jeol Jem 1001HR Electron Microscope: este equipo está disponible en la Unidad de Microscopía Avanzada, situada en el Parque Científico I+D de la Universidad de Valladolid. Las condiciones de trabajo fueron a 100 KeV con aumentos de 500X a 1000000X en formato .dm3, el cual mediante el programa 'ImageJ', se procesó a formato .jpg.



Figura 40. TEM Jeol Jem 1001HR Electron Microscope.

Además, se usó el siguiente material:

- Micropipeta (0.2 a 1000 μ L) y puntas (0.5 a 10 μ L).
- Pinza relojera de 11 cm recta (JSB, Código: 012.4104).
- 3 rejillas de cobre recubiertas con una película de carbono tipo B. (Código: 01800 C-B, 200 mesh Cu).
- Papel de filtro.
- Caja de rejillas con pozos con forma de diamante para 50 muestras.

2.4- Preparación y caracterización de sensores electroquímicos:

Para la preparación de sensores electroquímicos se empleó el equipo Mikasa Spincoater 1H-D7 disponible en el laboratorio así como el baño de ultrasonidos (Ultrasons Selecta) para la limpieza de los sustratos a emplear en el desarrollo de estos sensores.



Figura 41. Equipo Mikasa Spincoater 1H-D7.

Por otro lado, para la caracterización de los sensores electroquímicos se empleó el potencióstato EG&G instruments 263A disponible en el laboratorio.



Figura 42. Potencióstato EG&G instruments 263A.



Los reactivos empleados para la caracterización de los sensores fueron:

- Cloruro potásico $\geq 99\%$, KCl (Sigma-Aldrich, CAS Number: 7447-40-7).
- Catecol (1,2-dihidroxibenceno) $\geq 99\%$, $C_6H_6O_2$ (Sigma-Aldrich, CAS Number: 120-80-9).
- Ácido sulfúrico al 96%, H_2SO_4 (Panreac).
- Cloruro potásico y cloruro de plata 3 M, KCl y AgCl (Panreac).
- Buffer fosfato, 0.01 M y pH 7.4.
- Agua desionizada, H_2O (Equipo Millipore, Direct-Q).

Por otra parte, el material necesario para llevar a cabo la preparación y caracterización de los sensores fue:

- Sustrato ITO (Óxido de Indio y Estaño') de vidrio.
- Pintura conductora de plata (Electrolube).
- Electrodo de trabajo (WE).
- Contraelectrodo (CE).
- Electrodo de referencia (RE).
- Celda electrolítica.
- 2 Septum.
- Sistema de suministro de N_2 .
- Soporte para la celda electrolítica.
- Soporte universal (pie y varilla cilíndrica).
- Pinzas de plástico.
- Soplete.
- Pinzas metálicas.
- Papel de filtro.
- Micropipeta (100 a 1000 μL) y puntas.

En cuanto a la preparación del WE y del CE se usó el siguiente material:

- 20 cm de cable Cu/Sn de 1.5 mm de diámetro.
- 2 jeringuillas de PVC de 1 mL (Código 07642157 1 mL BD Suministros Jimeno).
- 2 pinzas metálicas.
- 2 Septum.
- Cinta aislante, tijeras, alicates y mechero.



Figura 43. Material necesario para montar un WE y un CE.

Para su montaje, se retiraron las agujas y los émbolos de las jeringuillas, se hizo un agujero a ambos Septum calentando la punta de las tijeras con el mechero y se introdujeron en las jeringuillas. A continuación, se pelaron los cables por los extremos con la tijera y se introdujeron en el interior de la jeringuilla, finalmente se enrollaron las pinzas en cada cable con la ayuda de unos alicates y se cubrieron con cinta aislante.

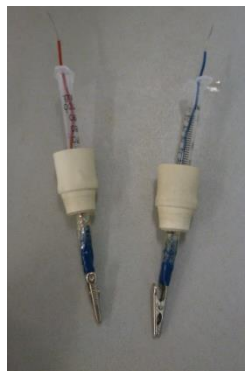


Figura 44. WE y CE tras su montaje.

Para la preparación del RE se usó el siguiente material:

- Capilar de plástico.
- 2 membranas cerámicas porosas.
- Camisa de vidrio.
- Capilar de vidrio.
- Septum.
- Mechero, tijeras y cortador de vidrio.

Por un lado, para el montaje de la camisa, se insertó en la camisa un capilar de plástico y a la unión se le dio un rápido golpe de calor, para que el plástico se estreche. En el otro extremo del capilar, se acopló una membrana dando nuevamente calor.

Y por otro lado, para el montaje del capilar situado en el interior de la camisa, se tomó un capilar de plástico, y se introdujo en un extremo la membrana, dando calor para que el plástico se estreche y en el otro extremo se introdujo un capilar de vidrio dando nuevamente calor.

A continuación, se procedió a introducir la disolución dentro del electrodo. El capilar interior se rellenó con disolución de KCl + AgCl 3 M (Panreac) comercial, mientras que la camisa se rellenó con disolución de KCl 0.1 M a pH 5 preparada en el laboratorio.



Figura 45. Material necesario para montar un RE.



Tanto para la camisa como para el capilar interior, hay que asegurarse de que no quede ninguna burbuja de aire dentro, porque en caso contrario la transmisión de la señal sería mala obteniéndose mala relación señal/ruido en los voltamogramas.

El montaje final del electrodo consistió en introducir el hilo de plata dentro del capilar interior y este a su vez dentro de la camisa, sellando con cinta la unión entre la camisa y el Septum situado en el cable de plata.

Siempre que no se use el RE, debe estar la membrana de la camisa sumergida en disolución KCl 0.1 M para que no se seque. Además, la solución KCl + AgCl se debe cambiar mensualmente y la solución de KCl se debe cambiar semanalmente del RE.

Finalmente, se prepararon las disoluciones como sigue a continuación:

Disolución buffer fosfato: se prepararon 500 mL de este tampón químico a una concentración 0.01 M, para ello se pesaron 0.3659 g de NaH_2PO_4 y 0.2697 g de NaHPO_4 que se disolvieron en 500 mL de agua desionizada. La disolución obtenida cuando no se usó, se almacenó en una cámara frigorífica y se selló con Parafilm.

Disolución catecol: se prepararon 100 mL a una concentración 10^{-3} M, para ello se pesaron 0.01 g de catecol y se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato. El catecol es fácilmente oxidable, por lo que cada vez que se hicieron mediciones se preparó una disolución fresca, y la disolución con la que se estuvo trabajando, se tapó con papel de aluminio para evitar en lo posible su oxidación.

Disolución KCl: se prepararon 200 mL a una concentración 0.1 M, para ello se pesaron 1,491 g y se disolvieron en 200 mL de agua desionizada. Cuando no se usó la disolución, se almacenó en cámara frigorífica con Parafilm.

En cuanto a las mediciones, se realizaron en una celda electrolítica de vidrio con posibilidad de acoplar tres electrodos bajo atmósfera de N_2 y con la celda electrolítica completamente aislada del exterior durante las mediciones.

- Electrodo de referencia (RE): se usó uno de $\text{Ag} | \text{AgCl} / \text{KCl} 3 \text{ M}$, el cual es uno de los más utilizados junto con el calomelano saturado (SCE, del inglés *Saturated Calomel Electrode*).
- Contraelectrodo (CE): placa de platino (Pt) de superficie 7 cm^2 (3 cm x 2.3 cm).



- Electrodo de trabajo (WE): sensor de AuNPs-tiol sintetizadas por el método de Brust-Schiffrin y AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich sobre un sustrato de ITO de superficie 6.2 cm^2 ($2 \text{ cm} \times 3.1 \text{ cm}$).

Como solución electrolítica se empleó 50 mL de buffer fosfato 0.01 M, a un pH 7.4 o 50 mL de disolución de catecol en buffer fosfato 10^{-3} M (donde el analito es el catecol) dependiendo de cada análisis y siempre a temperatura ambiente y sin agitación externa (26).

Los sensores se caracterizaron mediante VC con función de barrido con forma triangular desde -0.6 V a 1.2 V, con 10 ciclos para asegurar la estabilización del sensor, con 1 cm^2 de superficie sumergida del electrodo en la disolución, una velocidad de barrido de 100 mV/s y una adquisición de datos de 1 mV/punto.

Para el estudio de los límites de detección del sensor se trabajó en un rango de concentraciones de $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ a $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ de disolución de catecol en 50 mL de buffer fosfato.

Para el estudio cinético se trabajó en un rango de velocidades de barrido de 25 mV/s a 200 mV/s en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.

Además, los sensores electroquímicos consistieron en un sustrato ITO modificado con AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich y por el método de Brust-Schiffrin, para analizar el efecto electrocatalítico de las AuNPs en la detección de un antioxidante (analito), con la intención de favorecer la transferencia de electrones del analito al WE con este sensor, así como provocar si es posible un aumento de intensidad en los picos redox del analito y reducir los potenciales redox del analito.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

3.1.- Síntesis de AuNPs mediante el método de Turkevich:

La primera tarea consistió en la obtención de AuNPs esféricas sin funcionalizar (por no tener un ligando unido a la AuNP) en dos tamaños diferentes. El método de Turkevich es un método ya desarrollado en el grupo UVaSens.

Para la síntesis, se prepararon 50 mL de una disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado a una concentración de 0.25 mM en un matraz, (0.00492 g de cloruro de oro trihidratado). Se usó un vidrio de reloj y con una espátula de plástico se pesó el cloruro de oro, después, con agua desionizada se arrastró el cloruro de oro a un vaso de precipitados de 100 mL, se disolvió, se vertió al matraz y se enrasó.



Figura 46. Disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado, 0.25 mM.

Una vez preparada la disolución de cloruro de oro, se etiquetó (nombre de la disolución, concentración, autor y fecha) y se cubrió con papel de aluminio para que la luz no incidiese en la disolución.

A continuación, se prepararon 5 mL de una disolución acuosa de citrato a una concentración de 17 mM en un matraz, (0.02499 g). Se usó un vidrio de reloj y con una espátula metálica se pesó el citrato, después, con agua desionizada se arrastró el citrato a un vaso de precipitados de 25 mL, se disolvió, se vertió al matraz y se enrasó.



Figura 47. Disolución acuosa de citrato de sodio dihidratado, 17 mM.

Una vez preparada la disolución de citrato, se etiquetó correctamente y se cubrió de nuevo con papel de aluminio para aislarlo de la luz.

A continuación, se realizaron dos reacciones con diferente volumen de agente reductor para obtener AuNPs esféricas de dos tamaños diferentes y que por tanto, tuvieron coloraciones diferentes.

Caso 1) AuNPs de coloración roja: se midieron 20 mL de cloruro de oro en una probeta y se vertieron a un vaso de precipitados de 25 mL. Se situó el vaso en la placa calefactora donde se introdujo el agitador magnético, se conectó la placa calefactora a 100°C y la agitación a 900 rpm. Cuando se alcanzó la temperatura de ebullición, se añadió 1 mL de citrato. La mezcla se mantuvo durante unos 20 minutos y a lo largo de este tiempo, se rellenó con agua desionizada, para mantener dicho volumen constante y por tanto la concentración constante.

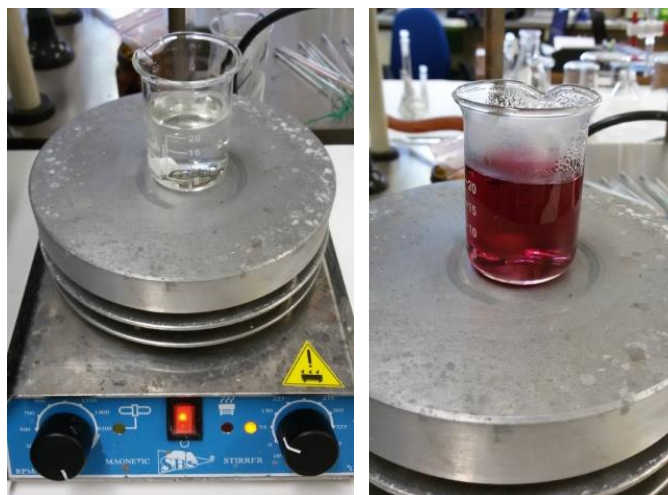


Figura 48. Caso 1: de izquierda a derecha, antes de añadir el citrato de sodio dihidratado y pasados 10 minutos tras añadir el citrato de sodio dihidratado.

Caso 2) AuNPs de coloración morada: se procedió de igual modo, pero añadiendo esta vez 0.2 mL de citrato.

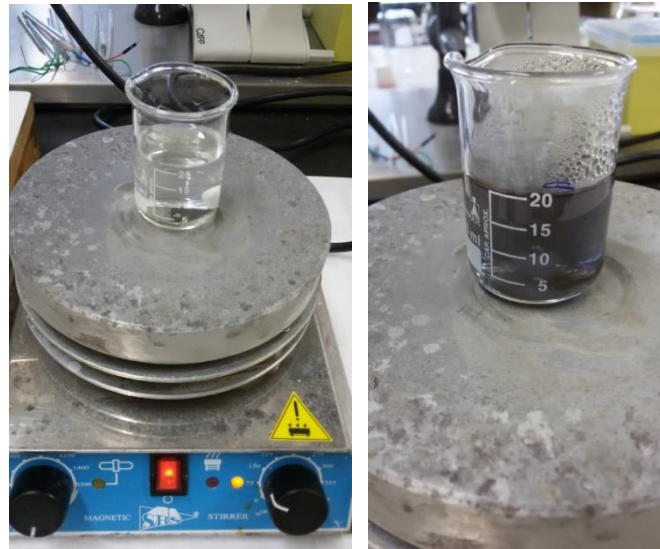


Figura 49. Caso 2: de izquierda a derecha, antes de añadir el citrato de sodio dihidratado y pasados 10 minutos tras añadir el citrato de sodio dihidratado.

Si se va variando la concentración del citrato (agente reductor), se logra alcanzar un amplio rango de tamaños de AuNPs entre 9 nm y 120 nm. Además el citrato, tiene la doble función de provocar la reducción de la sal de oro y pasivar las AuNPs formadas.

Una alta concentración de citrato, permite la estabilización de AuNPs pequeñas, mientras que con pequeñas concentraciones, no se cubre completamente la superficie de las AuNPs y esto conduce a la agregación, por lo que se obtienen AuNPs de mayor tamaño.

Pasados los 20 minutos, se retiraron de la fuente de calor las disoluciones y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron a unos frascos de vidrio de 50 mL cerrados y se guardaron bajo refrigeración con Parafilm.

Una vez sintetizadas las AuNPs, se observó que son estables durante un mes y pasado ese tiempo, estas AuNPs acababan aglomerándose y precipitando debido a la falta de un agente estabilizante que mantuviera la mezcla coloidal. En los siguientes apartados se verá que este hecho no ocurrió en las AuNPs obtenidas mediante el método de Brust-Schiffrin.

En la figura 50, se muestra que al pasar un mes, la mezcla coloidal sufría un cambio de sus propiedades, como una pérdida del color en la mezcla coloidal debido a la aglomeración y precipitación de las AuNPs. Esto ocurrió en todos los casos de AuNPs sintetizadas por Turkevich.



Figura 50. Degradación de AuNPs obtenidas mediante la síntesis de Turkevich.

3.2.- Síntesis de AuNPs mediante el método de Brust-Schiffrin:

Con el método de Brust-Schiffrin, se pueden obtener AuNPs funcionalizadas con distintos ligandos, el hecho de recubrir las AuNPs con estos ligandos, evita su agregación a la vez que adquieren nuevas propiedades. En este caso, se han obtenido AuNPs con dos funcionalizaciones diferentes: AuNPs funcionalizadas con un alcanotiol (AuNPs-tiol) que son las AuNPs clásicamente obtenidas por este método y AuNPs funcionalizadas con una amina (AuNPs-glicina) las cuales suponen una nueva síntesis. Por otro lado, las AuNPs obtenidas mediante el método de Brust-Schiffrin, se probaron en diferentes condiciones experimentales para optimizar este método.

La síntesis comenzó preparando 50 mL de una disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado a una concentración de 30 mM en un matraz, (0.59745 g de cloruro de oro trihidratado). Se usó un vidrio de reloj y con una espátula de plástico se pesó el cloruro de oro, después, con agua desionizada se arrastró el cloruro de oro a un vaso de precipitados de 250 mL, se disolvió, se vertió al matraz y se enrasó.



Figura 51. Disolución acuosa de cloruro de oro trihidratado, 30 mM.

Una vez preparada la disolución de cloruro de oro, se etiquetó (nombre de la disolución, concentración, autor y fecha) y se cubrió con papel de aluminio para que la luz no incidiera en la disolución.

A continuación, se prepararon 100 mL de una disolución de TOAB a una concentración de 50 mM en tolueno, (2.73395 g de TOAB). Para ello, se pesó en un vidrio de reloj con una espátula metálica, se llevó a la campana extractora, se arrastró el TOAB desde el vidrio de reloj con el tolueno a un vaso de precipitados de 250 mL, se disolvió completamente, se vertió al matraz y se enrasó.

Una vez preparada la disolución de TOAB, se etiquetó correctamente y se cubrió de nuevo con papel de aluminio.

Una vez que se prepararon las dos disoluciones, se midieron en una probeta 30 mL de disolución de cloruro de oro y se vertieron al embudo de decantación. Luego, se midieron 80 mL de disolución de TOAB y se vertieron al embudo de decantación. Se tapó el embudo y se agitó vigorosamente la mezcla hasta que el cloruro de oro se transfirió de la fase acuosa a la fase orgánica de tolueno. Durante la transferencia de fase se observó un cambio de color de un dorado amarillento a un dorado anaranjado debido a la formación de las AuNPs. Tras unos segundos de reposo, ya se observaron dos fases completamente separadas, una fase orgánica dorada oscuro y una fase acuosa incolora.

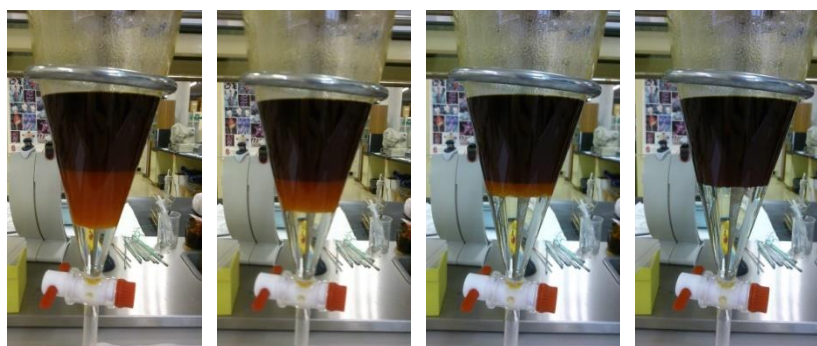


Figura 52. Transferencia de fase de los aniones AuCl_4^- de la fase acuosa a la fase orgánica.

La explicación de este fenómeno observado en la figura 52, se debe a que el TOAB es un surfactante, luego su función es la de evitar la aglomeración de las AuNPs, de controlar y estabilizar la nucleación y crecimiento de las AuNPs, así como en este caso, de posibilitar la transferencia de fase del cloruro de oro. Para ello los aniones AuCl_4^- que se encuentran en la disolución acuosa de partida, se rodean de cationes de tetraoctilamonio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7)_4\text{N}^+$ que se encuentran en la disolución de tolueno de partida, pasando a tener una nueva fase orgánica de tolueno con un compuesto formado por los aniones cloroáuricos y los cationes de tetraoctilamonio ($\text{AuCl}_4^- \cdot \text{TOAB}$).

Cuando se observó que ambas fases estaban completamente separadas, se extrajo la fase orgánica de la acuosa, y se desechó la fase acuosa. La fase orgánica se recogió en un vaso de precipitados de 250 mL de fondo estrecho.

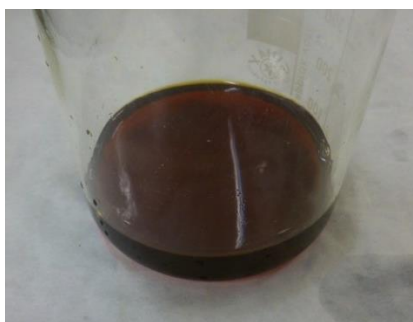


Figura 53. Fase orgánica con $\text{AuCl}_4^- \cdot \text{TOAB}$ en tolueno.

A continuación, a la fase orgánica, se añadieron 170 mg de DT (1-dodecanotiol), cuya densidad es 0.845 g/mL, (0.2012 mL de DT), que se midieron con una micropipeta. El DT en este momento se dejó en la mezcla para que ocurra la funcionalización, ya que es el ligando o agente capante que formará las AuNPs-tiol finales.

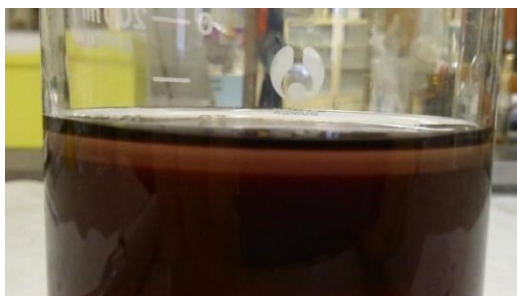


Figura 54. Adición del ligando 1-dodecanotiol a las AuNPs en fase orgánica.

Como se observa en la figura 54, al añadir el DT se forma un sistema bifásico, corroborando que efectivamente hasta que no se añade el agente reductor, el ligando no tiene afinidad por las AuNPs y no forma la funcionalización debido a que por ahora las AuNPs se encuentran estabilizadas con TOAB.

Después, se prepararon 50 mL de una disolución acuosa de BHNA a una concentración 0.4 M en un matraz, (0.7556 g de BHNA). El procedimiento fue igual que en los casos anteriores.

La disolución acuosa de BHNA produjo una reacción con desprendimiento de H_2 que duró unas horas, por tanto, no se cerró completamente el matraz para evitar un aumento de presión dentro del matraz debido al H_2 liberado durante la reacción.

La nueva disolución orgánica que contiene el DT, se situó en una mesa de agitación con un agitador y se añadió lentamente con vigorosa agitación 25 mL de disolución de BHNA medidos previamente en la probeta. Durante la adición, se observó un nuevo cambio de color de un dorado oscuro a un marrón oscuro casi negro y se produjo una reducción del Au^{3+} al Au^0 ya que el BHNA es un agente reductor y por tanto es la fuente de electrones.

Esta reacción fue fácil de seguir debido al drástico cambio de color que sufrió la disolución orgánica mientras se añadió el agente reductor BHNA.



Figura 55. De izquierda a derecha, antes de añadir el borohidruro de sodio, instante de cambio y al finalizar la adición del borohidruro de sodio.

Como se expuso anteriormente, la velocidad de adición del reductor, influye en el tamaño y forma de las AuNPs, por lo que al añadir lentamente el reductor, no se favorece la nucleación y se forman menos núcleos que crecerán más, aunque las AuNPs estarán más polidispersas, aun así, la adición paso a paso es más efectiva que en un único paso.

Una vez añadida la disolución de BHNA, se continuó agitando la nueva mezcla orgánica durante 3 horas, en esta etapa de reducción del Au^{3+} al Au^0 , las AuNPs se vuelven nuevamente inestables y el DT competirá con el TOA^+ por los sitios activos de las AuNPs, desplazando así al TOA^+ y autoensamblándose covalentemente a las AuNPs con uniones tiolato (S-Au) para formar la funcionalización, así se reducirá de nuevo la energía superficial y se estabilizarán las AuNPs. El color final de las AuNPs desde este instante fue de un color café oscuro, intensificado por la gran cantidad de AuNPs que se obtienen.

Esta unión S-Au, se debe a que el H del enlace S-H, en disolución sufre una conversión oxidativa a agua. Esta nueva interacción del enlace S-Au es suficiente para retener los ligandos de forma duradera y evitar una desorción de estos a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo de agitación, se separó nuevamente la fase orgánica de la acuosa en el embudo de decantación, ya que el BHNA se encontraba en una disolución acuosa.



Figura 56. Segunda separación de la fase orgánica.

Tras separar nuevamente la fase orgánica, esta se evaporó en un rotavapor, el cual realiza una destilación a vacío que permite la evaporación rápida de un disolvente en una disolución. Se dejó en el matraz de destilación la mezcla coloidal hasta unos 10 mL. La puesta en marcha del rotavapor se encuentra explicada en el punto '2.- Puesta en marcha de un rotavapor' del anexo.



Figura 57. Etapa de concentración de las AuNPs-thiol en el rotavapor.

Tras evaporar parte de la fase orgánica, ésta se mezcló con unos 400 mL de etanol absoluto en un vaso de 500 mL para eliminar el exceso de DT no funcionalizado ya que el DT es soluble en etanol así como el exceso de TOA⁺.



Figura 58. Volumen final de las AuNPs-thiol tras la etapa de concentración en el rotavapor.



Figura 59. Adición de etanol en las AuNPs-thiol para purificar.

A continuación, la mezcla se almacenó en el mismo vaso de precipitados tapado durante al menos 10 horas a -18°C .

Pasadas las 10 horas de almacenamiento, se observó un precipitado marrón oscuro debido a la aglomeración de las AuNPs.



Figura 60. Aspecto de las AuNPs-tiol tras la congelación.

A partir de ahora, el método Brust-Schiffrin, consistió principalmente en etapas de purificación de las AuNPs funcionalizadas con DT. El método original de Brust-Schiffrin filtra a vacío la mezcla y este paso se abordó filtrando en un Kitasatos y lavando con etanol absoluto.



Figura 61. Filtración a vacío en Kitasatos de la mezcla coloidal de AuNPs-tiol.



Figura 62. Aspecto de las AuNPs-tiol en el filtro.

Finalmente, al producto recuperado en el filtro, se le añadieron 10 mL de tolueno medidos en probeta para separar las aglomeraciones de las AuNPs y redispersarlas, después se añadieron otros 400 mL de etanol absoluto para mantener así la mezcla coloidal de AuNPs-tiol para un posterior almacenamiento con refrigeración en un frasco de vidrio de 500 mL cerrado y cubierto con Parafilm.

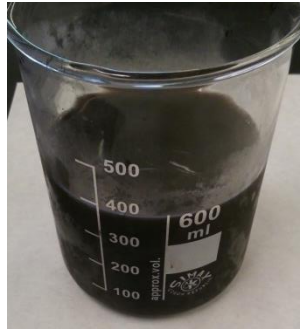


Figura 63. Mezcla coloidal final de AuNPs-tiol en etanol.

Para el método de Brust-Schiffrin, se han realizado en total cinco síntesis para conocerlo, optimizarlo y ponerlo a punto en el laboratorio, así como el diseño de variaciones del método como por ejemplo, realizar una nueva funcionalización mediante glicina:

Obtención de AuNPs-tiol. Síntesis primera: el método Brust-Schiffrin, no hace ninguna alusión acerca de las condiciones del tiempo de adición del BHNA, donde sólo indica que sea lento, ni a la velocidad de agitación, la cual sólo indica que debe ser vigorosa. Tampoco hace alusiones a las condiciones en las que debe operar el rotavapor ni cuál debe ser el filtro adecuado para este tipo de mezcla coloidal. Aunque sí indica el tiempo de reacción, que debe ser de 3 horas, que a la mezcla coloidal se le añaden 400 mL de etanol y que se debe congelar la mezcla durante al menos 4 horas.

Por tanto, como la adición se indica sea lenta, se establecieron 15 minutos de partida, para la agitación se comenzó con 700 rpm, las condiciones del rotavapor, se establecieron en base a los puntos de ebullición de los componentes que hay en la mezcla, y por último el tiempo de congelación se consideró que 4 horas es el mínimo para congelar y que el hecho de estar más tiempo congeladas, no es un factor determinante ni que altere los resultados finales.

En base a lo comentado, se establecieron estas condiciones para la primera síntesis:

- Tiempo adición del BHNA: 15 minutos.
- Agitación de las AuNPs con tiol: 700 rpm.
- Tiempo de reacción: 3 horas.
- Velocidad del rotavapor: 60 min⁻¹.
- Temperatura del rotavapor: 90°C.
- Almacenamiento de la mezcla coloidal con 400 mL de etanol.
- Tiempo de congelación a -20°C: 16 horas.



Esta síntesis, al ser la primera, se destinó a conocer el método y a probar a realizar la filtración a vacío en Kitasatos con papel de filtro.

Se observó que el papel de filtro condujo a una gran adherencia de las AuNPs, sin realmente obtener una selección de tamaños y sin posibilitar su recuperación del papel de filtro.

Obtención de AuNPs-tiol. Síntesis segunda: se redujo el tiempo de adición del BHNA para intentar aumentar la monodispersidad de la mezcla, en cambio, la agitación se decidió aumentar a 700 rpm porque en la primera síntesis la fase acuosa no se mezcló con la fase orgánica completamente. La mezcla coloidal además de mezclarse con etanol, se mezcló con otros disolventes para poder encontrar las mejores condiciones y conocer la influencia de los disolventes en las AuNPs-tiol.

- Tiempo adición del BHNA: 5 minutos.
- Agitación de las AuNPs con tiol: 800 rpm.
- Tiempo de reacción: 3 horas.
- Velocidad del rotavapor: 60 min⁻¹.
- Temperatura del rotavapor: 90°C.
- Almacenamiento de la mezcla coloidal con 100 mL de etanol, otras AuNPs-tiol en 200 mL de cloroformo y otras AuNPs-tiol en 100 mL de hexano.
- Tiempo de congelación a -20°C: 10 horas.

En esta síntesis, tras la congelación de las AuNPs, se separó por un lado la parte clarificada y por otro lado la parte decantada, optando en esta primera etapa por decantar en vez de por filtrar en un Kitasatos.

La parte clarificada se llevó al rotavapor para evaporar el etanol y obtener las AuNPs de menor tamaño en estado sólido, así como conocer su comportamiento ante el calor. Tras obtener las AuNPs en estado sólido, se observaban con un aspecto ceroso tal y como se muestra en la bibliografía del método original de Brust-Schiffrin (21). Además, este producto sólido es soluble en disolventes no polares como puede ser el tolueno, el pentano y el cloroformo pudiéndose resuspender las AuNPs.



Figura 64. Aspecto de las AuNPs-thiol en estado sólido.

La parte decantada, se filtró a vacío en el Kitasatos y la parte retenida en el papel de filtro se probó a sumergir en 10 mL de tolueno con 100 mL de etanol, aumentando por tanto la relación tolueno/etanol, en vez de 1/40 como marca la bibliografía, a 1/10, ya que el tolueno es el encargado de redispersar las AuNPs. Con esto, se pretendió comprobar que si se aumenta la relación tolueno/etanol, se facilita la recuperación de las AuNPs del papel de filtro. Tras sumergir el papel de filtro, se observó que una gran parte de las AuNPs se desprenden del papel de filtro, resultando notablemente efectivo.

A continuación, se partió en dos porciones el papel de filtro, y un trozo se sumergió en 10 mL de tolueno con 200 mL de cloroformo (relación 1/20) y la otra parte se sumergió en 10 mL de tolueno con 100 mL de hexano (relación 1/10). En ambos casos se logró con bastante éxito recuperar las AuNPs, por lo que se puede observar que el tolueno es realmente efectivo para recuperar las AuNPs del papel de filtro.

Obtención de AuNPs-thiol. Síntesis tercera: en este caso, se optó por seguir aumentando la velocidad de agitación a 900 rpm, ya que 800 rpm no fue suficiente al seguir sin mezclarse del todo la fase orgánica y acuosa. El resto de condiciones no se variaron.

- Tiempo adición del BHNA: 5 minutos.
- Agitación de las AuNPs con thiol: 900 rpm.
- Tiempo de reacción: 3 horas.
- Velocidad del rotavapor: 60 min⁻¹.
- Temperatura del rotavapor: 90°C.
- Almacenamiento de la mezcla coloidal con 400 mL de etanol.
- Tiempo de congelación a -20°C: 18 horas.

En esta síntesis, se tomaron muestras en tubos cilíndricos de vidrio de 1 cm de paso óptico, para realizar a continuación análisis espectroscópicos Uv-vis de cada etapa del proceso de síntesis de las AuNPs funcionalizadas con DT con el fin de controlar la reproducibilidad del proceso.

Se emplearon tubos de vidrio en vez de cubetas de cuarzo ya que en este caso el vidrio no absorbe a las longitudes de onda de trabajo. El rango típico donde es apto el vidrio es entre 340 nm y 2500 nm.

Las etapas de las cuales se tomaron muestras, se han enumerado del siguiente modo:

1. Fase orgánica extraída en el momento en el que se mezcla la disolución acuosa de cloruro de oro con la disolución de TOAB en tolueno, donde los aniones AuCl_4^- se rodean de los cationes TOA^+ y se transfieren de la fase acuosa a la fase orgánica.
2. Instante de cambio al añadir el BHNA donde se pasa de Au^{3+} a Au^0 y se funcionalizan las AuNPs con DT.
3. Momento en que se ha añadido todo el BHNA y donde las AuNPs adquieren el color café oscuro casi negro.
4. Instante antes de congelar las AuNPs donde se añade 400 mL de etanol para purificar.



Figura 65. Muestras en distintas etapas del proceso (19/10/15, 17:35 horas).



Figura 66. Muestras en distintas etapas del proceso (19/10/15, 17:50 horas).

Se puede observar que ya incluso antes de congelar las AuNPs en etanol, precipitan en cuestión de minutos debido a las aglomeraciones que se producen por no haber añadido aún el tolueno para redispersar las aglomeraciones.

En esta síntesis, también se tomó una muestra de las AuNPs funcionalizadas con DT en su etapa final en un recipiente y se dejaron evaporar a temperatura ambiente. Pasados 2 días, se observa nuevamente una capa cerosa tal y como se expone en la bibliografía del método de Brust-Schiffrin (21) cuando se llevaban al rotavapor para obtener su forma sólida.



Figura 67. AuNPs-tiol en estado sólido con capa cerosa al evaporarse a temperatura ambiente.



Figura 68. AuNPs-tiol en estado sólido separadas de la capa cerosa.

Para conocer si el causante del aspecto ceroso es el TOAB, se realizó una prueba tomando TOAB en un recipiente y dejándolo evaporar a temperatura ambiente. Pasados 5 días, el TOAB presentó el mismo aspecto ceroso, luego, podría ser el causante de ese aspecto en las AuNPs.

Obtención de AuNPs-tiol. Síntesis cuarta: se decidió aumentar el tiempo de adición del BHNA en 2 minutos, aumentar nuevamente la velocidad de agitación para asegurar la correcta mezcla de fases, probar a mantener una hora más la reacción de formación de las AuNPs y por último probar otro disolvente nuevo no empleado en las síntesis anteriores.

- Tiempo adición del BHNA: 7 minutos.
- Agitación de las AuNPs con tiol: 1000 rpm.
- Tiempo de reacción: 4 horas.
- Velocidad del rotavapor: 60 min⁻¹.
- Temperatura del rotavapor: 90°C.
- Almacenamiento la mitad con 400 mL de etanol y la otra mitad con 400 mL de metanol.
- Tiempo de congelación a -20°C: 16 horas.

En esta síntesis, se repitió el método de Brust-Schiffrin, pero duplicando los volúmenes para almacenar la mitad de AuNPs-tiol en etanol y la otra mitad en metanol, para comprobar si el metanol resulta mejor disolvente que el etanol por emplearse en algunas bibliografías (22).

Tras la etapa de congelación, se observó que las AuNPs-tiol, no presentan el mismo aspecto en etanol que en metanol.



Figura 69. AuNPs-tiol en etanol tras congelar.



Figura 70. AuNPs-tiol en metanol tras congelar.



Se puede observar, que en metanol, están menos precipitadas, poseen un aspecto ligeramente más oscuro y están algo menos aglomeradas, pero hasta que no se caractericen, no se pueden obtener más conclusiones a parte de las visuales.

Obtención de AuNPs-glicina. Síntesis quinta: como los espectros resultantes en la síntesis tercera coincidían con la bibliografía, se mantuvieron las condiciones de trabajo sin hacer modificaciones en este sentido, pero se cambió el agente funcionalizante, en vez de tiol a una amina, con la intención de obtener AuNPs con otro tipo de recubrimiento.

- Tiempo adición del BHNA: 5 minutos.
- Agitación de las AuNPs con tiol: 900 rpm.
- Tiempo de reacción: 3 horas.
- Velocidad del rotavapor: 60 min⁻¹.
- Temperatura del rotavapor: 90°C.
- Almacenamiento de la mezcla coloidal con 400 mL de etanol.
- Tiempo de congelación a -20°C: 15 horas.

En esta ocasión, se diseñaron AuNPs funcionalizadas con glicina (AuNPs-glicina). Hasta el momento no ha aparecido en la bibliografía ningún ejemplo de este tipo de funcionalización, por lo que los resultados obtenidos suponen un aporte nuevo del grupo UVaSens al conocimiento general de las AuNPs.

La diferencia aparentemente más relevante al funcionalizar las AuNPs con glicina, es que su color es completamente diferente al caso de las AuNPs-tiol que presentaban un color casi negro. En este caso, presentan un color similar al vino tinto. Como se sabe, si el color de la NP cambia, significa que el tamaño o la forma van a ser diferentes al caso de las AuNPs-tiol.

En la etapa consistente a la adición del BHNA (agente reductor), las AuNPs pasaron de un color dorado oscuro, a un color dorado más claro, para alcanzar un color final que recuerda al vino tinto.

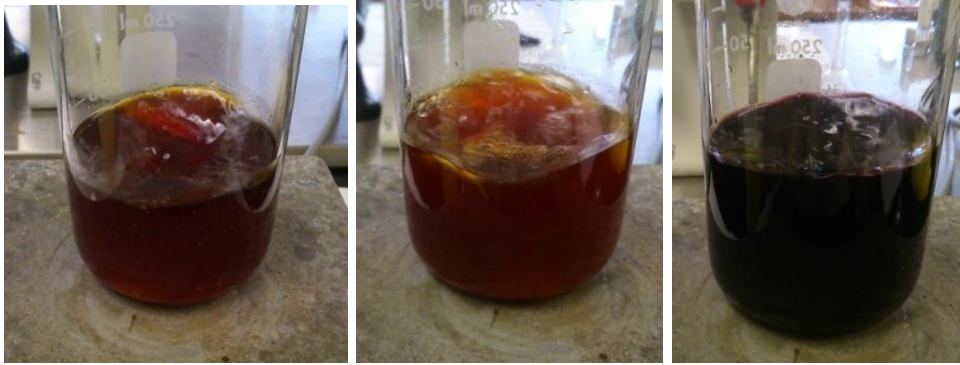


Figura 71. De izquierda a derecha, antes de añadir el borohidruro de sodio, instante de cambio y al finalizar la adición del borohidruro de sodio.

Nuevamente, se tomaron muestras en tubos cilíndricos de vidrio de 1 cm de paso óptico, para realizar análisis espectroscópicos Uv-vis de las tres etapas mostradas anteriormente al añadir el BHNA, las cuales corresponden al instante anterior de la adición, en el momento del cambio, y una vez añadido todo el BHNA.



Figura 72. Muestras en las tres etapas durante la adición del agente reductor a las AuNPs-glicina.

Durante la etapa de concentración en el rotavapor, se observó el siguiente aspecto de la mezcla coloidal:



Figura 73. Etapa de concentración en el rotavapor de las AuNPs-glicina.

Una vez finalizada la etapa de concentración en el rotavapor, si se observa la mezcla coloidal en el matraz de destilación, se pudo ver una superficie compuesta de posibles puntos cuánticos (QDs), los cuales una de sus características es el brillo metálico que poseen igual que en el material *bulk*.



Figura 74. Mezcla coloidal de AuNPs-glicina y aparición de puntos cuánticos.

Si se retira la mezcla orgánica, se puede observar cómo quedan adheridos los posibles puntos cuánticos (QDs) en el matraz de destilación.



Figura 75. Puntos cuánticos de AuNPs-glicina adheridos al matraz de destilación de fondo redondo.

En la etapa correspondiente a la adición de los 400 mL de etanol, se apreció que existe una mayor dispersión de tamaño de las AuNPs-glicina, ya que la parte clarificada se presentó mucho más turbia que en el caso de las AuNPs-tiol. Este cambio con respecto a las AuNPs-tiol, pudo deberse a interacciones por puentes de hidrógeno entre las aminas y presentarse así una amplia distribución de tamaños, además de darse tamaños más grandes por esta interacción, ya que el etanol desestabiliza la estructura de la amina, y para estabilizarse las AuNPs, se aglomeran.

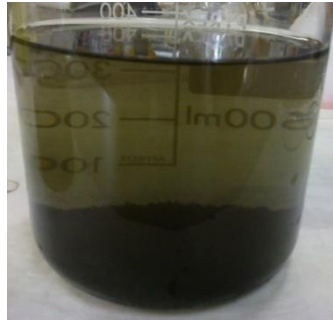


Figura 76. Mezcla coloidal AuNPs-glicina en etanol.

Al igual que en los casos anteriores, la mezcla se almacenó en el congelador, y se realizaron sucesivos lavados con etanol mediante decantaciones, en vez de con filtraciones a vacío en el Kitasatos, ya que no concluyó que no disponen de los filtros adecuados.

Finalmente, se almacenó la mezcla coloidal con 400 mL de etanol y 10 mL de tolueno a refrigeración (relación 1/40).

Por otro lado, al igual que se obtuvo las AuNPs-tiol en estado sólido, se hizo lo mismo con las AuNPs-glicina, para observar qué aspecto presentaban en estado sólido y su comportamiento ante el calor.

Para ello, se tomó una parte de la mezcla coloidal y se llevó al rotavapor a una velocidad de 60 min^{-1} y 90°C . Una vez finalizada la evaporación, se observó que en las paredes del matraz de destilación y recubriendo las AuNPs, apareció algo semejante a una estructura cristalina en forma de varillas orientadas.



Figura 77. Aspecto de las AuNPs-glicina en estado sólido en el matraz de destilación de fondo redondo.

A la vista de este hallazgo, se probó a realizar disoluciones con glicina y llevarlas al rotavapor, para observar si se puede obtener de nuevo la fase sólida con estructuras en forma de varillas orientadas. Los resultados dieron la glicina con su estructura original antes de realizar la disolución, tal y como puede verse en la siguiente figura:



Figura 78. Aspecto de la glicina en el matraz de destilación de fondo redondo.

Por otro lado, se recogió la parte sólida de las AuNPs-glicina tras la etapa del rotavapor, y se observó que nuevamente tienen un aspecto ceroso y de color similar a las AuNPs-tiol.

Al ser el ligando diferente, y el TOAB estar en ambas AuNPs, este podría ser nuevamente otro motivo para pensar que el exceso de TOAB es el responsable de este aspecto ceroso.



Figura 79. De izquierda a derecha: AuNPs-tiol y AuNPs-glicina en estado sólido.

El resto de la mezcla coloidal de AuNPs-glicina se almacenó a refrigeración, pero a diferencia de las AuNPs-tiol, al pasar un día, la mezcla coloidal es inestable, provocando la precipitación de las AuNPs-glicina.

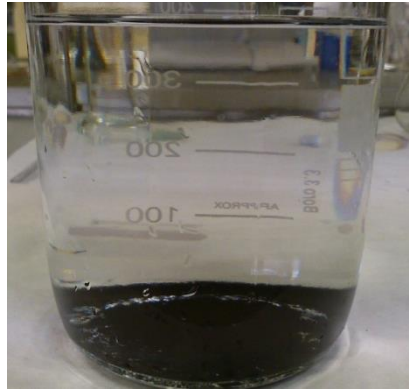


Figura 80. Aspecto final de la mezcla coloidal AuNPs-glicina pasado un día.

A la vista de esta inestabilidad del coloide, se realizaron pruebas con distintos disolventes, para conocer la capacidad de estabilizar cada disolvente la mezcla coloidal en el tiempo. Para ello se eliminó la máxima cantidad de sobrenadante, y la parte precipitada se repartió en cuatro vasos de precipitados de 100 mL cada uno, del siguiente modo:

1. AuNPs sin disolvente, para secarse completamente a temperatura ambiente.
2. AuNPs en 40 mL de tolueno tapado con Parafilm.
3. AuNPs en 40 mL de buffer fosfato 0.01 M tapado con Parafilm.
4. AuNPs en 40 mL de cloroformo tapado con Parafilm.

Las AuNPs-glicina almacenadas en los distintos disolventes (tolueno, buffer fosfato y cloroformo) se guardaron en refrigeración durante 2 días, para ver su capacidad de estabilizar el coloide. Pasado dicho tiempo, se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El etanol se evaporó completamente y las AuNPs-glicina no mostraban aspecto ceroso como cuando se concentraban en el rotavapor, ni como cuando las AuNPs-tiol se dejaron secar a temperatura ambiente. Además, se siguió observándose el brillo metálico.



Figura 81. AuNPs-glicina sólidas a temperatura ambiente.

2. En tolueno, las AuNPs-glicina, se encontraban altamente aglomeradas.

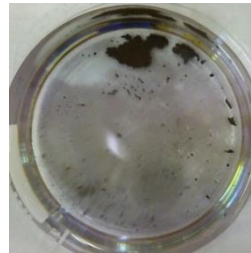


Figura 82. AuNPs-glicina en tolueno.

3. En buffer fosfato, las AuNPs-glicina, se encontraban aglomeradas, y con la existencia de una mínima cantidad de AuNPs-glicina en la interfase, debido a la alta tensión superficial.



Figura 83. AuNPs-glicina en buffer fosfato 0.01 M.

4. En cloroformo, las AuNPs-glicina, apenas se aglomeraban, aunque al igual que en los casos anteriores, se encontraban precipitadas en el fondo.



Figura 84. AuNPs-glicina en cloroformo.

Las tres muestras en los distintos disolventes, se llevaron al baño ultrasonidos (Ultrasons Selecta), y se comprobó que el buffer fosfato era incapaz de redispersar las AuNPs-glicina y pasada una hora, quien mejor mantenía el coloide era el tolueno.

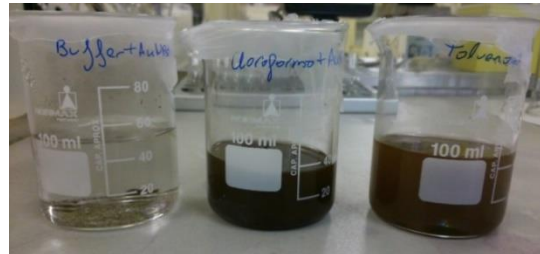


Figura 85. AuNPs-glicina en distintos disolventes (buffer fosfato, cloroformo y tolueno) tras ultrasonidos.



Figura 86. AuNPs-glicina en distintos disolventes (buffer fosfato, cloroformo y tolueno) una hora después tras ultrasonidos.

Por otro lado, con el volumen de AuNPs-glicina sobrante del frasco de 500 mL, se hicieron pruebas con 10 mL de mezcla coloidal con nuevas membranas adquiridas mediante filtración a vacío en un Kitasatos en vez de con papel de filtro.

Tras filtrar con las distintas membranas, se observó que no funcionan adecuadamente y siguen quedando casi la totalidad adheridas, aunque si se raspaba la membrana con una espátula, se recuperaban con mayor facilidad que en el caso del papel de filtro.



Figura 87. Aspecto de distintas membranas tras filtrar a vacío AuNPs-glicina.

3.3.- Caracterización de AuNPs mediante espectroscopia de absorción Uv-vis:

Para comenzar las mediciones en Uv-vis, se encendió el ordenador, se arrancó el equipo y se pulsó el canal F4 del espectrofotómetro. El equipo comenzó a chequear parámetros como los observados en la figura 88:



Figura 88. Chequeo parámetros del espectrofotómetro Uv-Vis Shimadzu 1603.

Una vez chequeados los parámetros, se entró en el software 'Uv Probe':

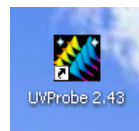


Figura 89. Icono del programa UvProbe 2.43.

La ventana del programa presenta el aspecto de la figura 90, donde se seleccionó el modo 'Spectrum' para este caso:

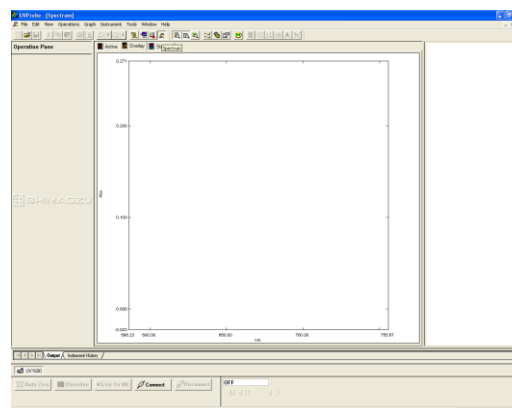


Figura 90. Ventana del programa UvProbe 2.43.

En la barra de herramientas del programa, se seleccionó el método, donde se permite configurar diferentes propiedades como por ejemplo la velocidad de barrido, el número de muestras, el intervalo de longitudes de onda, etc.

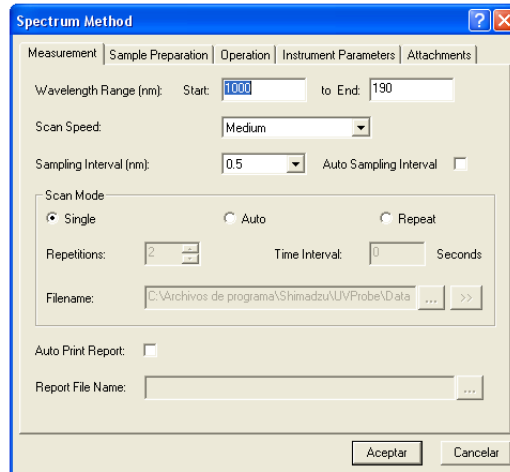


Figura 91. Ventana Spectrum Method del programa UvProbe 2.43.

Tras configurar todo lo necesario, se pulsó el botón 'connect', que permite al espectrofotómetro interactuar con el software. Tras pulsar dicho botón, apareció una ventana de chequeo donde todos los aspectos a revisar deben de mostrarse en color verde:

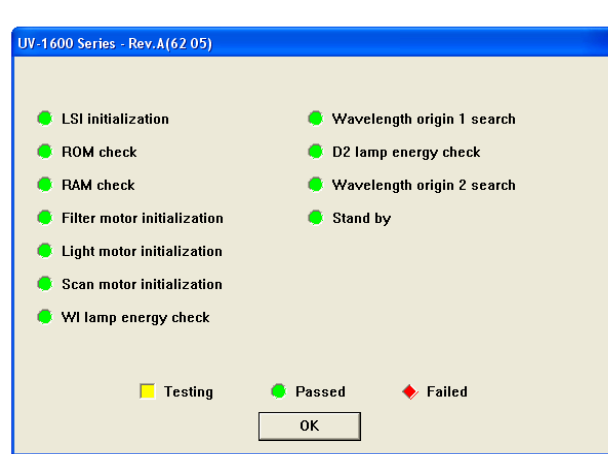


Figura 92. Ventana de chequeo del espectrofotómetro en el programa UvProbe 2.43.

Una vez pulsado 'ok', el equipo procede a ajustar las lámparas de deuterio y wolframio del espectrofotómetro.

Al finalizar dicho ajuste, se seleccionó 'baseline' con el equipo en vacío (es decir, sin muestras ni blancos, ya que es la línea base) y seleccionando un barrido de 1000 nm a 190 nm.

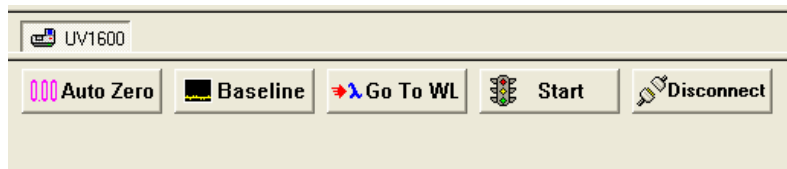


Figura 93. Baseline (línea base).

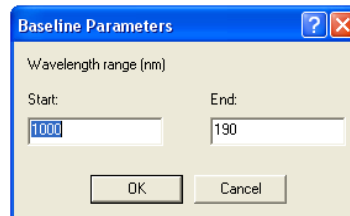


Figura 94. Ventana Baseline Parameters del programa UvProbe 2.43.

Finalizada esta etapa, el equipo ya estaba listo para hacer mediciones.



Figura 95. Colocación de las cubetas en el espectrofotómetro, la cubeta de abajo es la muestra y la cubeta de arriba es el blanco.

3.3.1.- Uv-vis de AuNPs obtenidas por el método de Turkevich:

Se realizaron los espectros de las AuNPs sintetizadas por Turkevich de coloración roja (reducidas con 1 mL de citrato) y de coloración morada (reducidas con 0.2 mL de citrato).

Para ello, se midieron 3 mL de muestra y se vertieron a un tubo cilíndrico de vidrio de 1 cm de paso óptico previamente limpio con acetona, aclarado con agua destilada y seco. Dicho tubo se alojó donde se sitúan las muestras en el equipo.

Por otro lado, se tomó otro tubo cilíndrico de vidrio de 1 cm de paso óptico limpio de igual manera y se añadieron 3 mL de agua destilada. Se usó agua destilada porque la mezcla coloidal de AuNPs se encuentra en fase acuosa. Así mismo, se alojó el tubo donde se sitúan los blancos en el equipo.

Todos los tubos se manejaron con guantes de látex y asegurando que no existieron huellas o manchas que falseen las posteriores lecturas.

La figura 96 recoge los espectros Uv-vis de las AuNPs obtenidas mediante la síntesis de Turkevich en dos condiciones experimentales distintas, es decir, con distinta concentración de agente reductor, para obtener dos tamaños diferentes de estas.

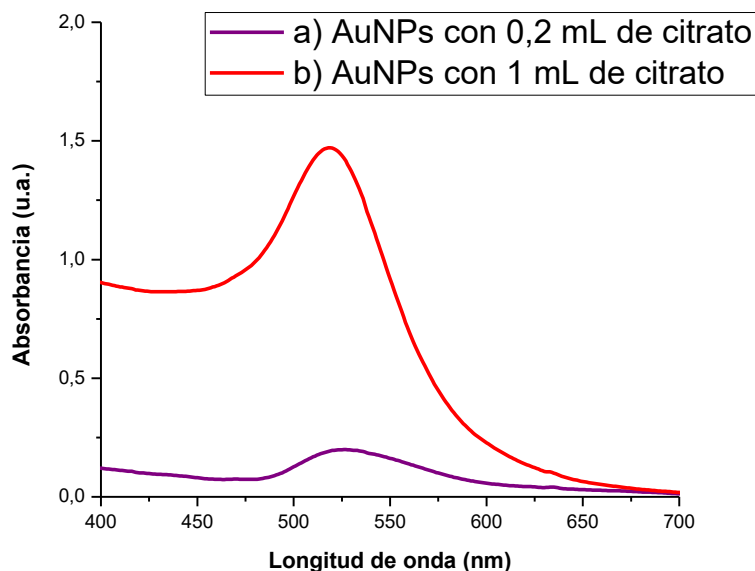


Figura 96. Espectro Uv-vis con: a) AuNPs de gran tamaño formadas por la adición de 0.2 mL de citrato de sodio dihidratado en fase acuosa. b) AuNPs de pequeño tamaño formadas por la adición de 1 mL de citrato de sodio dihidratado en fase acuosa.



Se observa que la mezcla coloidal de AuNPs de coloración morada (reducidas con 0.2 mL de citrato) presenta un pico del plasmón a 527 nm y una absorbancia máxima de 0.19937 u.a., mientras que la mezcla coloidal de AuNPs de coloración roja (reducidas con 1 mL de citrato) presenta un pico del plasmón a 519 nm y una absorbancia máxima de 1.417 u.a.

Como se sabe, a mayor longitud de onda, mayor tamaño de la AuNP, mientras que a menor longitud de onda, menor tamaño de la AuNP, luego las AuNPs de coloración morada (reducidas con 0.2 mL de citrato) cuyo pico del plasmón se encuentra a 527 nm, son de mayor tamaño que las AuNPs de coloración roja (reducidas con 1 mL de citrato) cuyo pico del plasmón se encuentra a 519 nm.

Por tanto, a mayor concentración de agente reductor, aumenta la capacidad de estabilización de AuNPs pequeñas, lo que impide su agregación, mientras que a menor concentración, no se cubre completamente la superficie de las AuNPs, lo que conduce a su agregación para disminuir su energía superficial, y por tanto, a la formación de AuNPs de mayor tamaño como se refleja en el espectro de la figura 96.

En cuanto a la absorbancia, a mayor absorbancia, mayor concentración de AuNPs, luego las AuNPs de coloración roja (reducidas con 1 mL de citrato) presentan mayor absorbancia, ya poseen una alta concentración de citrato y esto conduce a una mayor formación de AuNPs, mientras que las AuNPs de coloración morada (reducidas con 0.2 mL de citrato) presentan una menor absorbancia por tener menor concentración de citrato, y formarse un menor número de AuNPs, las cuales además se agregan como se ha comentado anteriormente.

Por tanto, se concluye que a mayor concentración de citrato, menor tamaño de la AuNP y mayor concentración de AuNPs en la mezcla coloidal.

3.3.2.- Uv-vis de AuNPs obtenidas por el método de Brust-Schiffrin:

Las AuNPs, en términos generales, se caracterizan por presentar un plasmón superficial entre los 500 nm y los 600 nm según el tamaño de la AuNP, sin embargo, cuando este tamaño es inferior a los 2 nm esta banda del plasmón es inapreciable y a las AuNPs en este momento se les denomina clústeres.

En el caso de este proyecto, se hicieron espectros de las síntesis de Brust-Schiffrin segunda, tercera, cuarta y quinta, la primera se descarta, ya que se hicieron las posteriores síntesis más optimizadas.

Al igual que con las AuNPs obtenidas por el método de Turkevich, con una micropipeta se midieron 3 mL de muestra y se vertieron a un tubo cilíndrico de vidrio de 1 cm de paso óptico previamente limpio con acetona, aclarado con agua destilada y seco. Dicho tubo se alojó donde se sitúan las muestras en el equipo.

Por otro lado, se tomó otro tubo cilíndrico de vidrio de 1 cm de paso óptico limpio de igual manera y se añadieron 3 mL del disolvente correspondiente en cada caso. Así mismo, se alojó el tubo donde se sitúan los blancos en el equipo.

Todos los tubos se manejaron con guantes de látex y asegurando que no existan huellas o manchas que falseen las posteriores lecturas.

La figura 97 presenta los espectros Uv-vis registrados con las AuNPs-tiol de la síntesis segunda.

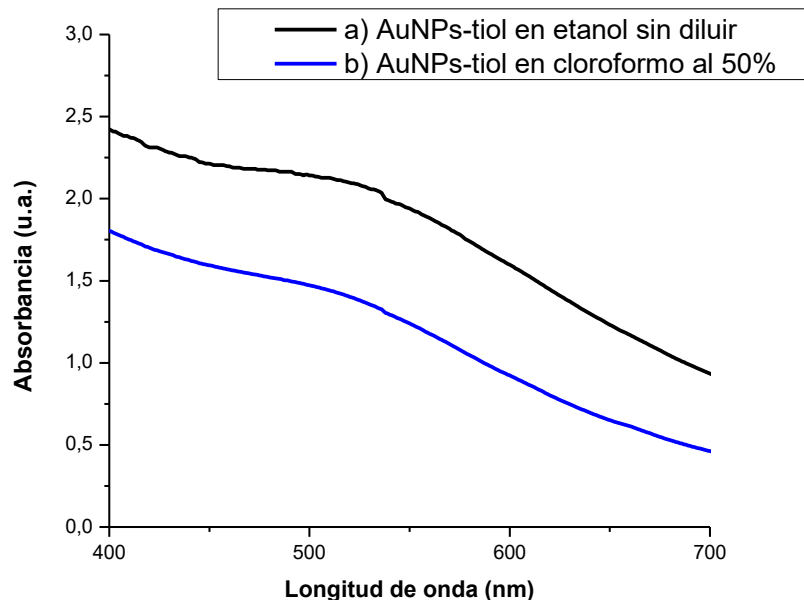


Figura 97. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en etanol sin diluir. b) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en cloroformo con dilución de cloroformo al 50%.

Debido a que la suspensión coloidal de AuNPs-tiol en cloroformo, saturaba las mediciones de absorbancia, se realizó una dilución con cloroformo al 50%.

La anchura del plasmón de resonancia es elevado, debido a la alta polidispersidad de la mezcla coloidal debido a la lenta adición del reductor, además, se observa el pico del plasmón de resonancia a 515 nm en el caso de AuNPs-tiol en etanol, y ligeramente superior en el caso de AuNPs-tiol en cloroformo.

Tras el análisis del espectro de la figura 97, se concluye que el disolvente puede influir ligeramente en el tamaño de la AuNP.

La figura 98 muestra los espectros de las AuNPs-tiol obtenidas en la síntesis tercera y que corresponden con las distintas etapas del proceso con la intención de mejorar el control de las condiciones de síntesis.

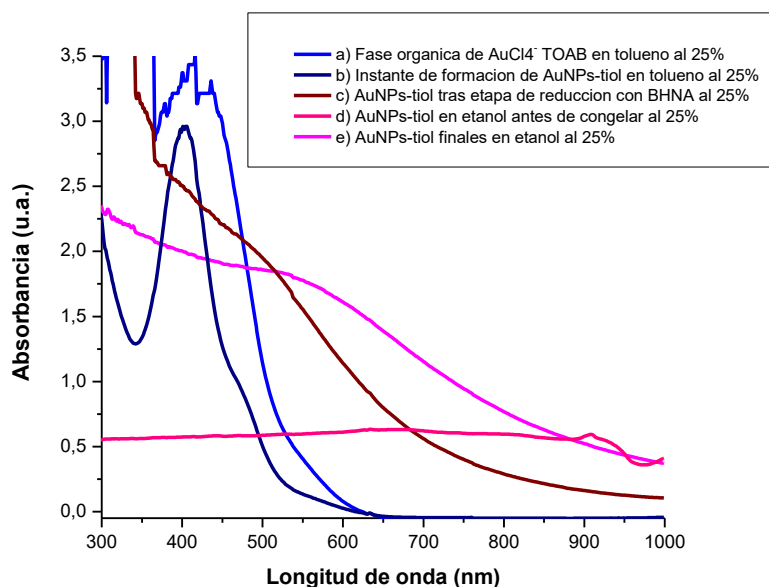


Figura 98. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de fase orgánica de AuCl₄-TOAB en tolueno al 25% b) 3 mL de mezcla coloidal de AuNPs-tiol en tolueno al 25%. c) 3 mL de AuNPs-tiol tras la etapa de reducción con BHNA al 25%. d) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol antes de congelar al 25%. e) 3 mL de AuNPs-tiol finales en etanol al 25%.

El espectro a) corresponde al momento en el que se extrae la fase orgánica del embudo de decantación al mezclar la solución acuosa de cloruro de oro y la solución de TOAB en tolueno. En este momento, los aniones AuCl₄⁻ se rodean de cationes TOA⁺, para transferirse de la fase acuosa a la fase orgánica, por lo tanto, se forman AuNPs estabilizadas con TOA⁺ de muy pequeño tamaño, ya que su plasmón se sitúa en 417 nm. Como nuevamente se saturaban las medidas de absorbancia se realizó una dilución al 25% con tolueno.

El espectro b) corresponde al momento en el que una vez añadido el DT, se reducen las AuNPs del Au³⁺ al Au⁰ debido al agente reductor BHNA y estas a su vez se funcionalizan con el DT, obteniéndose las AuNPs-tiol. Se observa un plasmón a 404 nm muy definido y estrecho y un hombro a 480 nm. En este instante, el proceso de funcionalización está empezando y hay que mantener la reacción con agitación durante 3 horas para obtener las AuNPs-tiol finales.

El espectro c) corresponde al momento en el que ya se han funcionalizado las AuNPs-tiol y se obtiene el color oscuro casi negro final de estas AuNPs. En este momento se obtiene un plasmón ancho debido a la polidispersidad, y con un pico a 487 nm.

El espectro d) corresponde al momento en el que las AuNPs-tiol se resuspenden en etanol tras el filtrado, para ser congeladas, en este caso, la suspensión coloidal precipita y no se puede medir correctamente, ni sacar resultados adecuados.

El espectro e) corresponde a las AuNPs-tiol en etanol finales, el plasmón es de aspecto similar al espectro c), pero presentando un pico a 571 nm.

Con esta información se puede establecer un control en la síntesis así como mejorar la reproducibilidad de los experimentos.

La figura 99, recoge los espectros de las AuNPs-tiol en etanol y en metanol a dos concentraciones diferentes.

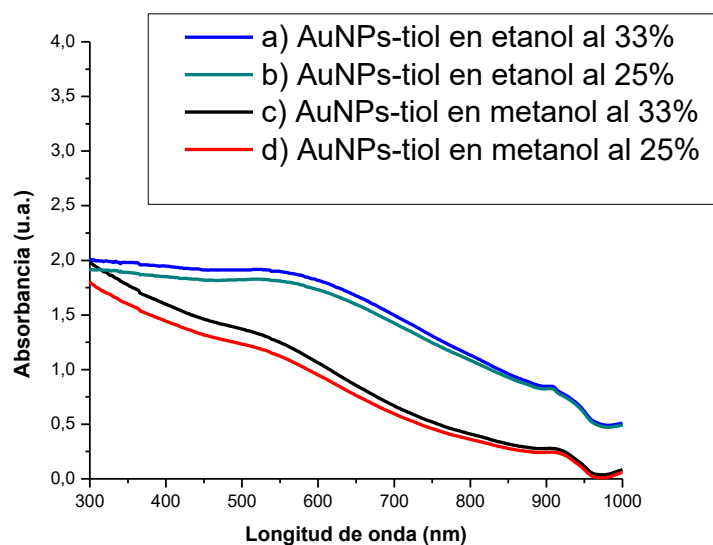


Figura 99. Espectro Uv-vis con: a) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol al 33%. b) 3 mL de AuNPs-tiol en etanol al 25%. c) 3 mL de AuNPs-tiol en metanol al 33%. d) 3 mL de AuNPs-tiol en metanol al 25%.

Esta cuarta síntesis, se destinó, para estudiar las diferencias entre mantener la suspensión coloidal de AuNPs-tiol en etanol o en metanol. Como se observa, los espectros de las AuNPs-tiol en etanol, son diferentes que en metanol, ya que el pico del plasmón se sitúa en valores ligeramente inferiores en el caso de AuNPs-tiol en metanol (539 nm) que en el caso de AuNPs-tiol en etanol (574 nm).

Esto indica vuelve a indicar que el disolvente influye en el tamaño de las AuNPs o en su forma de agregarse.

La figura 100, representa el espectro correspondiente a las AuNPs-glicina obtenidas en la síntesis quinta.

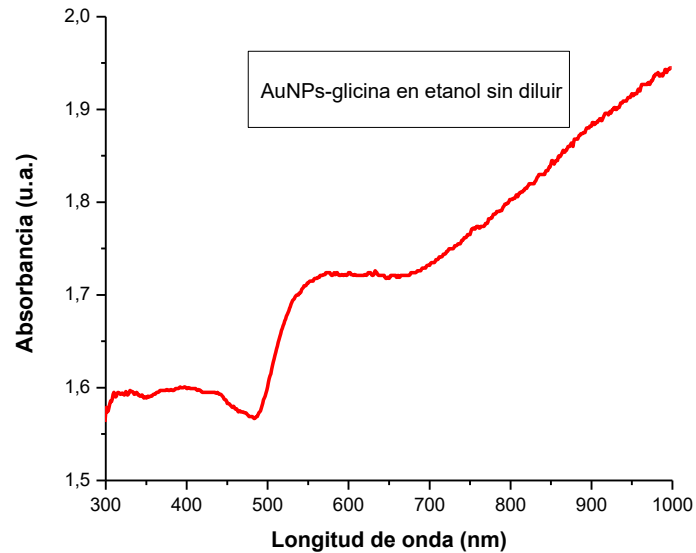


Figura 100. Espectro Uv-vis con 3 mL de AuNPs-glicina en etanol sin diluir.

En este caso, se observa que la anchura del plasmón es muy elevada, marcando una notable polidispersidad y su pico se sitúa en 543 nm. A la vista de este espectro, no se pueden sacar conclusiones aparte de que su forma es desconocida y que para los objetivos de este proyecto, se descarta en el uso de sensores.

También, se realizaron espectros de los disolventes así como de los ligandos, los cuales se encuentran recogidos en el punto '1.- Espectros Uv-vis de disolventes y ligandos' del anexo.

Para finalizar este estudio de espectrofotometría Uv-vis, se presentan las comparaciones de los espectros de las AuNPs en su forma final.

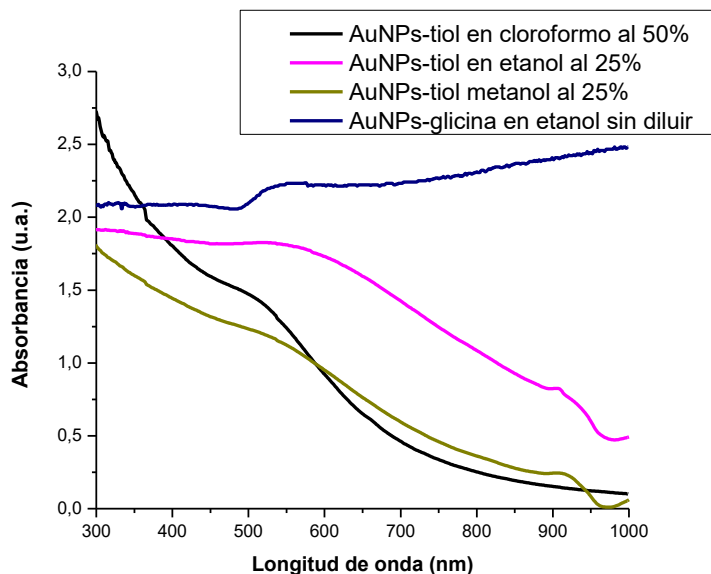


Figura 101. Espectro Uv-vis comparativo entre AuNPs-tiol finales en distintos disolventes (cloroformo, etanol, metanol) y AuNPs-glicina en etanol en 3 mL cada muestra.

Como se observa, los plasmones se sitúan en todos los casos entre 500 nm y 600 nm tal y como muestra la bibliografía de Prasad y colaboradores (22), además, estos plasmones son anchos debido a la polidispersión de tamaños. Si se realizan técnicas de purificación, se reduciría la distribución de tamaños y por tanto la anchura del plasmón.

Tras esta comparativa se puede concluir que los plasmones de las AuNPs-tiol cambian levemente en función del disolvente en el que se encuentren, mientras que las AuNPs-glicina poseen un espectro completamente diferente a los mostrados de AuNPs-tiol, aunque su plasmón se sigue situando en longitudes de onda semejantes.

3.4.- Caracterización de AuNPs mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier:

Las AuNPs-tiol se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en el infrarrojo medio (de 4000 a 400 cm^{-1}) para comprobar la funcionalización de las AuNPs con los tioles, analizando la presencia de la banda del enlace tiolato (S-Au), o la ausencia de la banda del enlace tiol (S-H).

Para la preparación de las muestras, se optó por la preparación de pastillas de KBr, ya que la muestra a analizar aunque sea líquida, está en forma de coloide con un disolvente altamente volátil.

Se prepararon pastillas de KBr de 13 mm con distintas concentraciones de muestra y de varios tipos de muestras. Las muestras analizadas fueron las AuNPs-tiol suspendidas en cloroformo, las AuNPs-tiol suspendidas en hexano y las AuNPs-tiol suspendidas en etanol.

El detalle de la preparación de pastillas de KBr, se encuentra ampliamente explicado en el punto '3.- Protocolo 1: preparación de muestras sólidas con KBr para análisis en FT-IR' del anexo de este proyecto.

El procedimiento fue el siguiente: con una espátula y sobre un vidrio de reloj se pesó 0.1 g de KBr que se llevó a un mortero de ágata previamente limpio y seco. A continuación, con la ayuda de una micropipeta se añadieron las gotas precisas en cada muestra de AuNPs y se procedió a moler la mezcla durante al menos 3 minutos.

Una vez lista la mezcla, se llevó al molde de pastillas de KBr con la espátula y se situó en la prensa de laboratorio. Finalizada la etapa de prensado, se extrajo la pastilla de KBr y se almacenó en un desecador.

Se prepararon pastillas de KBr con distintas cantidades de AuNPs-tiol, para buscar las mejores condiciones para los espectros, seleccionando de este modo las siguientes cantidades: 3 gotas de AuNPs-tiol en cloroformo, 3 gotas de AuNPs-tiol en hexano y 5 gotas de AuNPs-tiol en etanol. Las pastillas obtenidas se dispusieron en el portamuestras para su análisis en el espectrofotómetro.



Figura 102. Pastillas de KBr con AuNPs-tiol en el desecador.

También, se registraron los espectros de los disolventes y del 1-dodecanotiol para una mejor interpretación de los espectros.

Además, el análisis de los espectros registrados se apoya por medio de bases de datos y de bibliografía (23).

En el artículo original del método de Brust-Schiffrin, la única alusión que se hace sobre la caracterización por espectroscopia infrarroja, es que los espectros del 1-dodecanotiol y el de las AuNPs-tiol son similares, lo que indica que el 1-dodecanotiol forma parte del material compuesto (21).

En la siguiente figura se muestra el espectro por FT-IR del 1-dodecanotiol, para poder compararlo con los espectros de las AuNPs-tiol.

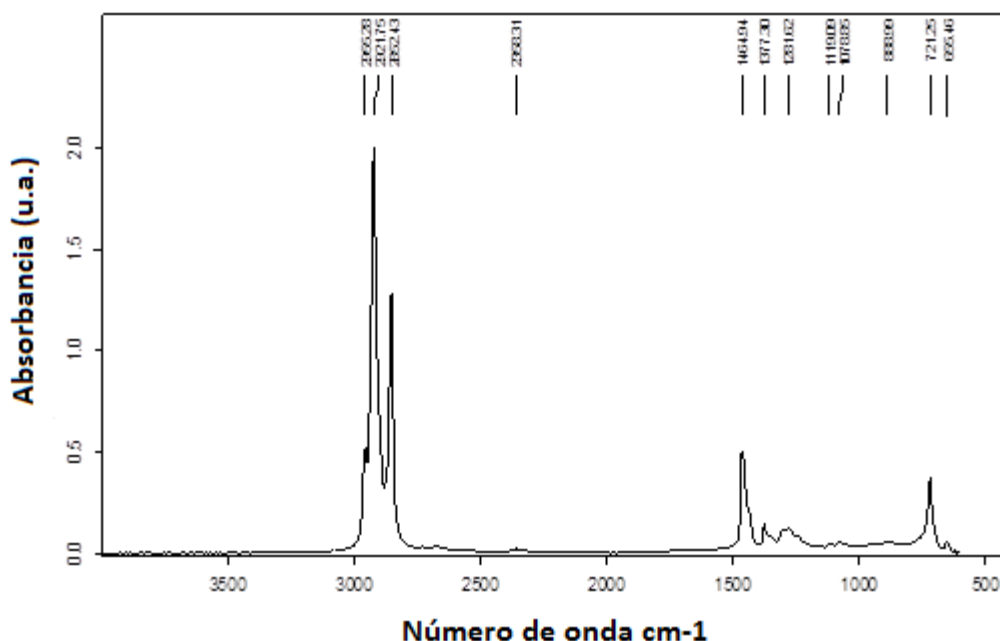


Figura 103. Espectro por FT-IR de 3 gotas de 1-dodecanotiol.

Este espectro se caracteriza por bandas a 1955 y 2852 cm^{-1} que corresponden a la tensión simétrica y asimétrica del CH_3 y del CH_2 . La banda a 1646 cm^{-1} corresponde a la flexión simétrica del CH_2 , mientras que bandas a 2557 cm^{-1} corresponden a la vibración del S-H y a bandas a 721 cm^{-1} del C-S.

En los posteriores espectros, la desaparición de la banda del tiol (S-H) indicará la formación del tiolato (S-Au) y por tanto la adhesión del tiol a la superficie de la AuNP formando dicho enlace tiolato.

A continuación, se muestran los espectros de las AuNPs-tiol en distintos disolventes de partida, así como los espectros de esos disolventes de partida, para poder asegurar su ausencia en los espectros de las AuNPs-tiol.

Para el caso de AuNPs-tiol en mezcla coloidal de cloroformo, se registra el siguiente espectro:

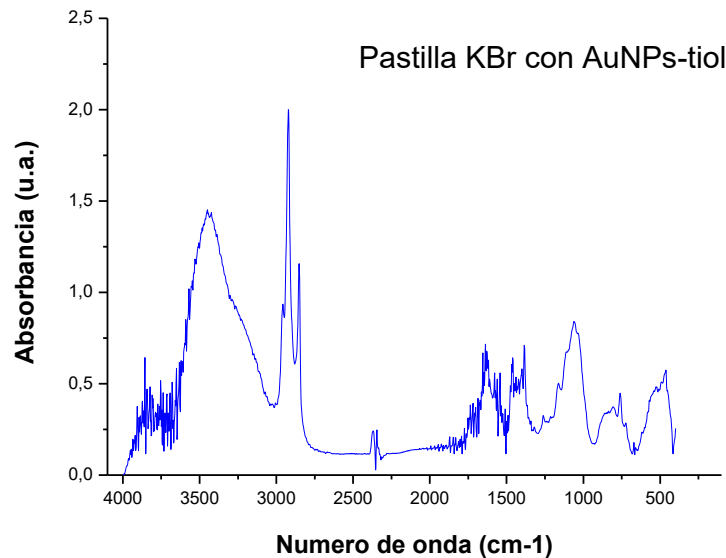


Figura 104. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 3 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en cloroformo.

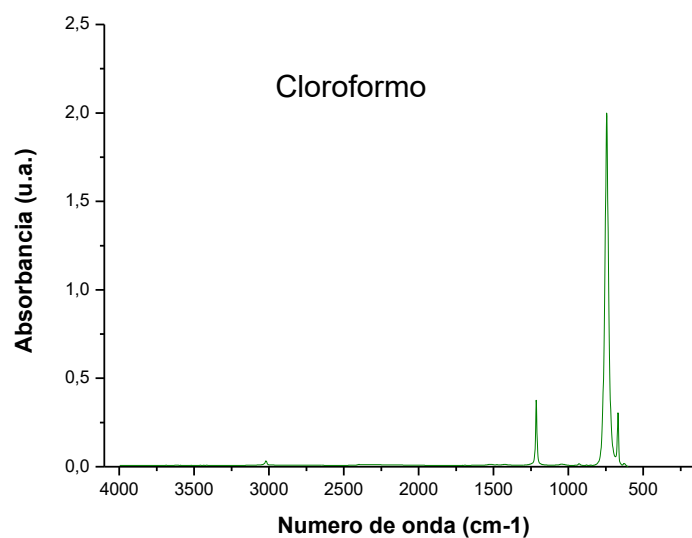


Figura 105. Espectro por FT-IR de 3 gotas de cloroformo.

A la vista del espectro del cloroformo, se observa que el disolvente (cloroformo) posee un pico intenso a unos 750 cm^{-1} debido a la tensión del C-Cl, otro pico a unos 1200 cm^{-1} debido a la flexión del C-H y un pico menos intenso a unos 3020 cm^{-1} debido a la tensión del C-H. Además, si se superponen ambos espectros, estos picos comentados no se manifiestan en el espectro de las AuNPs-tiol, luego se evaporó el disolvente correctamente.

En cuanto al espectro de las AuNPs-tiol, se observan trazas de agua ambiental (3300 cm^{-1} y 1600 cm^{-1}).

A 2900 cm^{-1} se observa una tensión del C-H y justo por encima de los 2750 cm^{-1} se forma el enlace S-Au, mientras que la banda a 2557 cm^{-1} correspondiente a la vibración del S-H desaparece.

Al igual que en el artículo del método de Brust-Schiffrin, al superponer ambos espectros, se ve que son similares, indicando que el 1-dodecanotiol forma parte del material compuesto.

Para las AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de hexano, se registra el siguiente espectro:

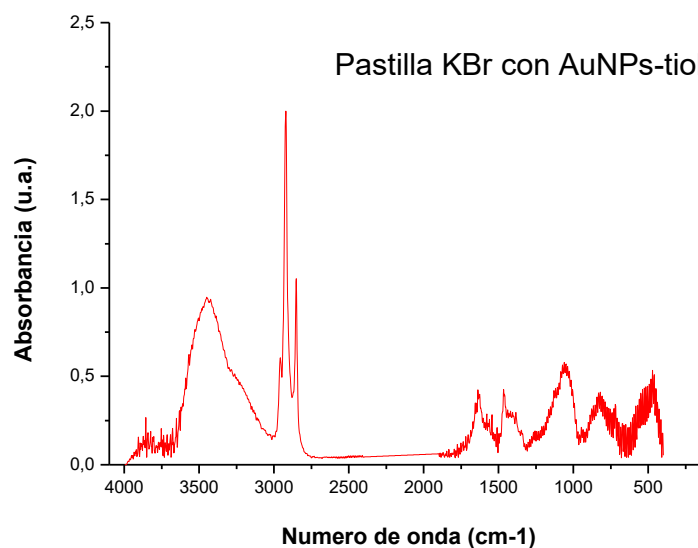


Figura 106. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 3 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en hexano.

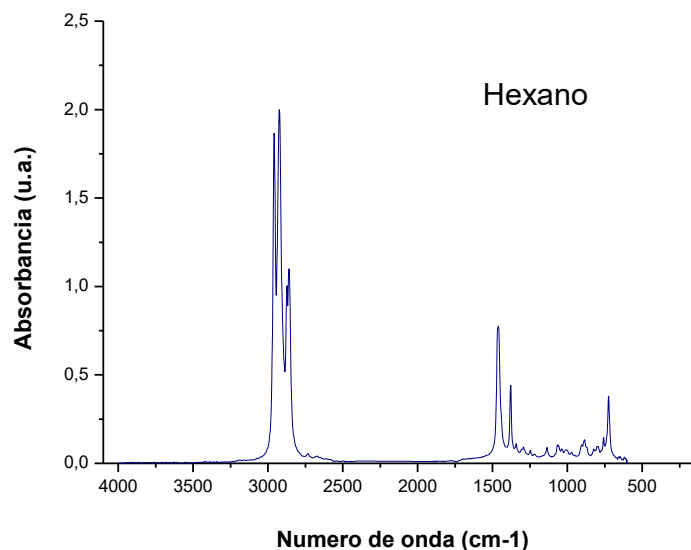


Figura 107. Espectro por FT-IR de 3 gotas de hexano.

A la vista del espectro del disolvente (hexano), se observa que el disolvente posee un pico intenso justo por debajo de 3000 cm^{-1} , debido a la tensión del C-H y otros dos picos justo por debajo de 1500 cm^{-1} debidos a la flexión del C-H. Además, si se superponen ambos espectros, estos picos comentados no se manifiestan en el espectro de las AuNPs-tiol, luego se evaporó el disolvente correctamente.

Como en el caso anterior, en el espectro de las AuNPs-tiol, se observan trazas de agua ambiental (3300 cm^{-1} y 1600 cm^{-1}).

Igualmente, a 2900 cm^{-1} se observa un estiramiento del C-H y justo por encima de los 2750 cm^{-1} se forma el enlace S-Au de una intensidad similar al caso de AuNPs-tiol en cloroformo, mientras que la banda a 2557 cm^{-1} correspondiente a la vibración del S-H desaparece.

Al superponer ambos espectros (1-dodecanotiol y AuNPs-tiol en hexano), se ve que son similares, indicando que el 1-dodecanotiol forma parte del material compuesto.

Para el caso de AuNPs-tiol en etanol, se registra el siguiente espectro:

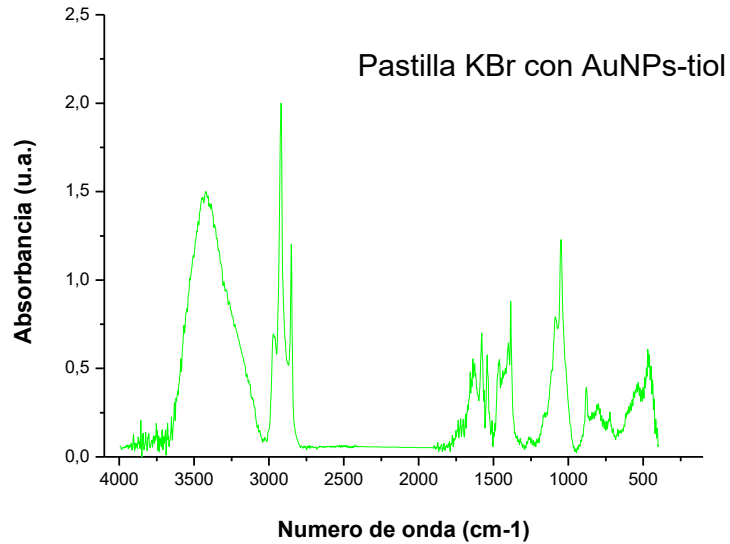


Figura 108. Espectro por FT-IR de una pastilla de 13 mm con 0.1 g de KBr y 5 gotas de mezcla coloidal AuNPs-tiol en etanol.

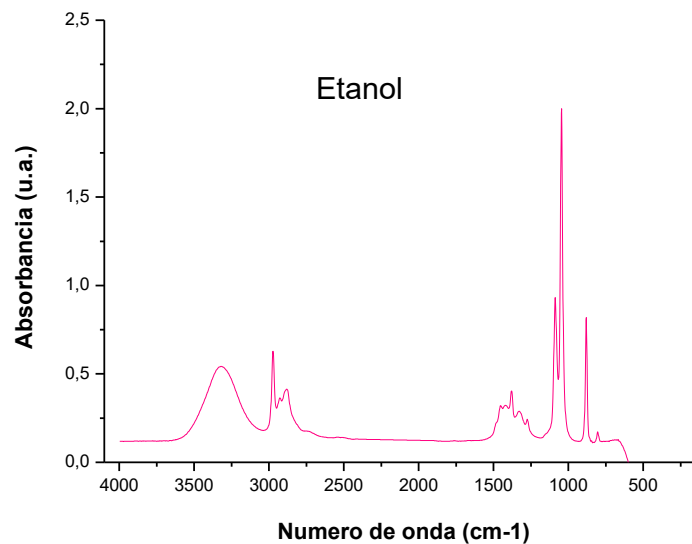


Figura 109. Espectro por FT-IR de 3 gotas de etanol.



Nuevamente en este caso, el espectro del etanol, muestra una banda ancha de 3500 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} debido a la tensión del O-H y otra banda justo por encima de 1000 cm^{-1} debido a la tensión del C-O.

El etanol tampoco se manifiesta en el espectro de AuNPs-tiol donde siguen apareciendo trazas de agua ambiental.

De nuevo, a 2900 cm^{-1} se observa un estiramiento del C-H y justo por encima de los 2750 cm^{-1} se forma el enlace S-Au de una intensidad similar a los casos anteriores, mientras que la banda a 2557 cm^{-1} correspondiente a la vibración del S-H desaparece.

Finalmente, comentar que la huella dactilar (tramo característico de cada compuesto situado por debajo de los 1500 cm^{-1}) cambia en cada espectro, posiblemente debido al disolvente, el cual ha podido variar el modo de vibración de los enlaces de las AuNPs-tiol.

Una forma de mejorar los actuales espectros, es llevar previamente las pastillas de KBr a la estufa para eliminar trazas de agua o de disolvente.

3.5.- Caracterización de AuNPs mediante microscopía electrónica de transmisión:

Se obtuvieron micrografías de las AuNPs obtenidas por el método de Brust-Schiffrin tanto en su forma original AuNPs-tiol, como en la variación de AuNPs-glicina.

Para la preparación de las muestras, se colocó papel de filtro en la mesa y se situó sobre el papel una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono con la ayuda de una pinza relojera de 11 cm recta.

Mediante una micropipeta, se midió una pequeña cantidad de mezcla coloidal de AuNPs y se depositaron entre dos y tres gotas sobre una rejilla de cobre.

Se dejó la rejilla de cobre durante 15 minutos a temperatura ambiente para que se evapore todo el disolvente.

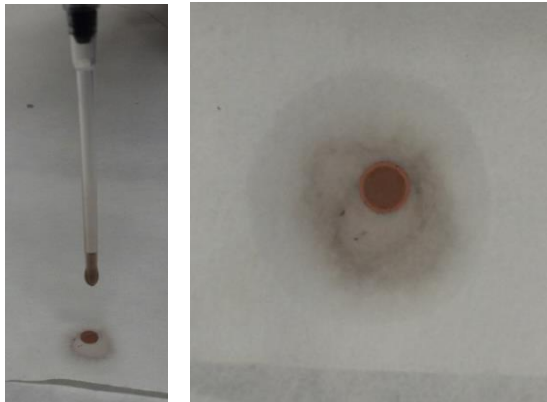


Figura 110. De izquierda a derecha, deposición de AuNPs sobre rejilla de cobre para análisis en TEM y aspecto de la rejilla de cobre tras depositar AuNPs.

Una vez seca la rejilla, se sostuvo nuevamente con la pinza y se llevó a una caja de rejillas con pozos de forma de diamante, donde cada pozo está identificado con letras y números:

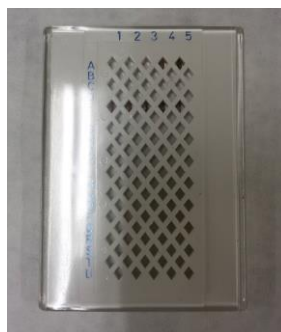


Figura 111. Caja para 50 rejillas de TEM.

En este caso, se usan tres rejillas, una de AuNPs-tiol en etanol, otra de AuNPs-glicina y de AuNPs-tiol en metanol.

Una vez preparadas las rejillas, se procedió a obtener las micrografías en el equipo TEM.

Para las AuNPs-tiol en etanol, se han obtenido micrografías con aumentos desde 500X a 1000000X en formato .dm3, el cual se ha procesado a formato .jpg añadiendo además la escala de tamaño. Las imágenes obtenidas en distintos aumentos, se muestran en las siguientes figuras:

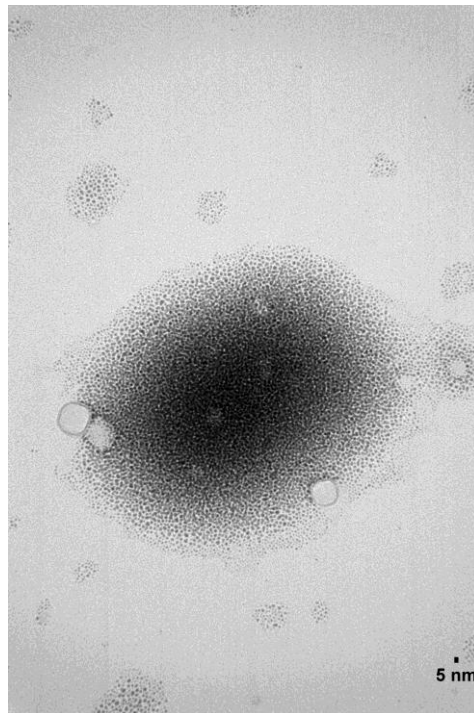


Figura 112. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 250000X.

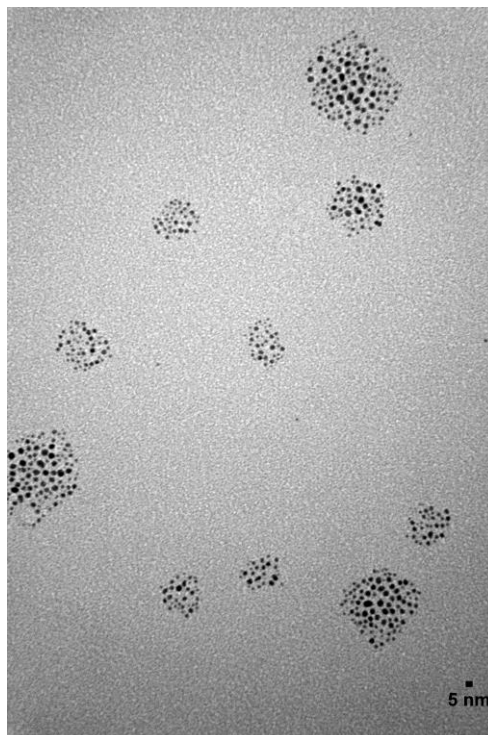


Figura 113. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 400000X.

A la vista de las micrografías, se puede confirmar la presencia de poblaciones de AuNPs-tiol mostrando muy buena dispersión, lo que sugiere que poseen una buena capa funcionalizante evitando su agregación. También, se observa en la micrografía de la figura 112, que existen algunos residuos orgánicos debidos quizás a una falta de purificación. Se sabe que son residuos orgánicos, ya que al cabo de unos segundos de bombardeo electrónico en el TEM, estos acaban ‘quemándose’ y ‘desapareciendo’.

La capa de funcionalización, debido al pequeño tamaño de las AuNPs y la resolución del propio equipo, no se aprecia.

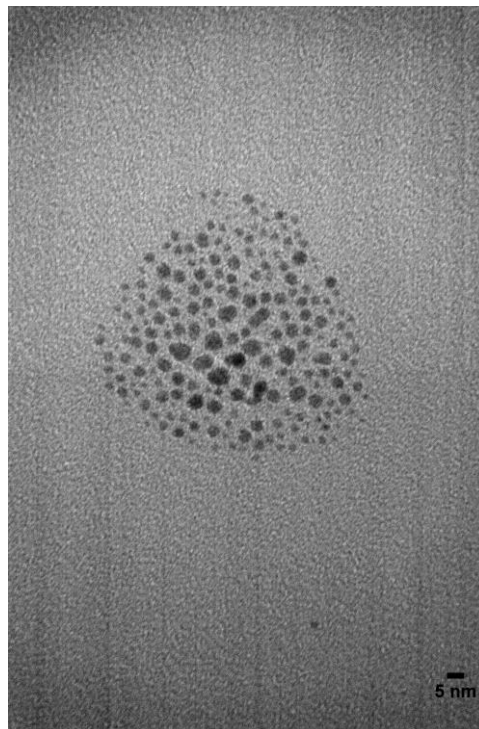


Figura 114. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 1000000X.

Los resultados obtenidos en las micrografías, determinan que las AuNPs-tiol son de pequeñas dimensiones (1 – 3 nm), estando la mayoría situadas en torno a los 2 nm y coincidiendo por tanto con la bibliografía (21).

También, se observa que existe una geometría mayoritariamente esferoidal, por lo que es posible que estas AuNPs-tiol tengan una disposición de cuboctaedro e icosaedro (21). Así mismo se observa una relativa monodispersidad y pocos agregados.

Para las AuNPs-glicina, también, se han obtenido micrografías con aumentos desde 500X a 1000000X en formato .dm3, el cual se ha procesado a formato .jpg añadiendo además la escala de tamaño.

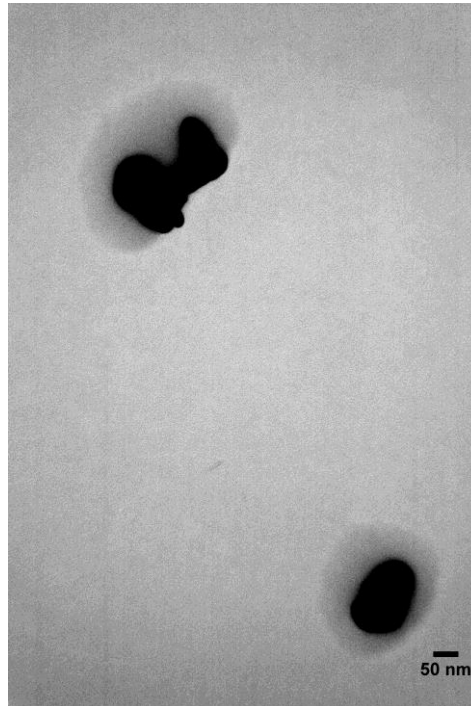


Figura 115. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 150000X.

Al analizar la micrografía de la figura 115, se observa que las AuNPs-glicina tienden a tener forma esferoidal, aunque se unen unas a otras, formando agregados de mayor tamaño. Por otro lado, se observa que las AuNPs-glicina poseen una capa orgánica perfectamente visible que se debe a la funcionalización de la glicina.

También, se observa que no existe una tendencia a acercarse y formar colonias unas AuNPs-glicina con otras como ocurre con las AuNPs-tiol, y resulta muy común encontrar las AuNPs-glicina, aisladas unas de otras, o unidas mediante enlaces formando agregados, pero estos agregados se encuentran aislados unos de otros.

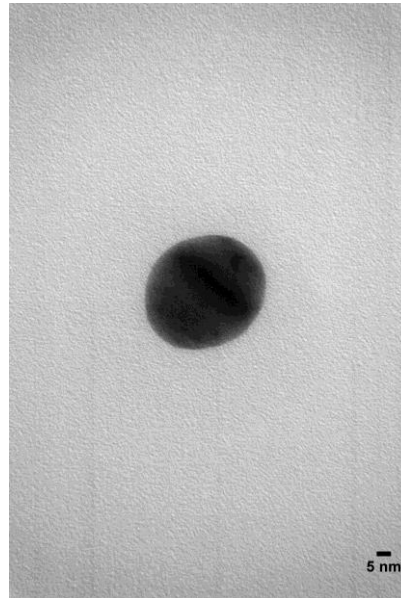


Figura 116. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 1000000X.

El tamaño de estas AuNPs-glicina, es difícil de determinar, ya que como se observa en la micrografía de la figura 116, puede parecer que tienen un tamaño entre 15 nm o 20 nm, pero al realizar aumentos, se ven zonas menos oscuras debidas a la glicina y siendo por tanto el tamaño de las AuNPs-glicina mucho menor.

En la micrografía de la figura 117, se observa además que las AuNPs-glicina poseen un ordenamiento policristalino, presentando en muchos casos maclas (agrupación simétrica de cristales simétricos).

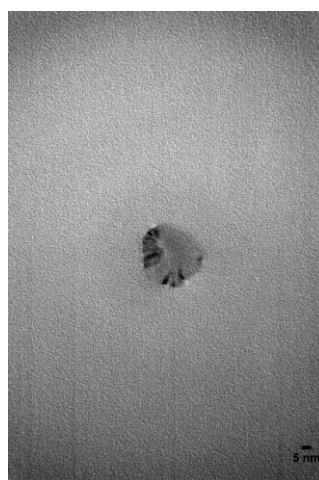


Figura 117. Micrografía AuNPs-glicina a 100 kV y 800000X.

Para las AuNPs-tiol en metanol, se han obtenido igualmente micrografías con aumentos desde 500X a 1000000X.

En la micrografía de la figura 118, se observan poblaciones de AuNPs-tiol con poca dispersión de tamaños, pero sin llegar a tener la buena dispersión de las AuNPs-tiol en etanol. En este caso no se han observado residuos orgánicos como en el caso de las AuNPs-tiol en etanol, debido a una mejor purificación originada por el metanol.

En cuanto a las dimensiones de estas AuNPs-tiol, son mayores que en las AuNPs-tiol de etanol, estando en torno a los 10 nm, mientras que su geometría sigue siendo principalmente esférica.

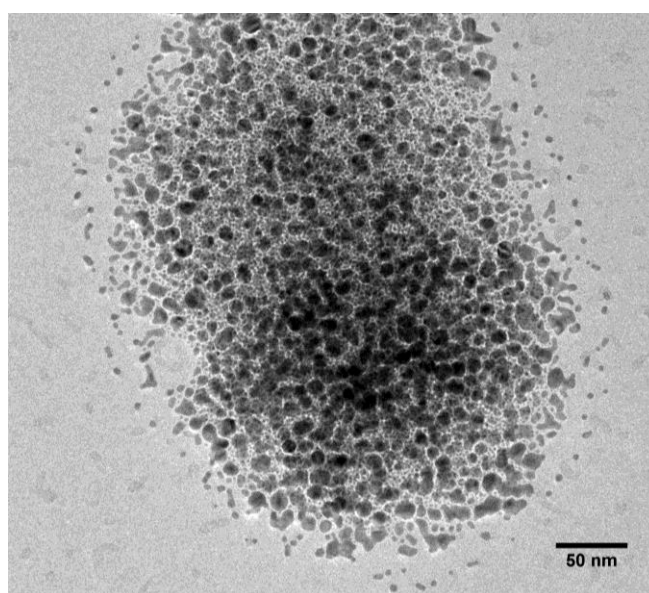


Figura 118. Micrografía AuNPs-tiol a 100 kV y 50000X.

3.6.- Caracterización de sensores voltamétricos modificados con AuNPs mediante voltametría cíclica:

En este apartado, se abordará la caracterización de sensores electroquímicos, del tipo voltamétrico modificados con AuNPs-tiol sintetizadas mediante el método de Brust-Schiffrin.

Es posible caracterizar estos sensores modificados con AuNPs-tiol mediante VC debido a la monocapa orgánica que poseen las AuNPs-tiol, que actúa como un condensador esférico, así como observar los picos debidos a la reducción y oxidación sucesiva de la propia AuNP-tiol.



La estructura de esta sección, comenzará con la preparación de los sensores modificados, del montaje de la celda electroquímica y del manejo del equipo. Después, se pasará a abordar las medidas experimentales mediante VC donde el esquema consistirá en hacer mediciones previas del ITO (sustrato) sin modificar en buffer fosfato, para conocer la señal característica del propio sustrato, y después del ITO sin modificar en disolución de catecol 10^{-3} M para conocer los picos propios del antioxidante.

Después, se realizará VC con sensores modificados con AuNPs-tiol en buffer fosfato en distintos disolventes para conocer la señal característica de las propias AuNPs-tiol y la influencia del disolvente en el ordenamiento y defectos de la unión de los ligandos a la superficie de la AuNP-tiol y que afectarán por tanto, en la respuesta de la VC. Posteriormente, se realizarán mediciones del sensor modificado con AuNPs-tiol en disolución de catecol 10^{-3} M para conocer la influencia de las AuNPs-tiol y cómo modifican la señal propia del antioxidante en términos de potencial e intensidad. Finalmente, para completar este apartado, se realizará un estudio cinético y un estudio de límites de detección del sensor modificado con AuNPs-tiol para conocer la mínima concentración a la que este sensor detecta el antioxidante y para conocer la etapa que rige el proceso (difusión hasta el electrodo o transmisión de electrones).

No obstante, se realizarán otras mediciones de sensores modificados con AuNPs obtenidas mediante la síntesis de Turkevich por ser las AuNPs empleadas hasta la fecha en el grupo UVaSens, con objeto de comparar estos sensores con los modificados con AuNPs-tiol de la síntesis de Brust-Schiffrin.

Para la preparación de sensores, como sustrato se empleó ITOs limpios y secos, para ello, se introdujeron en un vaso de precipitados con agua desionizada, acetona y jabón durante 20 minutos en el ultrasonidos, después se aclararon con agua desionizada y se secaron en una estufa a 80°C durante 5 minutos.

Para la preparación de películas finas de AuNPs-tiol sobre el sustrato para obtener el sensor modificado, se abordó el uso de las dos técnicas clásicas existentes: casting y spincoating. Estas técnicas son adecuadas, por emplearse en muestras líquidas que poseen un disolvente volátil.

La técnica casting no obtiene películas nanoestructuradas, no es reproducible y es fácil que se depositen contaminantes en el sustrato, por lo que no se usó para el desarrollo de estos sensores modificados.

La técnica spincoating en cambio, permite obtener películas homogéneas pero sin ordenamiento (sin ser nanoestructuradas) y es altamente reproducible, luego fue la técnica elegida.

Además, todos los estudios se realizaron según la bibliografía con la mezcla coloidal de AuNPs-tiol en etanol por ser el disolvente que contribuye a una mayor ordenación de los ligandos en la AuNP, y promover monocapas en las AuNPs densamente empaquetadas (17) por lo que se obtienen voltamogramas altamente estables y reproducibles para estudios cinéticos y de límites de detección. Aunque, también, se probaron a realizar mediciones con sensores modificados con AuNPs-tiol suspendidas en metanol y en cloroformo, las cuales son otras mezclas coloidales que se probaron en la síntesis de Brust-Schiffrin.

El uso de cloroformo, conlleva a un mayor número de defectos en la superficie de la AuNP, mientras que el uso de metanol, conlleva a un menor número de defectos. Realizando estas comparaciones, se pretende conocer por tanto la influencia del disolvente en los defectos de la superficie de la capa funcionalizante de la AuNP y cómo afectan estos defectos en las mediciones de la VC.

A la hora de preparar el sensor modificado mediante spincoating, el espesor obtenido de la película de AuNPs-tiol depende de la concentración de la mezcla coloidal, del tiempo de rotación, de las revoluciones por segundo, etc., así que se hicieron varias pruebas hasta obtener las siguientes condiciones de deposición: tramo de rampa durante 60 segundos hasta alcanzar 1000 rpm y después 120 segundos a 1000 rpm constantes.

Cuando se alcanzaron las mejores condiciones de trabajo, se dispusieron varios ITOs sobre la bandeja del equipo y se depositaron en cada ITO 200 μ L de mezcla coloidal de AuNPs-tiol. Una vez depositada la mezcla, se arrancó el equipo y con la rotación, la mezcla se dispersó en el sustrato formando una película.

Tras esta etapa, en un extremo de cada ITO se dio una fina capa de laca de plata, para permitir la transferencia de los electrones al WE.

Durante esta parte se desarrollaron múltiples sensores modificados con AuNPs-tiol hasta obtener una alta reproducibilidad.

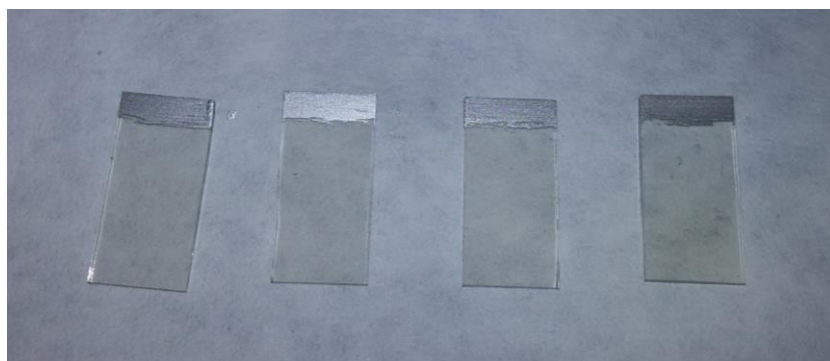


Figura 119. Sensores modificados con AuNPs-tiol mediante spincoating.

Una vez listos los sensores, se limpió la placa de platino al rojo vivo, se sumergió en H_2SO_4 concentrado, se volvió a llevar al rojo vivo y se aclaró con agua desionizada para asegurarse de eliminar cualquier posible impureza que interfiera en las mediciones.

Para el montaje de la celda, se eligió una configuración que se mantuvo a lo largo de los ensayos, también se cuidó la posición de los electrodos, su inclinación, la distancia entre electrodos, etc. ya que influye en los resultados de la VC, y de no cuidar la configuración de los electrodos, no sería posible la comparación de voltamogramas.

Por último, marcar que es importante tapar con Septum todos los orificios que no se usen en la celda electroquímica para evitar la entrada de aire durante la medición y nunca sumergir en la disolución las pinzas del WE y CE ya que provocarían un cortocircuito en el sistema.

En este caso, además, se realizó un montaje de suministro de N_2 acoplado a la celda electroquímica para contribuir a la estabilidad y reproducibilidad del sensor, limitando la oxidación a sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$).

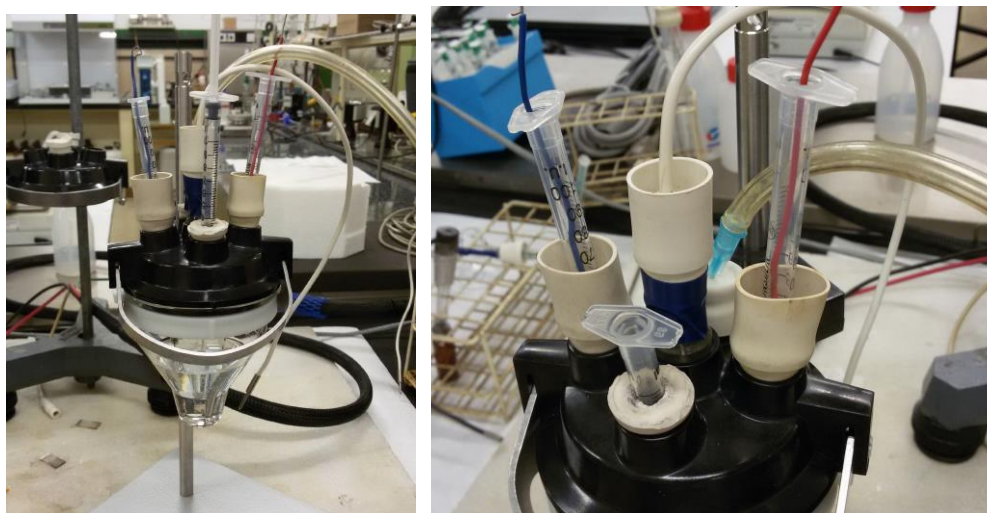


Figura 120. Celda electroquímica montada con 3 electrodos y toma de nitrógeno.

El electrodo de cable azul (electrodo izquierdo en la figura 120) representa el CE, el central el RE y el electrodo de cable rojo (electrodo derecho en la figura 120) representa el WE.

Se trabajó en todos los casos con 50 mL de disolución en la celda electrolítica y sumergiendo tanto el sensor como la placa de platino 1 cm^2 , la disolución electrolítica se encontraba a temperatura ambiente, sin agitación externa y con atmósfera inerte de N_2 .

Para el sistema de N_2 , se diseñó la entrada de N_2 mediante una jeringa y su salida mediante otra jeringa. El N_2 desplazó el oxígeno de la celda. Cada vez que se comenzaba una medición en el potenciostato, se conectaba el sistema de N_2 durante 15 min con el sensor sin sumergirse en la disolución para exponer toda la superficie del sensor con las AuNPs-tiol al N_2 , una vez finalizado el tiempo, se sumergió el sensor 1 cm^2 y se tapó la salida de N_2 con el émbolo de la jeringuilla.

A partir de este momento se comienza a trabajar con el software donde se eligieron los parámetros de ensayo, que dependen del WE, RE, del potencial inicial, de los potenciales extremos, del área a sumergir del electrodo, de la función de barrido, etc.

Para comenzar las mediciones se conectó la celda electrolítica al potenciostato, se encendió el ordenador, se arrancó el potenciostato y se entró al software.



Figura 121. Icono del programa CorrWare.

La ventana del programa presenta el aspecto de la figura 122 donde se seleccionó el potenciostato a emplear:

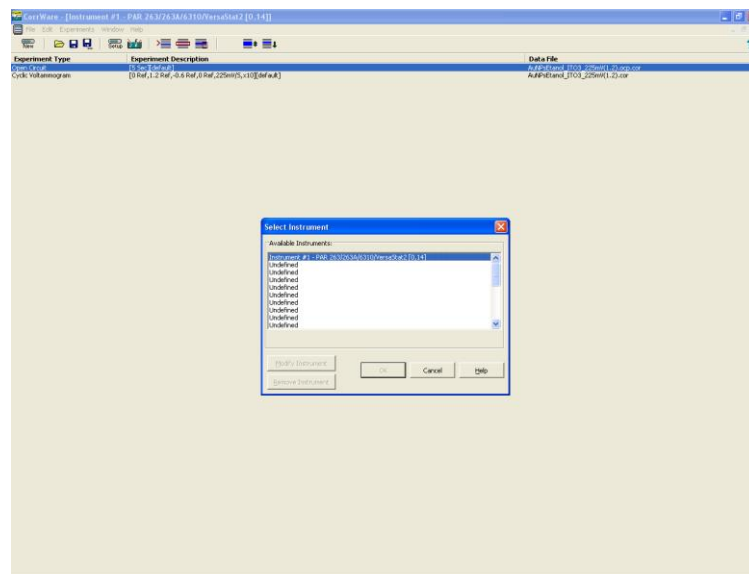


Figura 122. Ventana inicial del programa CorrWare.

En la barra de herramientas se seleccionó 'Setup Cell' y se marcó la siguiente configuración:

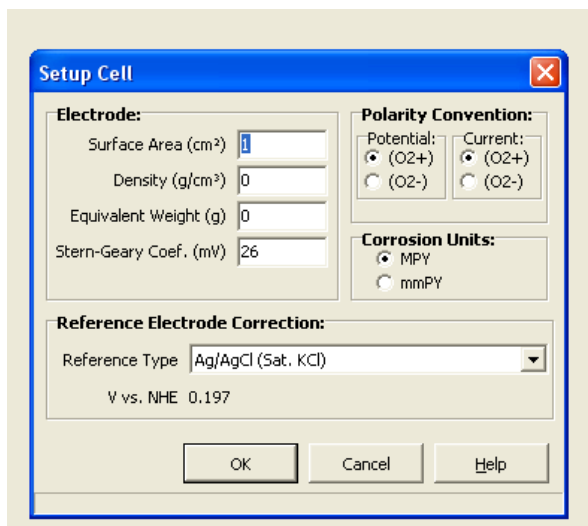


Figura 123. Ventana Setup Cell del programa CorrWare.

También, se seleccionó 'Setup Open Circuit Experiment' que es un preescaneado propio de cada WE, y que estabiliza la tensión de ensayo que se utiliza en la medida del voltamograma. En este caso se empleó un tiempo de equilibrado de potencial de circuito abierto (OCP, del inglés *Open Circuit Potential*) de 5 segundos por ser suficiente.

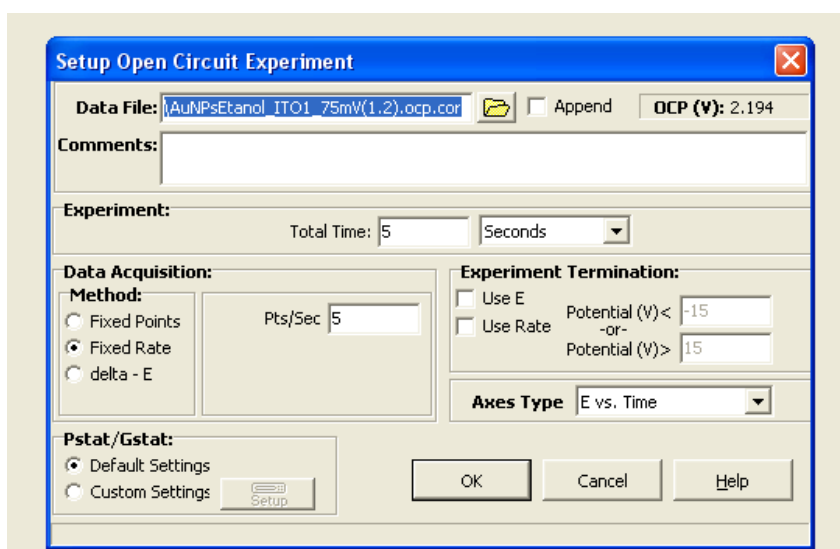


Figura 124. Ventana Setup Open Circuit Experiment del programa CorrWare.

Por último, se seleccionó 'Cyclic Voltammogram Experiment' donde el potencial del inicio y fin fue 0 V para cerrar el ciclo, el intervalo de barrido de potencial fue desde -0.6 V a 1.2 V (ya que valores más extremos inducen a la descomposición del agua del medio electrolítico), con 10 ciclos (para asegurar la estabilidad del sensor) y a una velocidad de barrido de 100 mV/s, excepto en el estudio cinético donde se varió la velocidad de barrido de 25 mV/s a 200 mV/s.

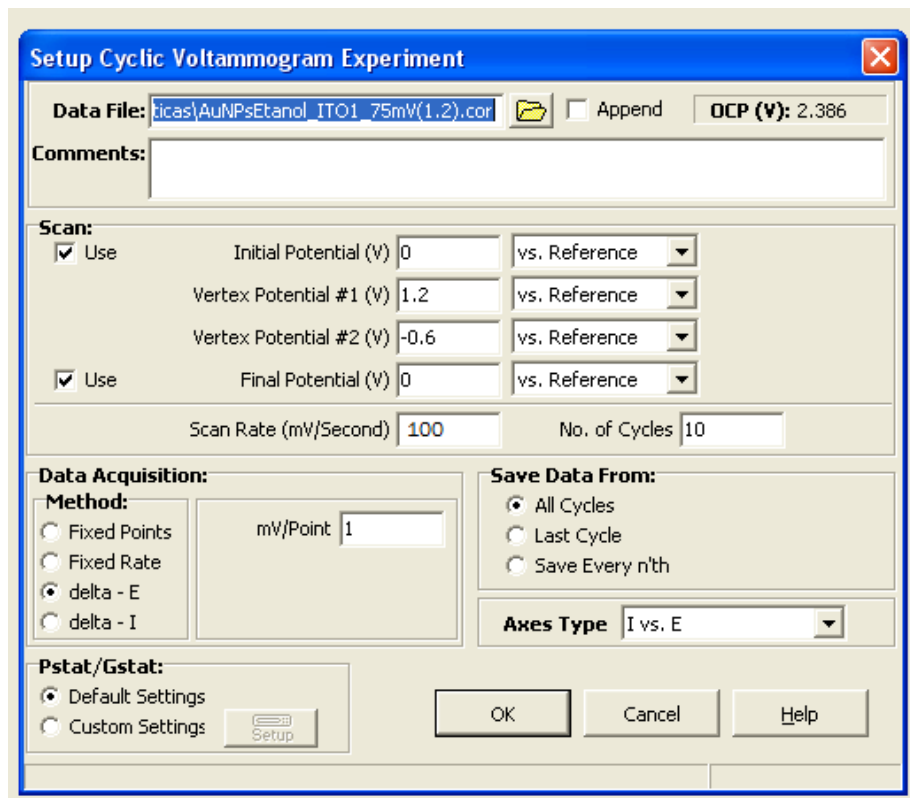


Figura 125. Ventana Setup Cyclic Voltammogram Experiment del programa CorrWare.

A partir de este momento, se presentan los voltamogramas obtenidos en cada caso, con explicaciones, conclusiones y con los resultados obtenidos de cada uno.

Las experiencias por tanto, comienzan con el análisis de la respuesta del ITO sin modificar en disolución de buffer fosfato 0.01 M y en disolución de catecol 10^{-3} M. Estas respuestas se reflejan en los voltamogramas de las figuras 126 y 127.

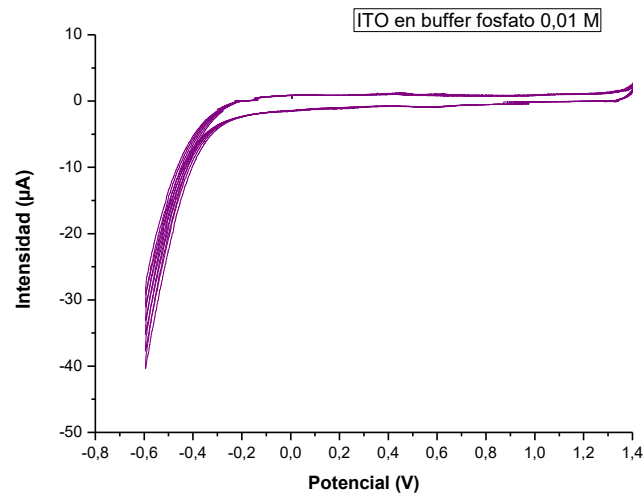


Figura 126. Voltamograma del sensor sin modificar sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.

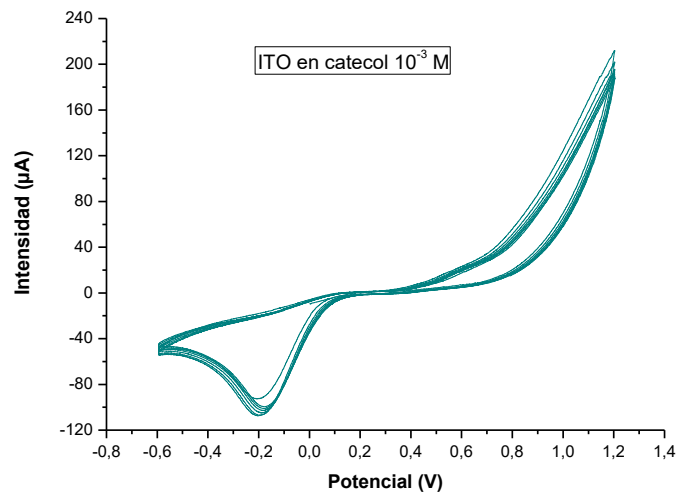


Figura 127. Voltamograma del sensor sin modificar sumergido en 50 mL de disolución de catecol 10^{-3} M.

En el voltamograma de la figura 126, se puede observar una señal plana debido a la ausencia de procesos de oxidación y de reducción al no existir un analito, y encontrarse el sensor sin modificaciones, aunque sí que se observa el comienzo del proceso de descomposición del agua del medio electrolítico buffer fosfato a partir de -0.4 V.

En el voltamograma de la figura 127, se puede observar la señal típica del analito catecol. Esta señal posee un hombro de oxidación del catecol a 0.7 V, con una intensidad de unos 20 μA , el inicio del pico de oxidación del catecol a 1.2 V y el pico de reducción del catecol en torno a -0.2 V, con una intensidad en torno a -110 μA .

Por otro lado, en ambos voltamogramas, se observa que la reproducibilidad y estabilidad aumenta con el paso de los ciclos y no poseen ruido.

Tras este análisis, se presenta un voltamograma del sensor modificado con AuNPs sintetizadas por el método de Turkevich por ser las AuNPs empleadas tradicionalmente en el grupo UVaSens, con el fin de realizar una comparación con las AuNPs-tiol obtenidas mediante el método Brust-Schiffrin que se ha puesto a punto en este proyecto.

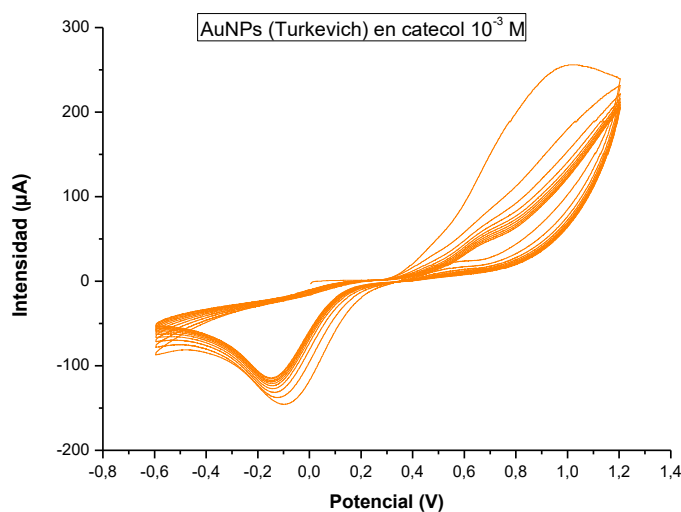


Figura 128. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs de Turkevich sumergido en 50 mL de disolución de catecol 10^{-3} M.

En este caso, se observa un hombro de oxidación del catecol a 0.7 V y un pico oxidación del catecol a partir de 1.1 V así como la reducción del catecol a -0.1 V. También se observa que la intensidad disminuye con el paso de los ciclos y que el proceso tarda en estabilizarse debido a que los ciclos no se solapan todos ellos.

Tras conocer el comportamiento del ITO sin AuNPs tanto en buffer fosfato como en catecol y conocer el comportamiento del ITO modificado con AuNPs obtenidas por el método de Turkevich en catecol, se procede a trabajar con sensores modificados con las AuNPs-tiol sintetizadas en este proyecto mediante el método de Brust-Schiffrin.

En primer lugar, se analizará por medio de los voltamogramas, la respuesta de los sensores modificados con AuNPs-tiol así como influencia de los disolventes (etanol, metanol y cloroformo) en la mezcla coloidal donde se encontraban las AuNPs-tiol.

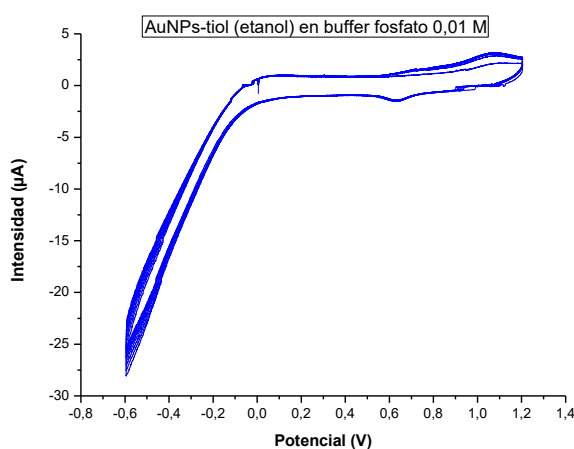


Figura 129. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.

En el voltamograma de la figura 129, se puede observar cómo el sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de etanol en buffer fosfato tiene un alto efecto electrocatalítico, acelerando la descomposición del agua del medio electrolítico a partir de -0.1 V con respecto al sensor sin modificar en buffer fosfato, además aparece un hombro de oxidación a los 0.7 V correspondiente a la oxidación del Au^0 al Au^{1+} y un pico de oxidación a los 1.1 V correspondiente a la oxidación del Au^{1+} al Au^{3+} , en cuanto a la reducción, aparece un pico a 0.6 V correspondiente a la reducción del Au^{3+} al Au^0 repitiéndose nuevamente el proceso.

Este voltamograma de la figura 129, permite conocer la señal característica de las AuNPs-tiol, donde se observa la existencia de dos oxidaciones y una reducción.

Finalmente, en dicho voltamograma, se observa una alta estabilidad en el sensor y una alta reproducibilidad.

En el voltamograma de la figura 130, se presenta un sensor modificado con las mismas AuNPs-tiol, pero pertenecientes a la mezcla coloidal que se encontraba en metanol. En este caso, se sigue observando un hombro de oxidación y un pico de oxidación así como un pico de reducción a potenciales prácticamente iguales pero mostrando mayor intensidad en todos los casos.

Además, la descomposición del agua ocurre a mayor intensidad y se observa menor reproducibilidad debido a que los ciclos se van diferenciando conforme aumenta el número de ciclos.

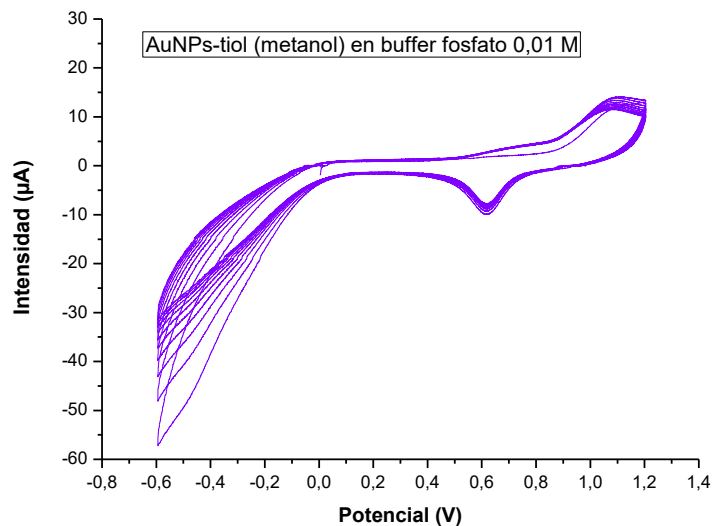


Figura 130. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en metanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.

La figura 131 muestra la respuesta de las AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de cloroformo, en este caso, se observa que la respuesta es bastante diferente con respecto a las AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de etanol y metanol, donde el pico de oxidación se desplaza a 0.6 V correspondiente a la oxidación del Au^0 al Au^{1+} y el pico reducción se desplaza a 0.2 V correspondiente a la reducción del Au^{1+} al Au^0 , además el proceso se muestra menos estable que en el caso de AuNPs-tiol en etanol.

Tras analizar estos voltamogramas, se concluye que bajo las mismas condiciones, el disolvente en el que se encontraban las AuNPs-tiol influye en la respuesta redox.

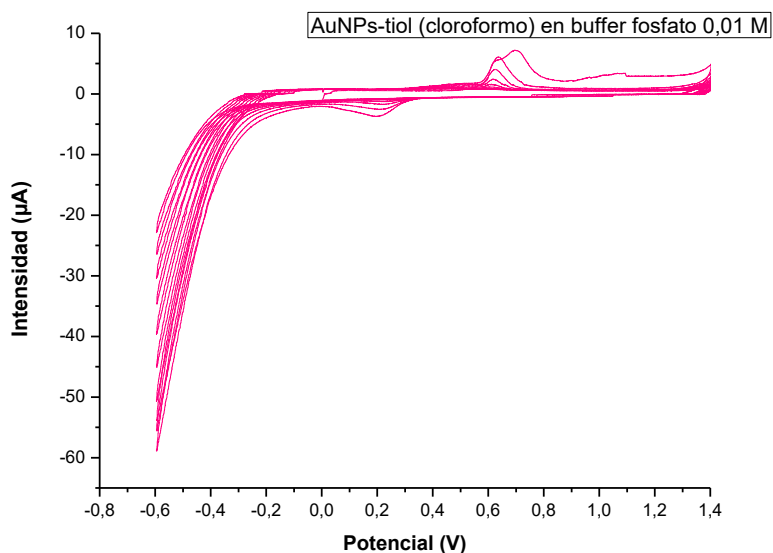


Figura 131. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en cloroformo, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M.

Finalmente, conviene comentar que al eliminar el oxígeno de la celda y encontrarse el sensor en atmósfera inerte (N_2), los picos de oxidación y de reducción son más pequeños y menos intensos que si se encontrase el sensor en una atmósfera oxidante.

Una vez conocido el comportamiento del sensor modificado con AuNPs-tiol en buffer fosfato y la importancia del disolvente en la forma en la que se unen los ligandos a la AuNP y los defectos que genera en la unión de los ligandos a la AuNP, modificando por tanto la respuesta en los voltamogramas. Se comienza a estudiar el efecto de las AuNPs-tiol para la detección de antioxidantes empleando como ejemplo el catecol.

El voltamograma de la figura 132, presenta la respuesta del sensor modificado con AuNPs-tiol en catecol 10^{-3} M, se emplea esta concentración por ser la típica de los alimentos, pero resulta elevada si se compara con las concentraciones utilizadas en el posterior estudio de límites de detección que se explicará más adelante. Al ser una concentración elevada de antioxidante, se observa cómo se enmascaran los picos redox propios de las AuNPs-tiol y apareciendo un hombro de oxidación del catecol a 0.7 V, la tendencia de presentar un pico de oxidación del catecol a partir de 1.2 V y la reducción del catecol a -0.1 V.

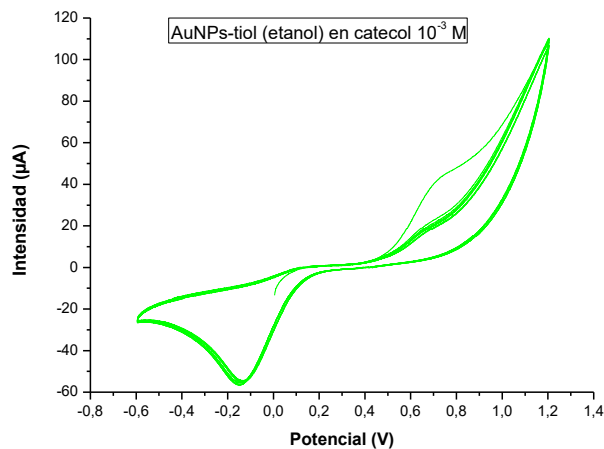


Figura 132. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de catecol 10^{-3} M.

Además, desaparece el proceso de descomposición del agua del medio electrolítico que se observaba cuando el sensor no se encontraba en la disolución con el antioxidante, sino sólo en buffer fosfato (medio electrolítico) debido a que hay una competencia de transferencia de electrones, donde acaba dominando el proceso redox del analito.

Igualmente, el sensor se muestra estable y reproducible dando los ciclos muy similares entre sí.

Si se realiza la misma experiencia con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de cloroformo, como se muestra en la figura 133, al provocar el cloroformo un alto número de defectos en la unión de los ligandos a la AuNP, los picos redox del catecol aumentan considerablemente de intensidad aunque siguen sucediéndose a los mismos potenciales.

Esto se debe a que las AuNPs se encuentran 'menos capas' por el tiol y es más fácil el acceso de los electrones a la AuNP dado respuestas de mayor intensidad. Pero al ser el capado más defectuoso, el sensor es menos estable y se muestra más variación entre ciclos.

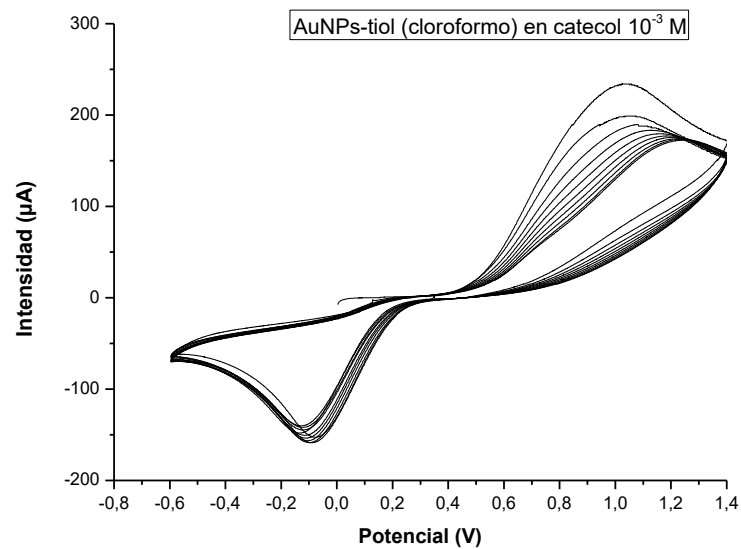


Figura 133. Voltamograma del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en cloroformo, sumergido en 50 mL de catecol 10^{-3} M.

A partir de ahora, se centrará el trabajo en sensores modificados con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal de etanol, por ser las que forman superficies más homogéneas, empaquetadas y con menor número de defectos en la unión de los ligandos a la AuNP, además de ser los sensores más estables a pesar de mostrar picos redox de menos intensidad que en los casos de AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en metanol, así como en cloroformo.

Luego, una vez expuestas las anteriores experiencias, se expone el estudio cinético del sensor modificado con AuNPs-tiol en buffer fosfato 0.01 M para conocer la etapa limitante del proceso (difusión de los iones del analito hasta el electrodo o transmisión de electrones del analito al electrodo) (26).

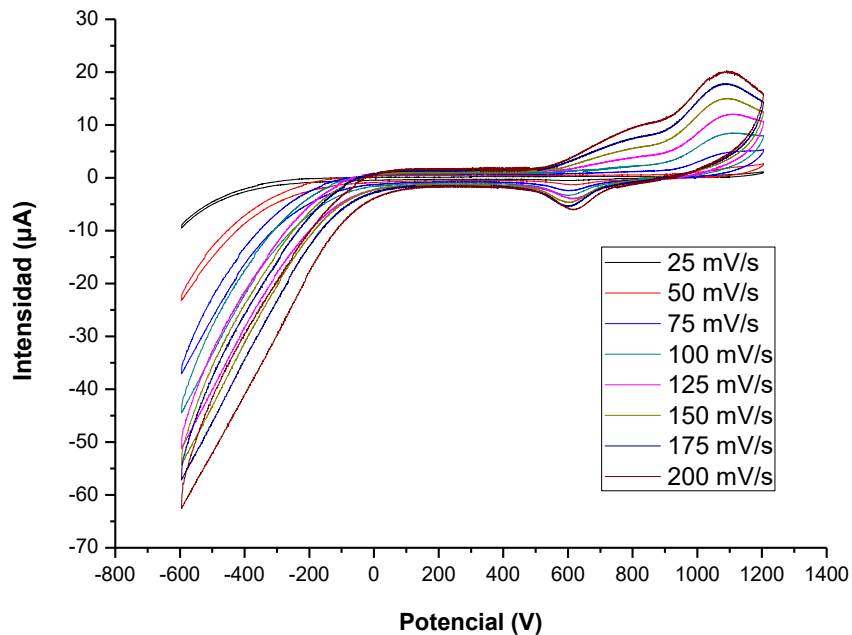


Figura 134. Voltamogramas solapados del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de buffer fosfato 0.01 M. Estudio cinético de velocidad de barrido de 25 mV/s a 200 mV/s.

La figura 134 muestra ocho voltamogramas diferentes que corresponden a ocho velocidades de barrido diferentes desde 25 mV/s a 200 mV/s para el último ciclo en cada caso.

Se observa que al aumentar la velocidad de barrido, los voltamogramas aumentan de intensidad en su hombro de oxidación, pico de oxidación y pico de reducción, así mismo se obtiene menos reproducibilidad debido a que los ciclos dejan de ser iguales con el paso del número de ciclos.

Para el estudio cinético, se busca el pico de oxidación y de reducción propio del oro en su mayor intensidad que en este caso es en el ciclo décimo para cada velocidad de barrido, así como el cálculo de la raíz cuadrada de cada velocidad de barrido, para finalmente hacer un ajuste lineal.



Para el caso del pico de oxidación que se produce en torno a 1.1 V, se obtienen los siguientes valores:

Velocidad (mV/s)	Velocidad ^{1/2}	Intensidad (μA)
25	5.00	0.30
50	7.07	2.68
75	8.67	5.35
100	10.00	8.48
125	11.18	12.14
150	12.25	15.05
175	13.23	17.80
200	14.14	20.20

Tabla 1. Valores obtenidos de las intensidades correspondientes a cada velocidad de barrido del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio cinético.

A partir de estos valores se representan dos gráficas, una de ellas representa la intensidad del pico redox frente a la velocidad de barrido y la otra gráfica representa la intensidad del pico redox frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. En ambas gráficas, se realiza una regresión lineal y la gráfica que mejor se aproxime a una recta, es decir, la que tenga un mayor coeficiente de regresión lineal (R^2), corresponderá a la etapa limitante que sucede en el sensor ya que si se cumple la ecuación de Randles-Sevcik ($I \propto v^{1/2}$), la etapa limitante es la difusión de los iones del analito hasta la superficie del electrodo (siendo un proceso Nerstiano), mientras que cuando se cumple la ecuación de Lavirón ($I \propto v$), la etapa limitante es la transferencia de electrones del analito al electrodo (24).

Luego, en el caso del pico de oxidación, se obtienen las siguientes rectas:

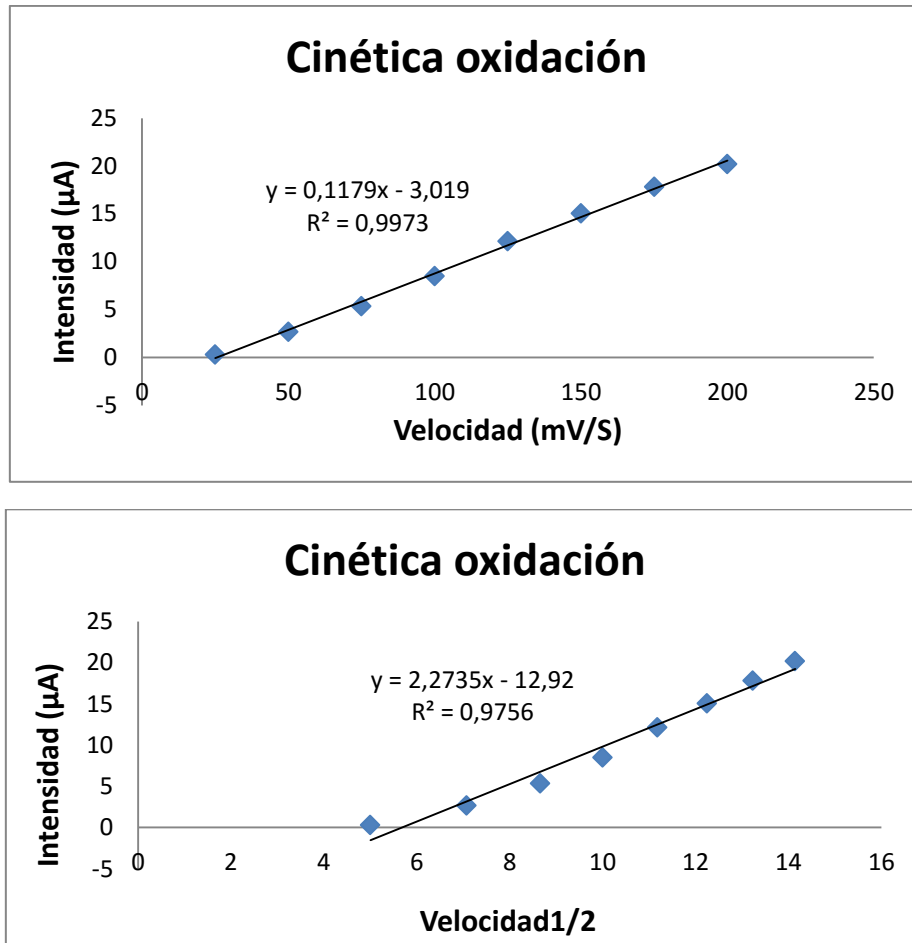


Figura 135. Ajustes lineales de gráficas para el estudio cinético en el pico de oxidación.

A la vista de ambas rectas, para la velocidad de barrido, $R^2 = 0.9973$, mientras que para la raíz de la velocidad de barrido, $R^2 = 0.9756$, luego la etapa limitante es la transferencia electrónica del analito al sensor.

Para el caso del pico de reducción, que se produce en torno 0.6 V, se obtienen los siguientes valores:



Velocidad (mV/s)	Velocidad ^{1/2}	Intensidad (μA)
25	5.00	-0,51
50	7.07	-1,29
75	8.67	-2,46
100	10.00	-3,30
125	11.18	-4.00
150	12.25	-4,71
175	13.23	-5,46
200	14.14	-6,07

Tabla 2. Valores obtenidos de las intensidades correspondientes a cada velocidad de barrido del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio cinético.

Así como, se obtienen las siguientes rectas:

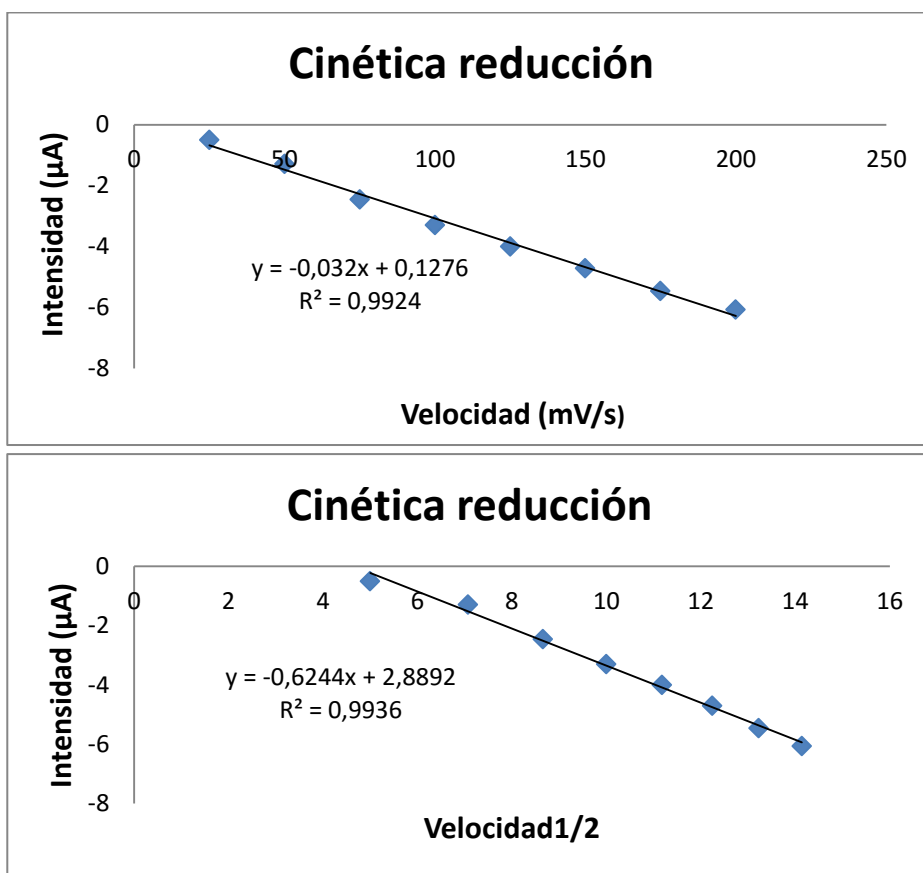


Figura 136. Ajustes lineales de gráficas para el estudio cinético en el pico de reducción.



A la vista de ambas rectas, para la velocidad de barrido, $R^2 = 0.9924$, mientras que para la raíz de la velocidad de barrido, $R^2 = 0.9936$. En este caso ambas R^2 son elevadas y ambos procesos se podrían considerar.

Para finalizar este apartado, se expone un estudio de los límites de detección del catecol del sensor modificado con AuNPs-tiol, con objeto de conocer la mínima cantidad de antioxidante catecol que es capaz de detectar este sensor modificado. Además, se realizará una comparación con los límites de detección del catecol del sensor sin modificar, es decir, sólo ITO.

En la figura 129 se mostraba la respuesta propia de las AuNPs-tiol en buffer fosfato con sus correspondientes picos redox y este será el blanco (por no existir analito) con el que posteriormente se harán los cálculos de los límites de detección en el pico de oxidación del catecol y en el pico de reducción del catecol. Luego, el procedimiento consistió en ir añadiendo cantidades conocidas de catecol para ir aumentando la concentración del catecol en el medio electrolítico desde $4 \cdot 10^{-6}$ M a $1.8 \cdot 10^{-4}$ M.

Para ello se fueron añadiendo volúmenes conocidos de disolución de catecol 10^{-3} M en buffer fosfato y las concentraciones se fueron calculando en cada adición con respecto a los 50 mL de buffer fosfato presentes en la celda electrolítica, obteniéndose los resultados de la tabla 3.

Adición nº	Volumen añadido de catecol (μL)	Volumen final de catecol (μL)	Concentración final (M)
1	200	200	$4 \cdot 10^{-6}$
2	500	700	$1.4 \cdot 10^{-5}$
3	300	1000	$2 \cdot 10^{-5}$
4	500	1500	$3 \cdot 10^{-5}$
5	500	2000	$4 \cdot 10^{-5}$
6	1000	3000	$6 \cdot 10^{-5}$
7	3000	6000	$1.2 \cdot 10^{-4}$
8	1500	7500	$1.5 \cdot 10^{-4}$
9	1500	9000	$1.8 \cdot 10^{-4}$

Tabla 3. Concentraciones de disolución de catecol seleccionadas para el estudio de los límites de detección.

Una vez establecidos los volúmenes a añadir de catecol en cada instante, se comenzaron las mediciones. En la figura 137 se muestran los voltamogramas de las nueve adiciones que se han llevado a cabo, representados por su último ciclo, debido a que en este ciclo, el sensor es más estable y presenta una mayor señal de intensidad.

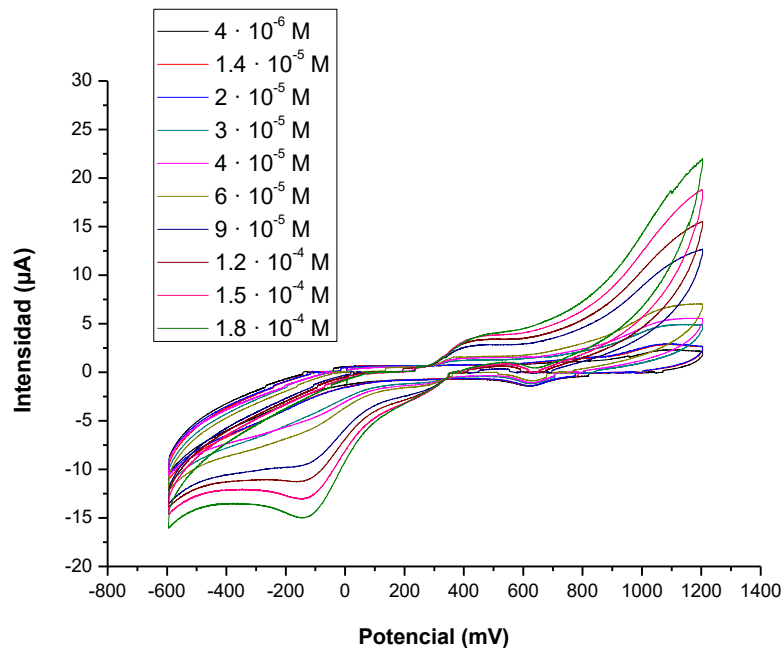


Figura 137. Voltamogramas solapados del sensor modificado con AuNPs-tiol pertenecientes a la mezcla coloidal en etanol, sumergido en 50 mL de catecol para el estudio de límites de detección.

Se puede observar que al aumentar la concentración de antioxidante aumenta la intensidad.

En cuanto al cálculo de los límites de detección, se emplea:

$$LD (\text{catecol}) = \frac{3 \cdot SD}{m}$$

Ecuación 3. Límite de detección.



Siendo SD la desviación típica de la intensidad de corriente para los cinco últimos ciclos del sensor en el buffer fosfato (blanco) para los potenciales 1.2 V en el cálculo del límite de onda anódica y -0.1 V en el cálculo del límite de onda catódica y m el valor de la pendiente de la recta de calibración intensidad frente a concentración medido en el último ciclo para los potenciales en torno a 1.2 V para el límite de onda anódica y -0.1 V para el límite de onda catódica.

Para el cálculo de SD se emplean los siguientes valores de intensidad:

Límite onda anódica del blanco		Límite onda catódica del blanco	
Ciclo n°	Intensidad (μA)	Ciclo n°	Intensidad (μA)
6	1.99	6	-8.88
7	1.46	7	-8.44
8	1.50	8	-8.46
9	1.95	9	-8.48
10	1.93	10	-9.89
SD	0.26	SD	0.62

Tabla 4. Cálculo de la desviación típica de la respuesta del sensor modificado con AuNPs-tiol en buffer fosfato para el estudio de los límites de detección.

Para los límites de onda anódica y catódica se muestran la rectas de calibración para las concentraciones elegidas en el último ciclo de cada caso:

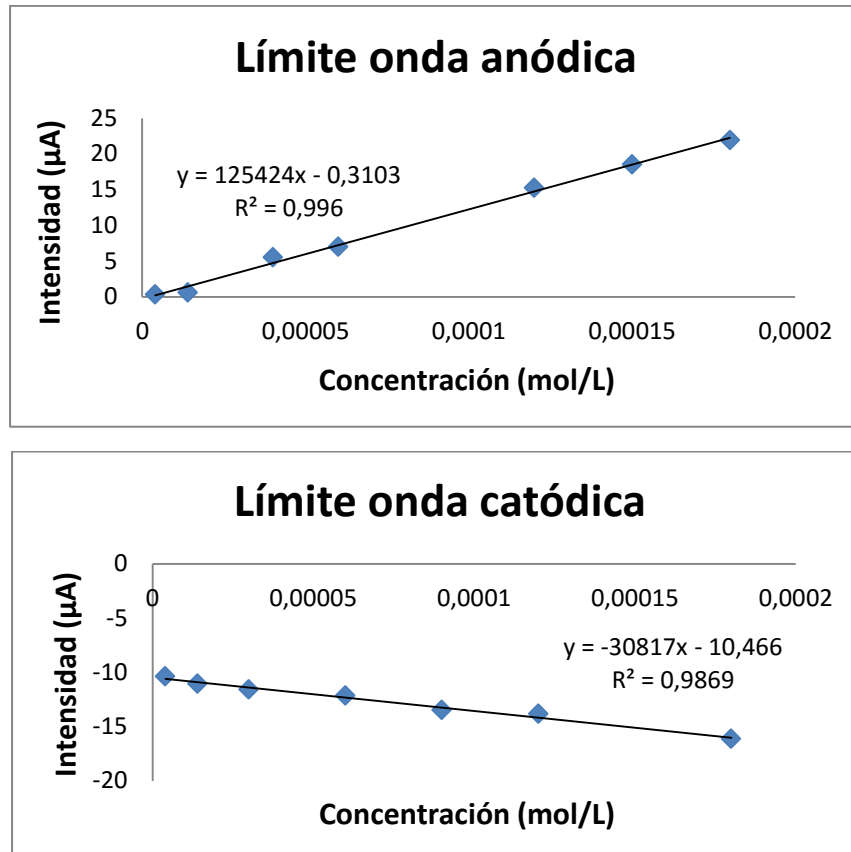


Figura 138. Ajustes lineales de gráficas para el estudio del límite de detección de onda anódica y catódica del sensor modificado con AuNPs-tiol.

Para mejorar los ajustes de las rectas de calibración, se eliminan 2 adiciones, resultando lo siguiente:

Límite onda anódica		Límite onda catódica	
Intensidad (μA)	Catecol (μA)	Intensidad (μA)	Catecol (μA)
0.32	200	-10.37	200
0.60	700	-11.06	700
5.52	2000	-11.59	2000
7.01	3000	-12.16	3000
15.22	6000	-13.46	6000
18.50	7500	-13.84	7500
21.90	9000	-16.13	9000

Tabla 5. Valores obtenidos del sensor modificado con AuNPs-tiol para el estudio de los límites de detección.

Por tanto, los resultados son: LD onda anódica (catecol) = $6.27523 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ y LD onda catódica (catecol) = $6.03563 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Tras dicho análisis, es preciso presentar finalmente los límites de detección del catecol del sensor sin modificar, para conocer si los sensores modificados que se han desarrollado, producen mejoras en los límites de detección.

En la figura 126 se presentaba la respuesta propia del sensor sin modificar en buffer fosfato, mostrándose un voltamograma sin procesos redox y este será el blanco con el que se calculará la desviación típica.

Para los cálculos de los límites de detección en el pico de oxidación del catecol y en el de reducción del catecol, se volvieron a emplear concentraciones de catecol desde $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ a $1.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, así como la tabla 3.

De nuevo, en la figura 139 se muestran los voltamogramas de las siete adiciones que se han llevado a cabo en este caso, representados por su último ciclo.

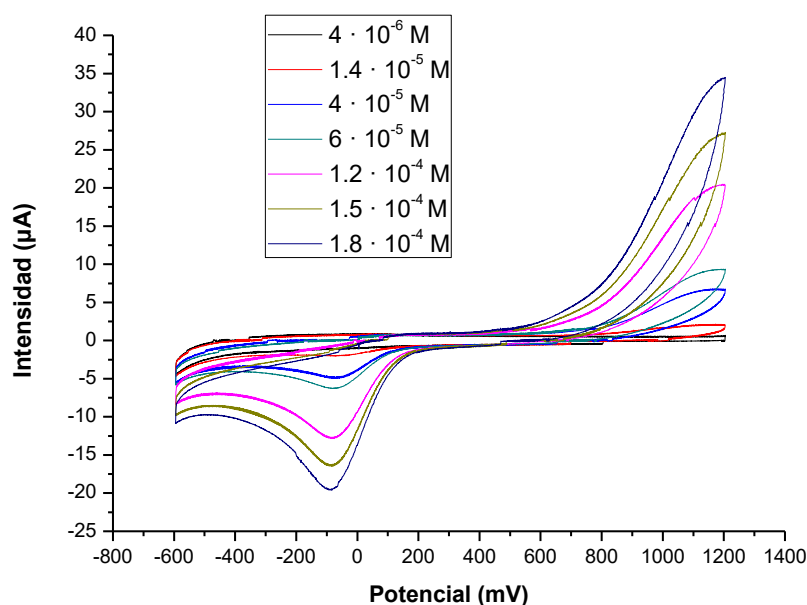


Figura 139. Voltamogramas solapados del sensor sin modificar, sumergido en 50 mL de catecol para el estudio de límites de detección.

Para los límites de onda anódica y catódica se muestran la rectas de calibración para las concentraciones elegidas en el último ciclo de cada caso:

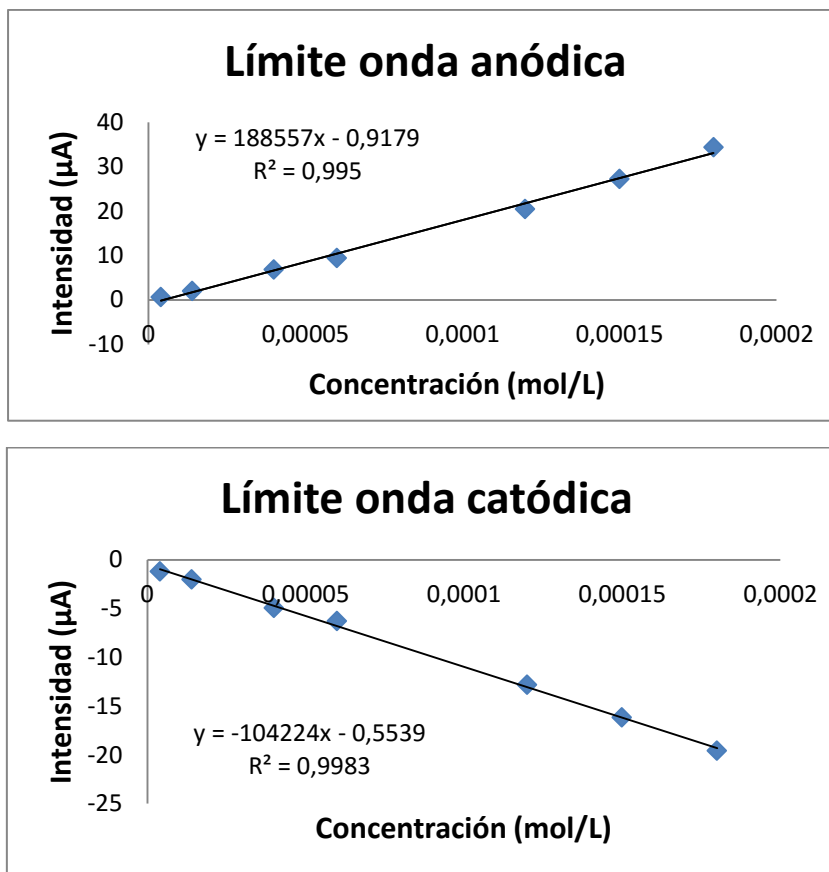


Figura 140. Ajustes lineales de gráficas para el estudio del límite de detección de onda anódica y catódica del sensor sin modificar.

Por lo tanto, se obtiene lo siguiente:

Límite onda anódica		Límite onda catódica	
Intensidad (μA)	Catecol (μA)	Intensidad (μA)	Catecol (μA)
0.63	200	-1.20	200
2.00	700	-2.04	700
6.77	2000	-4.96	2000
9.38	3000	-6.28	3000
20.40	6000	-12.84	6000
27.20	7500	-16.16	7500
34.30	9000	-19.60	9000

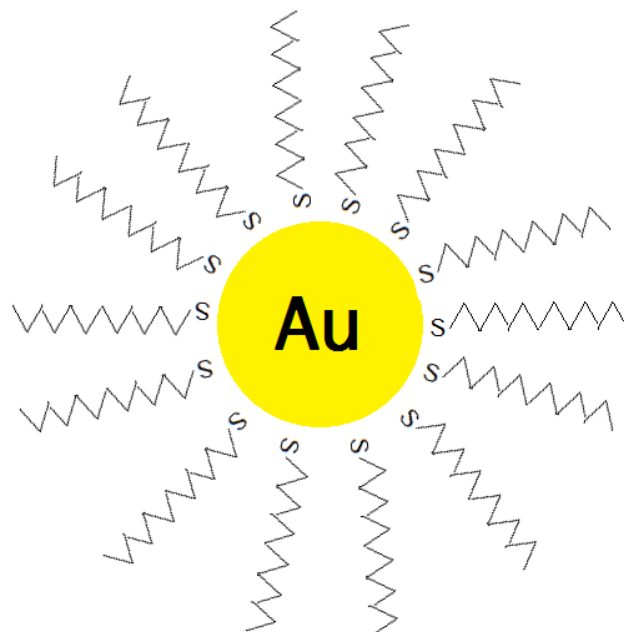
Tabla 6. Valores obtenidos del sensor sin modificar para el estudio de los límites de detección.



Una vez determinada la SD y la m , los resultados son: LD onda anódica (catecol) = $5.02656 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y LD onda catódica (catecol) = $1.98593 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

A la vista de estos resultados, se puede concluir por un lado, que el sensor modificado con AuNPs-tiol para la detección de catecol resulta muy adecuado ya que detecta concentraciones de este antioxidante a niveles muy inferiores a los encontrados habitualmente en los alimentos, mientras que por otro lado, el límite de detección de onda anódica del catecol del sensor modificado, mejora en un orden de magnitud con respecto al sensor sin modificar.





Capítulo 3. Conclusiones.



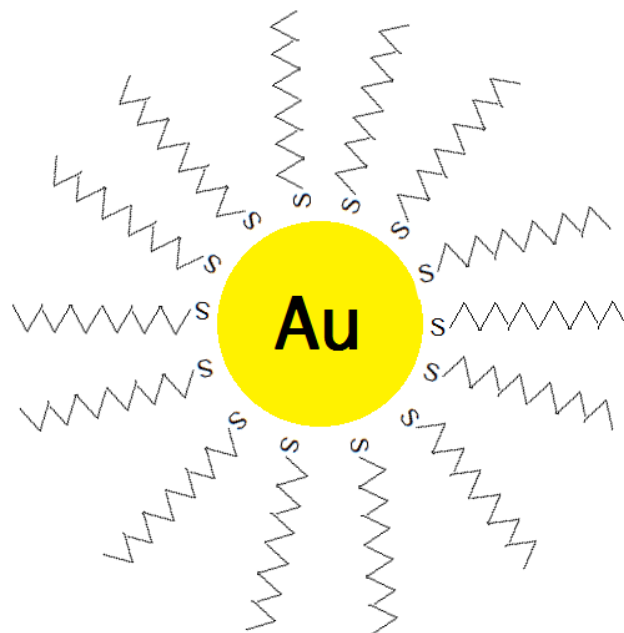


- 1) Se ha implementado el método de Brust-Schiffrin para obtener AuNPs funcionalizadas con 1-dodecanotiol y se han caracterizado mediante diferentes técnicas:
 - a. La espectroscopia de absorción Uv-vis, ha demostrado que las AuNPs-tiol poseen una banda de plasmón de resonancia entre 500 nm y 600 nm.
 - b. La espectroscopia FT-IR, ha demostrado la formación del enlace tiolato y la desaparición del enlace tiol, pudiéndose corroborar la funcionalización de las AuNPs.
 - c. La microscopía electrónica de transmisión, ha permitido observar la geometría esférica de las AuNPs-tiol, su distribución de tamaños entre 1 nm y 3 nm, así como la ausencia de agregados.

- 2) La síntesis de AuNPs-tiol mediante el método de Brust-Schiffrin es eficaz:
 - a. Permite obtener coloides estables durante semanas y con capacidad de resuspenderse sin cambio de sus propiedades.
 - b. Permite controlar el tamaño de las AuNPs variando las condiciones de síntesis así como la posibilidad de diseñar nuevas funcionalizaciones.

- 3) Se han desarrollado sensores electroquímicos voltamétricos modificando vidrios conductores con las AuNPs-tiol, siendo estos sensores capaces de detectar el antioxidante catecol:
 - a. Los sensores modificados con AuNPs-tiol muestran un buen comportamiento electrocatalítico, provocando un aumento de la intensidad en las voltametrías cíclicas.
 - b. Estos sensores modificados con AuNPs-tiol, tienen una buena reproducibilidad, repetitividad y estabilidad.
 - c. Poseen bajos límites de detección de catecol del orden 10^{-5} y 10^{-6} M, lo que indica que son altamente sensibles, detectando trazas de catecol muy por debajo de las concentraciones habituales en la industria alimentaria.





Capítulo 4. Bibliografía.

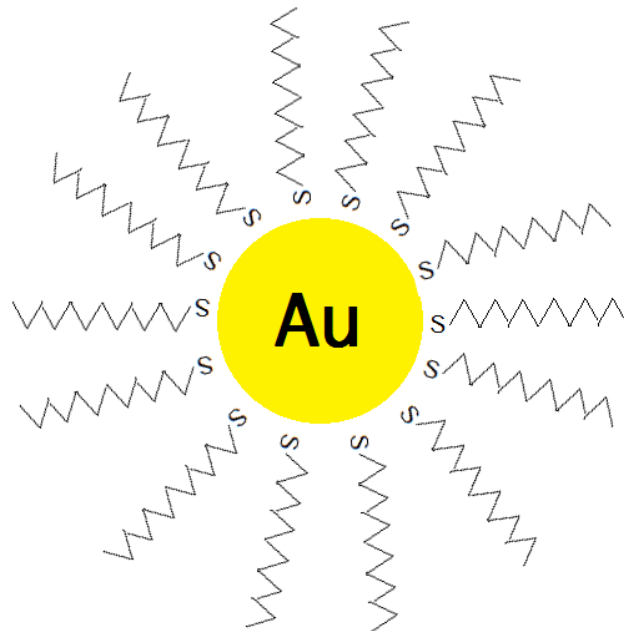




- (1) Hornyak, Gabor L., et al. Introduction to nanoscience. Editorial CRC press, 2008.
- (2) Lindsay, S. M. Introduction to nanoscience. Editorial Oxford University Press, 2010.
- (3) Valcárcel, Miguel., et al. Gold nanoparticles in analytical chemistry. Editorial Elsevier, 2014.
- (4) Martínez, Joaquín C. G. De nanopartículas metálicas encapsuladas en dendrímeros a clúster con monocapa orgánica. Anales de la Real Sociedad Española de Química, vol. 102, no 4, p. 23-29, 2006.
- (5) Ghosh, Sujit K., et al. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications. Chemical Reviews, vol. 107, no 11, p. 4797-4862, 2007.
- (6) Goldmann, Claire., et al. Charge transfer at hybrid interfaces: plasmonics of aromatic thiol-capped gold nanoparticles. ACS nano, vol. 9, no 7, p. 7572-7582, 2015.
- (7) Zhao, Pengxiang., et al. State of the art in gold nanoparticle synthesis. Coordination Chemistry Reviews, vol. 257, no 3, p. 638-665, 2013.
- (8) Monge, Miguel. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. Anales de la Real Sociedad Española de Química, vol 105, no 1, 2014.
- (9) Liz-Marzán, Luis M. Nanometals: formation and color. Materials Today, vol. 7, no 2, 2004.
- (10) Kimling, J., et al. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 110, no 32, p. 15700-15707, 2006.
- (11) Barnard, Amanda S. Modeling the impact of alkanethiol SAM son the morphology of gold nanocrystals. Crystal Growth & Design, vol. 13, no 12, p. 5433-5441, 2013.
- (12) Liao, Jianhui., et al. Linear aggregation of gold nanoparticles in etanol. Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 223, no 1, p. 177-183, 2003.
- (13) Lorente, A. I. L., et al. Analytical potential of hybrid nanoparticles. Analytical Bioanalytical Chemistry, vol. 399, no 1, p. 43-54, 2001.
- (14) Meyers, D. Surfaces, interfaces and colloids. VCH Publ., New York, USA, 1991.
- (15) Krieg, Elisha., et al. Separation, immobilization, and biocatalytic utilization of proteins by a supramolecular membrane. Plos One, vol. 8, no 5, p. e63188, 2013.
- (16) Hernández, Lucas H., et al. Introducción al análisis instrumental. Editorial Ariel, 2002.



- (17) Shimizu, Takami., et al. Size evolution of alkanethiol-protected gold nanoparticles by heat treatment in the solid state. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no 12, p. 2719-2724, 2003.
- (18) Vidal, Carlos A. G., et al. Chemical sensors, biosensors and thick-film technology. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 14, no 5, p. 225-231, 1995.
- (19) Chicharro, María Lourdes A., et al. Biosensores electroquímicos basados en el empleo de nanopartículas de oro. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, no 3, p. 12-16, 2005.
- (20) Kissinger, Peter T., et al. Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, vol. 60, no 9, p. 702, 1983.
- (21) Brust, Mathias., et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of Chemical Society*, no 7, p. 801-802, 1994.
- (22) Prasad, B. L. V., et al. Digestive ripening of thiolated gold nanoparticles: the effect of alkyl chain length. *Langmuir*, vol. 18, no 20, p. 7515-7520, 2002.
- (23) Pretsch, Ernö., et al. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Editorial Masson, 2002.
- (24) Plaza, Cristina M., et al. Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, vol. 853, p. 572-578, 2015.
- (25) Quiñones, Mar., et al. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, vol. 27, no 1, p. 76-89, 2012.
- (26) Plaza, Cristina M., et al. Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines, vol. 815, p. 95-102, 2014.



Capítulo 5. Anexos.



1.- ESPECTROS UV-VIS DE DISOLVENTES Y LIGANDOS:

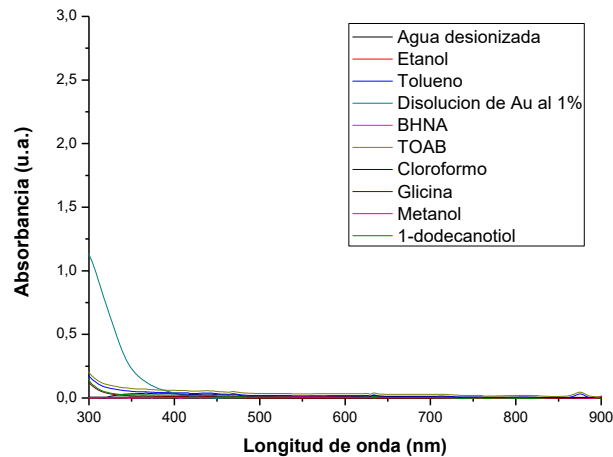


Figura 141. Espectro Uv-vis con 3 mL de distintos disolventes y ligandos.

Como se puede observar, los disolventes y ligandos no absorben en el intervalo de longitudes de onda empleado, a excepción de levemente la disolución de cloruro de oro al 1%. Esto indica que los picos de absorción observados en las medidas experimentales, corresponden a los plasmones de las AuNPs sin intervenir otros compuestos que enmascaren los resultados.

2.- PUESTA EN MARCHA DE UN ROTAVAPOR:

El esquema típico de un rotavapor es el mostrado en la figura 142:



Figura 142. Esquema típico de un rotavapor.



Para realizar la puesta en marcha del rotavapor se procede del siguiente modo:

- Se coloca la disolución cuyo disolvente se quiere evaporar en un matraz de destilación de fondo redondo.
- Se comprueba que el matraz colector está vacío y que el tubo evaporador está limpio (aquel al que se une el matraz de destilación).
- Se acopla el matraz de destilación a la boca esmerilada del tubo evaporador y se sujeta con una pinza.
- Se abre el agua del refrigerante.
- Se enciende el motor que hace girar el matraz y se regula la velocidad de giro.
- Se conecta la fuente de vacío y se cierra la llave de conexión con la atmósfera.
- Mediante la ayuda de un gato, el montaje se baja hasta que el matraz de destilación quede parcialmente sumergido en el baño termostático.
- Se enciende la calefacción del baño y se calienta a la temperatura mínima necesaria para conseguir la evaporación del disolvente.
- Alcanzados los 10 mL en el matraz de destilación, se acciona el gato para levantar el montaje hasta poder sacar el matraz de destilación del baño termostático.
- Se desconecta en primer lugar el vacío, abriendo la llave que comunica el sistema con el exterior.
- Después, se detiene el motor rotatorio y se retira el matraz de destilación.
- Se cierra la fuente de vacío, el agua refrigerante y se apaga la calefacción del baño.
- Finalmente, se vacía el contenido del matraz colector y se comprueba que el tubo evaporador está limpio, en caso contrario, lavar con acetona.

3.- PROTOCOLO 1: PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS CON KBR PARA ANÁLISIS EN IR:

3.1- Objetivo:

Conocer la técnica de preparación de pastillas de KBr utilizando una prensa de laboratorio y un molde para preparar pastillas al vacío, así como conocer la técnica de desmoldar una pastilla correctamente.



3.2.- Fundamento teórico:

En todo procesado de un material hay una formulación con mezclado de materias primas, un conformado y un sinterizado.

Las materias primas deben adicionarse en la cantidad apropiada (formulación) y mezclarse hasta alcanzar la homogeneidad.

En la etapa de conformado, se trabajan las materias primas para dar forma de pastilla, mientras que el sinterizado consiste en el tratamiento por el cual las partículas de las materias primas quedan unidas formando la pastilla sólida.

En algunos procesos de conformado. Se realiza antes del sinterizado, en otros después y en otros al mismo tiempo (prensado en caliente).

El prensado se usa para el conformado y sinterizado. El aumento de presión puede ir acompañado o no de un incremento de temperatura para modificar la viscosidad de la mezcla de materias primas y así facilitar la difusión de especies.

El bromuro potásico, el cual es un material cerámico, actúa como ligante y plastificante ya que facilita el prensado, pero existen otros múltiples materiales para preparar las pastillas. El criterio de elección debe ser aquel que sea transparente en el intervalo espectral donde se va a trabajar para no interferir con la muestra.

3.3.- Material e instrumentación necesarios:

- Mortero de ágata.
- Espátula.
- Vidrio de reloj.
- Portaobjetos.
- KBr puro.
- Balanza analítica.
- Molde de pastillas de KBr al vacío.
- Prensa de laboratorio (hasta 15 Tm).

3.4.- Desarrollo práctico:

Se realizará el proceso en 5 etapas:

- Dosificación.
- Mezclado.
- Llenado del molde.
- Prensado.
- Desmoldado.

Importante: antes de iniciar el proceso, conviene limpiar el mortero de ágata con cloroformo (en una campana de extracción) y con un paño limpio y seco limpiar todas las piezas que componen el molde de pastillas.

Importante: durante dicho proceso ningún material debe estar en contacto con agua ya que el KBr es altamente higroscópico.

Importante: el KBr debe estar siempre almacenado en un desecador y se debe manipular con cierta agilidad para que no capte humedad durante el proceso.

Dosificación:

La mezcla con la que se elaborará la pastilla tiene dos componentes: la muestra y el KBr. La relación en peso muestra/KBr suele ser 1/100, pero también puede llegar hasta 10/100. Por tanto, las proporciones pueden variarse y es un paso a optimizar.

Se pesa el KBr en una balanza analítica sobre un vidrio de reloj con la ayuda de una espátula y se pasa al mortero de ágata (figura 1).

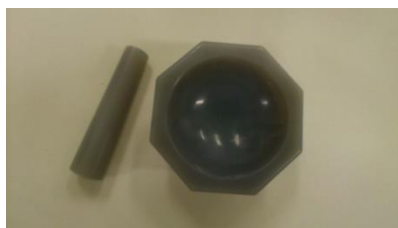


Figura 1.

A la hora de pesar la muestra puede haber dos situaciones, que se encuentre en estado sólido o que se encuentre en estado líquido. Si está en estado sólido basta con pesar en la balanza analítica, si está en estado líquido una vez pesado el KBr y volcado al mortero, con un cuentagotas se adicionan las gotas precisas dependiendo de la concentración de la muestra.

Importante: para la elaboración de pastillas con muestras líquidas, se recomienda en casos de disoluciones con un solvente altamente volátil que permita asegurarse de que no queda ninguna traza líquida para el posterior prensado de la pastilla. Si no es el caso, se recomienda usar celdas de muestras líquidas.

Mezclado:

Se realizará en el mortero de ágata, aplicando movimientos circulares continuados a las materias primas hasta obtener una mezcla homogénea.

El tiempo de mezclado no será inferior a 3 minutos. La mezcla debe tener un color y apariencia homogénea al final del mezclado. En caso contrario, el espectro presentará poca resolución y unas bandas distorsionadas.

Llenado del molde:

El molde consiste en un cuerpo principal cilíndrico hueco capaz de soportar altas presiones (figura 2).



Figura 2.

También posee un cilindro pequeño (figura 3) y un émbolo (figura 4) con una cara pulida a espejo en cada uno.



Figura 3.

Figura 4.

Contiene una base resistente compuesta de dos piezas, donde una de ellas permite hacer vacío a través de un tubo a la vez que se aplica la presión para eliminar el aire y humedad (figura 5), mientras que la otra pieza es una base de acero inoxidable que sustenta todo el molde (figura 6).



Figura 5.

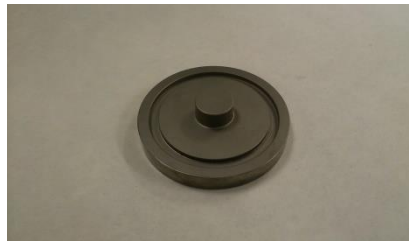


Figura 6.

A estas piezas hay que añadir 3 juntas y una arilla de aluminio como en la figura 7:



Figura 7.

Para su montaje se procede del siguiente modo: se dispone la base (figura 6) y se coloca una junta como se muestra a continuación:



Figura 8.

Sobre esta base, se encaja la pieza que permite hacer vacío (figura 5) y se introduce el cilindro con la cara pulida a espejo hacia el exterior como se muestra:



Figura 9.

A continuación, se coloca otra junta:



Figura 10.

Por último, se encaja el cuerpo principal (figura 2) como se muestra en la figura 11:



Figura 11.

Una vez montado el molde, con la ayuda de una espátula, se vierte la mezcla en el hueco del molde, se reparte homogéneamente en el molde dando pequeños golpes, pero nunca se debe introducir ningún objeto en el molde ya que puede dañar la superficie pulida a espejo.

Después, se coloca el émbolo con la cara pulida en contacto con la mezcla dejándolo deslizar y se coloca una última junta como en la figura 12:



Figura 12.

Finalmente se coloca una arilla de aluminio como se muestra en la siguiente figura:



Figura 13.

Prensado:

Se coloca bien el molde una vez lleno en la prensa, dejándolo correctamente centrado en el círculo dibujado en la parte superior de la prensa (figura 14):



Figura 14.

Se revisa que el tornillo inferior central que controla la presión de la prensa esté girado completamente a favor de las agujas del reloj.

Finalmente se sube y baja el mango inferior lateral derecho hasta aplicar una presión lo suficientemente elevada, la cual se mantiene entre 5 y 10 minutos.

Importante: no se debe sobrepasar la presión de 10 toneladas ya que se puede romper el molde y la pastilla no sale correctamente.

Pasado el tiempo, se gira el tornillo inferior central en sentido contrario a las agujas del reloj y se recupera el molde.

Desmoldado:

La pastilla preparada tendrá un diámetro de 13 mm y es muy frágil, por lo que hay que tener sumo cuidado y habilidad para desmoldarla sin que se rompa.

Se invierte la posición del molde, se retira la base mostrada anteriormente en la figura 6 y con la palma de la mano se presiona firmemente para que el cuerpo deslice por el émbolo y así sacar la pastilla.

Si los cilindros están muy atascados, se puede llevar de nuevo a la prensa, aplicando progresivamente presión, hasta que comience a deslizar el émbolo (figura 15) y ya de nuevo con la mano, aplicar presión para poder sacar la pastilla.



Figura 15.

Una vez liberada la pastilla, se retira el cilindro pulido a espejo y con la ayuda de una espátula se recoge la pastilla y se lleva a un portaobjetos para así guardarse en el desecador.

Si el molde está sucio se vuelve a limpiar con un paño limpio y seco todas sus piezas o si fuera necesario usando acetona, así como el mortero nuevamente con cloroformo.

Si se ha preparado la pastilla partiendo de muestra líquida, se puede llevar la pastilla a una estufa a una temperatura inferior a 80°C durante unas horas para asegurar la completa evaporación del disolvente, si se conoce previamente la estabilidad ante el calor de la muestra.

En el laboratorio, se dispone de otro molde de pastillas de KBr al vacío cuyo montaje es el siguiente:

Se parte de una base metálica como la mostrada en la figura 16:



Figura 16.

A dicha base se sitúa un cilindro con la cara pulida a espejo hacia fuera (figura 17):



Figura 17.

Después, se coloca una arilla ancha metálica (figura 18):



Figura 18.

En este momento la muestra con KBr pulida en el mortero se vuelca al hueco del molde con ayuda de una espátula y con cuidado de que no se raye la cara pulida a espejo.

A continuación, se sitúa otro cilindro metálico con la cara pulida a espejo hacia donde se encuentra la muestra (figura 19):



Figura 19.

Tras esto, se coloca la pieza que dispone de un tubo metálico el cual permite hacer el vacío (figura 20):



Figura 20.

Finalmente, se coloca el muelle y el émbolo como se muestra en la siguiente figura:



Figura 21.

Al llegar a este paso, se lleva el molde a la prensa. Para el desmoldado se procede de forma similar que en otros modelos.

Importante: este modelo forma pastillas de KBr de 13 mm de diámetro.

4.- PROTOCOLO 2: COLOCACIÓN DE PASTILLAS DE KBr PARA ANÁLISIS IR EN DISTINTOS SOPORTES:

4.1.- Objetivo:

Conocer las diferentes maneras de sostener pastillas en distintos portamuestras.

4.2.- Material e instrumentación necesarios:

- Pastilla de KBr.
- Pinzas.
- Portamuestra.

4.3.- Desarrollo práctico:

Hay múltiples formas de sostener pastillas, algunas de ellas son:

Portamuestras con cierre clip: su funcionamiento se basa en sostener la pastilla con unas pinzas, abrir el clip, centrar la pastilla y después cerrar el clip.



Figura 1.

Soporte magnético: para ello hay una placa trasera de acero donde se coloca la banda magnética de cavidad circular (figura 2):



Figura 2.

A continuación, se sitúa la pastilla en la cavidad central con la ayuda de unas pinzas (figura 3):



Figura 3.

Tras el paso anterior, se sitúa una última banda magnética que se encuentra dividida en dos mitades como se muestra en la figura 4:



Figura 4.

Cartas para pastillas de KBr: su cara interior es adhesiva, por lo que se retira el protector adhesivo, se centra la pastilla en la carta con la ayuda de unas pinzas, se dobla la carta y se cierra asegurando que ambas mitades estén correctamente pegadas (figura 5):



Figura 5.

5.- PROTOCOLO 3: PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS PARA ANÁLISIS FT-IR EN DISTINTOS SOPORTES:

5.1.- Objetivo:

Conocer las diferentes maneras de contener muestras líquidas en distintos soportes.

5.2.- Material e instrumentación necesarios:

- Muestra líquida.
- Soporte.
- Cuentagotas.

5.3.- Desarrollo práctico:

Hay múltiples formas de preparar muestras líquidas, algunas de ellas son:

Celda de transmisión para líquidos desmontable: su gran ventaja es la facilidad para ser desmontada para la limpieza o para cambiar las ventanas o los espaciadores. Se aplica a todo tipo de líquidos incluyendo análisis cuantitativos.

A la placa posterior metálica, se coloca una junta de teflón en el espacio de trabajo (figura 1):



Figura 1.

En el siguiente paso, se coloca una ventana de KBr o del material que se precise sin perforar (figura 2):



Figura 2.

Luego, un espaciador (figura 3) que dependiendo de la concentración de la muestra, se dispone de diferentes espesores como de 0.05 mm, 0.015 mm, 0.025 mm, 0.1 mm, 0.2 mm y 0.5 mm:



Figura 3.

Se coloca una nueva ventana de KBr (o del material que se precise) pero esta vez con dos perforaciones (figura 4):



Figura 4.

Nuevamente, se coloca una junta de teflón, asegurando que sus perforaciones están alineadas con las perforaciones de la ventana de KBr tal y como se muestra en la figura 5:



Figura 5.

Ahora se coloca la placa con dos tapones como en la figura 6, volviéndose a asegurar que los tapones están alineados con el resto de perforaciones:



Figura 6.

Se coloca encima de la placa un anillo de teflón con forma de 'O' y encima de este un anillo de compensación de 2 mm de sección cuadrada. Por último, se rosca la tapa con las manos y sin ninguna herramienta como alicates o llaves obteniendo el montaje mostrado en la figura 7:



Figura 7.



El llenado de la célula (conjunto de piezas colocadas en el espacio de trabajo de la placa posterior metálica) sólo se realiza cuando está en el soporte.

Para ello se quitan los dos tapones y se conecta una jeringa llena en el agujero izquierdo y una jeringa vacía (sin aire) en el agujero derecho.

Lentamente se levanta el émbolo de la jeringa vacía para que así la jeringa llena se vaya vaciando e introduciendo la muestra dentro de la célula.

Importante: no se debe limpiar la celda nunca con agua, ya que la mayoría de los materiales con los que se hacen las ventanas son altamente higroscópicos. Las ventanas se limpian antes y después de aplicarle la muestra, para ello se coloca una servilleta limpia en la mesa y se ubica sobre ella una de las ventanas. Se agrega acetona encima de la ventana, se sujeta la placa por los extremos con el dedo pulgar e índice y se frota de una manera suave con movimientos circulares sobre la servilleta. Este procedimiento se repite para ambas caras.

Importante: cuando no se usen las ventanas, deben almacenarse en un desecador.

Importante: la elección del material de la ventana debe ser aquel que sea transparente en el intervalo espectral donde se va a trabajar para no interferir con la muestra.

