

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Síntesis, modificación superficial y caracterización de nanopartículas de oro

Drashti Mansukhani Chetwani Julio 2015, Oviedo



José Manuel Costa Fernández, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado "Síntesis, modificación superficial y caracterización de nanopartículas de oro"

ha sido realizado por el alumno Drashti Mansukhani Chetwani bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 14 de Julio de 2015

Fdo: José Manuel Costa Fernández

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Nanotecnología y Nanoestructuras	2
I.2. Nanopartículas Metálicas	3
I.2.1. Propiedades	4
I.2.2. Métodos de síntesis y caracterización	5
I.2.3. Aplicaciones de las MNPs en Química Analítica	6
I.3. Nanopartículas de oro	9
I.4. Estabilización y solubilización de MNPs	11
I.4.1. Tipos de ligandos empleados en la estabilización y solubilización d	le MNPs
	13
I.4.2. Ácido dihidrolipoico	14
I.4.3. Compuestos con base de polietilenglicol	15
II. OBJETIVOS	17
III. PARTE EXPERIMENTAL	20
III.1. Instrumentación y Reactivos	21
III.1.1. Instrumentos y aparatos	21
III.1.2. Software y programas informáticos	21
III.1.3. Material	22
III.1.4. Reactivos y disoluciones	22
III.2. Métodos experimentales	23
III.2.1. Síntesis y purificación de nanopartículas de oro	23
III.2.2. Caracterización de las AuNPs sintetizadas con citrato	25
III.2.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión	25
III.2.2.2. Espectrofotometría UV-Visible	25

III.2.3. Obtención y purificación de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-		
PEG-SH	25	
III.2.4. Caracterización de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH	26	
III.2.4.1. Espectrofotometría UV-Visible	26	
III.2.4.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer	26	
III.2.4.1.2. Estabilidad a la variación del pH	26	
III.2.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	27	
III.2.4.3. Dinamic Light Scattering	27	
III.2.4.4. Electroforesis en gel	27	
III.2.5. Caracterización de las AuNPs sin modificar comerciales	28	
III.2.6. Obtención y purificación de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH	4 28	
III.2.7. Caracterización de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o Me	0-	
PEG-SH	29	
III.2.7.1. Espectrofotometría UV-Visible	29	
III.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	29	
III.2.7.3. Dinamic Light Scattering	29	
III.2.7.4. Electroforesis en gel	29	
III.2.7.5. Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo	29	
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31	
IV.1. Caracterización de las AuNPs sintetizadas con citrato	32	
IV.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión	32	
IV.1.2. Espectrofotometría UV-Visible	33	
IV.2. Obtención y purificación de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH		
	34	
IV.3. Caracterización de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH	36	

IV.3.1. Espectrofotometría UV-Visible	36
IV.3.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer	36
IV.3.1.2. Estabilidad a la variación del pH	38
IV.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	39
IV.3.3. Dinamic Light Scattering	39
IV.3.4. Electroforesis en gel	42
IV.4. Caracterización de las AuNPs comerciales	44
IV.4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectrofotometría UV- Visible	44
IV.5. Obtención y purificación de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/c MeO-PEG-SH	, 46
IV.6. Caracterización de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PI	EG-
SH	46
IV.6.1. Espectrofotometría UV-Visible	46
IV.6.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer y a la variación del pH	46
IV.6.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	47
IV.6.3. Dinamic Light Scattering	48
IV.6.4. Electroforesis en gel	49
IV.6.5. Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo	50
V. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS	52
VI. BIBLIOGRAFÍA	56

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Nanotecnología y Nanoestructuras

La síntesis, caracterización y aplicación de materiales nanoestructurados, especialmente nanopartículas metálicas, han despertado gran interés a lo largo de la última década debido a las propiedades únicas que las hacen diferentes y aplicables en distintos campos de la ciencia y tecnología.¹

Las propiedades especiales de las nanoestructuras se han puesto de manifiesto desde la antigüedad, aunque sin saberlo y sin hacerlo de forma controlada. Así, los brillantes colores de las vidrieras medievales o las propiedades ópticas especiales de la copa de Lycurgus hoy en día se explican una vez comprobada la existencia de nanocristales en sus estructuras. La primera explicación en relación con el mundo nano fue dada por Faraday en 1857, quién atribuyó el color de las disoluciones de oro al pequeño tamaño y naturaleza coloidal de las partículas de oro.² Sin embargo, el verdadero interés de los investigadores para explorar las propiedades de los nanomateriales surgió a raíz del famoso discurso dado por Richard Feynman en diciembre de 1959, titulado "There is plenty of room at the bottom" ("En el fondo hav espacio de sobra").³ Este fue el punto de inicio de una nueva rama de investigación, la Nanotecnología, ciencia interdisciplinar en la que están involucradas la química, la biología, la física, la ciencia de los materiales y diversas ramas de las ingenierías, ya que comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala.⁴ La escala nanométrica hace referencia directa al nanómetro, unidad de longitud que equivale a una mil millonésima parte de un metro (1 nm = 10^{-9} m) y se considera que está comprendida entre 1 y 100 nm.

Entre otros, la generación de nuevas estructuras "nano" ha supuesto la mejoría o creación de métodos de detección, caracterización y cuantificación adaptados a las dimensiones y propiedades de estos nanomateriales, los cuales se pueden utilizar como herramientas para el desarrollo o la mejora de diferentes procesos analíticos, hecho que directamente involucra una relación bidireccional entre la Nanotecnología y la Química Analítica.

Actualmente, es difícil establecer una descripción inequívoca para las Nanoestructuras debido a la diversidad de definiciones que se pueden encontrar en la bibliografía y que se diferencian en pequeños aspectos. Sin embargo, de forma general se podría decir que las Nanoestructuras son materiales y/o partículas que tienen al menos una dimensión entre 1 y 100 nanómetros y se definen como la unión entre varios átomos que constituyen un estado intermedio entre átomos individuales y agregados macroscópicos.⁵⁻⁷ Debido a la gran variedad de nanoestructuras, existen diferentes criterios de clasificación, ya sea en función de su naturaleza (metálicas, no metálicas, semiconductoras y orgánicas), su forma (entre las más destacadas esféricas, cúbicas, octaédricas, tetraédricas y dodecaédricas), su homogeneidad o su dimensionalidad, siendo este último criterio el más habitual para realizar la clasificación de las mismas.^{7,8}

I.2. Nanopartículas Metálicas

Las nanopartículas metálicas (MNPs) son un tipo de nanoestructuras que están formadas por unas pocas hasta las miles de decenas de átomos, encontrándose una alta proporción de los mismos en la superficie.⁹ No se pueden considerar simplemente como diminutas partículas del metal a escala macroscópica, sino que son estructuras que presentan unas propiedades muy diferentes a las de los metales convencionales, lo que se debe a que la estructura en bandas de éstos últimos se rompe en niveles discretos de energía en el caso de las MNPs cuando su tamaño comienza a ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón.¹⁰



Figura I. Ilustración esquemática de los niveles de energía en función de la densidad de estados para sistemas metálicos de distinto tamaño.⁹

El fenómeno mencionado en el párrafo anterior se ilustra en la Figura I, donde se puede observar que la densidad de estados y el espacio existente entre los niveles

3

energéticos varían con el tamaño, lo que implica que a medida que disminuye el tamaño de partícula aumenta el "bandgap" efectivo, produciéndose variaciones en las propiedades de los metales macroscópicos, como por ejemplo, el desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda más energéticas en el espectro de absorción.⁹

I.2.1. Propiedades

Las nanopartículas de origen metálico, en especial las de los metales nobles como el Oro, la Plata, el Platino y el Paladio, exhiben propiedades ópticas, electrónicas, químicas y magnéticas que dependen significativamente de la forma y el tamaño y que son estrictamente diferentes a las de los metales cuando se encuentran a escala macroscópica como consecuencia principal de que presentan una gran área superficial por unidad de volumen.^{2,11} La relación superficie/volumen aumenta drásticamente cuando se produce la disminución en el tamaño. Así por ejemplo, una nanopartícula metálica de 10 nm de diámetro poseerá aproximadamente el 10 % de los átomos en la superficie mientras que una de 1 nm de diámetro tendrá el 100 % de sus átomos formando parte de la superficie, lo que hace que se alcance una mayor reactividad y las nanopartículas presenten sus propiedades únicas.¹⁰

Entre las propiedades especiales demostradas por las MNPs cabe destacar el fenómeno conocido como resonancia de plasmón superficial (en la literatura científica citado por sus siglas en inglés SPR, Surface Plasmon Resonance), que se basa en la interacción del plasmón de superficie con la radiación electromagnética bajo ciertas condiciones, produciéndose la difracción de la radiación de una frecuencia determinada.^{12,13} El plasmón de superficie es un tipo especial de plasmón (fenómeno vibratorio del plasma como consecuencia de la oscilación en resonancia de los electrones que lo componen con la radiación electromagnética) asociado a la superficie de los metales y que hace referencia a las oscilaciones colectivas de electrones restringidos en pequeños volúmenes metálicos. Para que este fenómeno ocurra, el tamaño de la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente.¹²

El estudio de las propiedades de las nanopartículas metálicas como la distribución de tamaño, el tamaño, la forma, la porosidad, la estabilidad en disolución,

la monodispersidad, la carga neta, la adsorción a biomoléculas o la agregación en varios medios requiere de métodos que posibiliten su fabricación controlada y métodos de caracterización apropiados al reducido tamaño de estas MNPs.¹

I.2.2. Métodos de síntesis y caracterización

En cuanto a los métodos de síntesis de este tipo de nanoestructuras, se pueden clasificar como físicos o químicos. La molienda mecánica de partículas micrométricas, la nanolitografía o la pulverización catódica constituyen ejemplos característicos de los métodos físicos. Sin embargo, recientemente los métodos químicos se vienen utilizando con mayor frecuencia.¹⁴ Estos últimos pueden efectuarse a través de dos mecanismos (Figura II), uno de "arriba hacia abajo" (top-down) y otro de "abajo hacia arriba" (bottom-up). El primero consiste en la producción de nanopartículas a partir del material bruto e implica la ruptura del mismo en estructuras más pequeñas mediante el uso de procedimientos químicos. Por otro lado, el objetivo del segundo mecanismo es la síntesis de nanomateriales por reacciones químicas entre especies atómicas y moleculares. Con este último tipo de síntesis se consigue un gran control tanto de tamaño como de las propiedades de las nanopartículas.



Figura II. Ilustración esquemática de los mecanismos de top-down y bottom-up.¹⁵

Una vez obtenidas las MNPs es indispensable recurrir a distintas técnicas de caracterización para conocer su tamaño, forma o comportamiento químico, además de conseguir una alta reproducibilidad en la síntesis y control sobre ellas para poder utilizarlas en las condiciones óptimas en las aplicaciones que se pretendan desarrollar. Esta amplia variedad de herramientas de caracterización también debe ayudar a determinar características tales como la estructura molecular, la composición química, el punto de fusión y ebullición, el pH o la solubilidad para estos nuevos materiales de manera sencilla y asequible.

Las técnicas comúnmente empleadas para la caracterización de nanoestructuras se pueden clasifisicar en función del parámetro a caracterizar (Tabla I).

Parámetro a caracterizar	Técnicas
Tamaño y distribución de tamaño	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) y de alta resolución (HRTEM)
	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)
	Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM)
	Dynamic Light Scattering (DLS)
Morfología	TEM
	SEM
Carga superficial	ζ-Potencial
Propiedades intrínsecas	UV-Visible (absorción del plasmón superficial)
	Fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforecencia)
Composición química y estructural	Espectrometría de masas molecular (MALDI/ESI-MS)
	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos-X (XPS)
	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)
	Espectrometria de Masas elemental (ICP-MS)

Tabla I. Técnicas actuales más utilizadas en la caracterización de nanoestructuras.

I.2.3. Aplicaciones de las MNPs en Química Analítica

Debido a las propiedades únicas que presentan las MNPs, éstas aparecen hoy en día como prometedores marcadores ópticos, permitiendo su utilización en un amplio rango de aplicaciones en diversos campos como, por ejemplo, catalizadores, y electroquímicos, semiconductores. sensores ópticos electrónica y, más recientemente, en el desarrollo de fármacos, sustancias bioactivas, o incluso en diagnóstico clínico.¹⁶⁻¹⁸ De todas ellas, las aplicaciones más llamativas son en biotecnología y biomedicina, en concreto aquellas que involucran la conjugación de las MNPs a moléculas de reconocimiento específico, como anticuerpos o aptámeros, y que tienen como objetivo la determinación selectiva de proteínas y/o ácidos nucleicos a través de bioensayos, por ejemplo, inmunoensayos.

Los métodos inmunoquímicos de análisis están basados en la detección de la interacción reversible altamente selectiva entre un anticuerpo (Ab) y su antígeno (Ag). Son técnicas que aportan grandes ventajas, siendo las más importantes el análisis directo de muestras empleando un pequeño volumen, gran selectividad, un tiempo de análisis relativamente corto, capacidad de alta frecuencia de muestreo y bajo coste.

Los inmunoensayos pueden ser de dos tipos, encontrándose en primer lugar inmunoensayos directos (medida directa de la interacción Ag-Ab) e inmunoensayos indirectos (requieren el uso de material marcado con un trazador para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente en la muestra). Éstos últimos alcanzan mejores límites de detección en el análisis de muestras complejas y se pueden clasificar en función del tipo de marca que se emplea para la detección (radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos fotoluminiscentes, etc.), si es o no necesaria una etapa de separación para distinguir entre la especie marcada libre y el complejo antígeno marcado-anticuerpo (inmunoensayos heterogéneos y homogéneos, respectivamente) y, por último, si el formato de ensayo es competitivo (concentración de analito inversamente proporcional a la señal) o no competitivo (concentración de analito aumenta o disminuye a medida que lo hace la señal de respuesta).

Teniendo en cuenta que existe una gran diversidad de anticuerpos que reconocen distintos antígenos (desde patógenos grandes como virus o bacterias hasta moléculas pequeñas como hormonas, fármacos, toxinas, etc.) y proporcionan elevadas afinidades de enlace con sus respectivos recíprocos incluso en muestras que poseen matrices complejas o cuando la concentración de analito es baja, son el tipo de biomoléculas más utilizadas para aportar especificidad y bioactividad a las nanopartículas.

Debido a lo expuesto en el párrafo anterior, el acoplamiento de anticuerpos u otros elementos de reconocimiento a MNPs puede ser útil en numerosas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, puede tener una trascendental incidencia en fenómenos muy efectivos en la terapia del cáncer como la hipertermia y el transporte selectivo de fármacos. En éste último, las nanopartículas metálicas transportan moléculas (ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares o ADN), enlazadas a los átomos de la superficie, y viajan por el organismo hasta que se depositan en dianas bien definidas. En su lugar de anclaje, liberan las moléculas transportadas dando lugar a una quimioterapia selectiva que reduce al máximo los efectos colaterales.^{14,19} Asimismo, se puede realizar el estudio "in vivo" de moléculas específicas por técnicas de imagen (comúnmente conocidas por el término de "*Imaging*") en células o tejidos, donde la nanopartícula actúa como sonda de marcaje y puede ser metálica, magnética, quantum dot, nanotubo de Carbono, etc. Dentro de estas técnicas, destacan aquellas que ofrecen una elevada sensibilidad, realizan un análisis cualitativo de una muestra ofreciendo información microscópica y macroscópica de alta resolución en tiempo real pero que dependen

drásticamente de las propiedades físicas y químicas de las sondas de marcaje (*"Optical Imaging"*).^{20,21} Por último, se debe mencionar que el diagnóstico de enfermedades empleando el acoplamiento Ab-nanopartícula no solo ha aportado una mejoría en técnicas de detección y cuantificación altamente utilizadas como el ensayo ELISA ("Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay") o PCR ("Polymerase Chain Reaction"), sino que además ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de detección más simples y sensibles.

Para que todas las aplicaciones mencionadas anteriormente aporten resultados exitosos, se deben cumplir dos requisitos. En primer lugar, tiene que existir un control adecuado de la conjugación de los anticuerpos en la superficie de las nanopartículas, lo cual se consigue conociendo el número de ligandos funcionales que poseen las mismas en su superficie. En la mayoría de aplicaciones, es preferible el empleo de nanopartículas que tengan un único anticuerpo conjugado ya que aportan mejores límites de detección y evitan la formación de agrupaciones de moléculas (proteínas, azúcares, etc.) que pueden alterar el comportamiento natural del sistema en estudio, sobre todo en aquellos procesos biológicos que se ven afectados por la multivalencia.²² Por otro lado, se debe asegurar que se mantiene la capacidad de reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo tras la conjugación, propiedad que puede verse alterada si por ejemplo se modifican químicamente los sitios de unión del antígeno o se encuentran impedidos estéricamente una vez se ha producido el acoplamiento. Para cumplir este último requisito, se tienen que emplear distintas estrategias (basadas, entre otros, en adsorción física, enlace covalente directo entre la superficie de la nanopartícula y el Ab o el empleo de moléculas intermedias) que permitan la inmovilización del Ab a la nanopartícula en una determinada orientación.

Debido a la existencia de una gran variedad de nanopartículas metálicas, no existe un protocolo estandarizado para llevar a cabo el proceso de conjugación, lo que implica que sea necesario la optimización de dicho proceso en función del tipo de nanopartícula con la que se trabaje. Además, la elección óptima del método de conjugación a emplear no solo depende del número de ligandos funcionales que están presentes en la superficie de las nanopartículas, sino que también se debe tener en cuenta la densidad de esos grupos por nm² y la estabilidad coloidal de las nanopartículas a diferentes valores de pH y fuerza iónica. No obstante, lo que sí es

común a todos los procesos de conjugación es que una vez se han obtenido las nanopartículas conjugadas con los anticuerpos correspondientes, se debe realizar una etapa correcta de pasivación de los grupos funcionales que se encuentran en la superficie de las nanopartículas y que no han intervenido en el anclaje del anticuerpo. Esto es necesario para evitar adsorciones inespecíficas de proteínas u otras sustancias en aplicaciones biológicas o terapéuticas.

I.3. Nanopartículas de oro

Dentro del extenso campo de las nanopartículas metálicas, el oro constituye una presencia notablemente destacada. Tanto es así que, en los últimos años, la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro así como el estudio de sus aplicaciones en distintos ámbitos se ha convertido en el tema principal de numerosos artículos y publicaciones científicas.²

Entre sus características más importantes, las nanopartículas de oro (AuNPs) presentan atractivas propiedades electrónicas, térmicas, ópticas y catalíticas.²³ En este contexto, la frecuencia de resonancia del plasmón superficial de estas nanopartículas depende de la morfología, tamaño y propiedades dieléctricas de las propias partículas, así como del medio que las contenga y su índice de refracción.^{11,13} Es la resonancia del plasmón superficial lo que provoca que las nanopartículas de oro en disolución presenten color rojo, violeta o azul (Figura III), así como lo que permite que se produzca el intercambio electrónico directo entre las mismas y otras macromoléculas haciéndolas electroquímicamente activas.²⁴ Otros aspectos de interés que presentan estas nanopartículas son su reducida toxicidad, su elevada área superficial que posibilita su multifuncionalidad, su conjugación y biocompatibilidad, su intensa absorción de luz, su elevado índice de conversión fototérmica, su gran fotoestabilidad y, quizás el más importante, su facilidad de síntesis por diversas rutas.^{24,25}



Figura III. Colores de las disoluciones de AuNPs en función del tamaño de partícula.²⁶

9

De los diferentes procedimientos existentes para la síntesis de nanopartículas de oro, los más ampliamente usados son los métodos químicos por "vía húmeda", los cuales consisten en la reducción en disolución de la sal del metal (ácido tetracloroáurico, HAuCl4, o derivados) con diversos agentes precursores tales como citrato sódico, borohidruro sódico, hidracina o formamida, siendo el proceso de reducción del oro el que se esquematiza a continuación:

$Au^{3+} \rightarrow Au^{+} \rightarrow Au^{0}$

Estos métodos químicos son simples, reproducibles y adecuados para la obtención de partículas homogéneas y de escala nanométrica, pudiendo ser tanto esféricas como anisométricas.²⁷ Sin embargo, se debe mencionar que no siempre aportan un control satisfactorio de la forma y tamaño de las partículas y que, en la medida de lo posible, se deben aplicar siguiendo los principios de la química verde mediante la utilización de reactivos respetuosos con el medio ambiente, ya sean disolventes, agentes reductores o agentes estabilizantes usados bajo condiciones suaves de reacción.²⁸ Por norma general, el empleo de precursores con carácter reductor suave conduce a nanopartículas de mayor tamaño que las que se obtendrían al emplear reductores más fuertes. Asimismo, cuanto mayor sea la concentración de reductor, menor es el tamaño de nanopartícula obtenido, como ocurre claramente cuando se emplea el citrato sódico como agente precursor.²⁹

El inconveniente principal de estos métodos químicos es que las suspensiones coloidales formadas son termodinámicamente inestables y las nanopartículas tienden a agregarse fácilmente en disolución acuosa ya que se ven atraídas entre sí por fuerzas de Van der Waals.³⁰⁻³² Además, dicha agregación se ve favorecida en presencia de elevadas concentraciones de sales o ciertas moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas.²⁵ A pesar de que esta agregación es útil en algunas situaciones (por ejemplo, de reconocimiento biomolecular) porque supone un cambio de color de la disolución de rojo a azul, la mayoría de las aplicaciones requieren que las AuNPs se encuentren establemente dispersadas en disolución.^{25,33} Debido a esto, hoy en día existen diversos estudios que se centran en la estabilización y solubilización de AuNPs en medios acuosos. Estos procedimientos, además, tienen la ventaja de que pueden ser extrapolables al resto de nanopartículas metálicas.

I.4. Estabilización y solubilización de MNPs

La estabilización de MNPs en disolución acuosa puede alcanzarse vía electrostática o estérica. La primera se basa en la repulsión coulómbica entre las partículas causada por ligandos iónicos de igual carga que se adsorben sobre la superficie de las mismas mientras que la segunda se produce cuando el centro metálico se rodea de un material voluminoso.³⁰ Esta encapsulación del metal se puede realizar a través de varias estrategias que afectan directamente a la solubilidad de las nanopartículas metálicas.

Una de las principales estrategias consiste en emplear ligandos poliméricos anfifílicos, de manera que se intercalan una serie de cadenas hidrofóbicas que interactúan con las cadenas carbonadas inicialmente presentes en la superficie de la nanopartícula. El polímero anfifílico tiene en su extremo grupos funcionales cargados (generalmente $-COO^{-}$) que constituyen la parte hidrofílica del mismo y que están orientados hacia el exterior para aportar estabilidad coloidal y solubilidad en medio acuoso, actuando a la vez como puntos de enlace a moléculas biológicas que posean una química apta para la bioconjugación.³⁴ Los polímeros anfifílicos utilizados poseen numerosas cadenas hidrofóbicas, por lo que la unión con la nanopartícula metálica está favorecida por los numerosos puntos de contacto entre las cadenas. A pesar de que este método es altamente ventajoso, la longitud de los polímeros utilizados hace que el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula se vea muy incrementado, lo cual no es deseable para algunas aplicaciones.³⁵ Por otro lado, existe una segunda estrategia importante (conocida comúnmente como intercambio de ligandos) que se fundamenta en la sustitución de los compuestos que rodean a las nanopartículas por moléculas bifuncionales que generalmente contienen grupos tioles en uno de los extremos mientras que suelen tener un grupo funcional polar en el otro extremo, consiguiéndose en ese caso nanopartículas directamente solubles en medio acuoso con tamaño hidrodinámico pequeño.35,36

Además de conseguir nanopartículas altamente estabilizadas y solubles en medio acuoso, ambas rutas de modificación también permiten la generación de MNPs con un único ligando por nanopartícula. En el caso de la primera estrategia se puede hacer uso de ligandos poliméricos anfifílicos de gran tamaño porque aportan efectos geométricos y estéricos. De esta manera, aunque se añada un exceso de ligando, se seguirá asociando uno solo por nanopartícula (Figura IV *a*)), obteniéndose una probabilidad baja de conseguir MNPs libres. Por el contrario, si se añade una fracción pequeña de ligandos (menos de uno por nanopartícula), durante la etapa de funcionalización la mayoría de las MNPs no tendrán ligando asociado a la superficie mientras que algunas de ellas tendrán exactamente uno (Figura IV *b*)). En esta última situación, se podría utilizar la cromatografía de afinidad para separar las MNPs que tienen un ligando por nanopartícula de las que no.³⁷



Figura IV. Obtención de MNPs monofuncionalizadas mediante a) y b) ligandos poliméricos anfifílicos de gran tamaño e c) intercambio de ligandos.⁴¹

Si el objetivo es obtener nanopartículas monofuncionalizadas mediante reacciones de intercambio de ligandos, se puede trabajar por ejemplo con nanopartículas que inicialmente se encuentran rodeadas por ligandos alcanotiolados y con un material sólido (p.ej. una resina) que esté unido al grupo funcional (que se desee en las MNPs) de una molécula bifuncional que tiene un grupo tiol en su otro extremo (p.ej. ácido mercaptohexanoico).³⁸ Así, cuando entra en contacto el material sólido con las MNPs, se produce el intercambio de un ligando alcanotiolado por un ligando de ácido mercaptohexanoico en cada una de ellas, obteniéndose un sistema común que enlaza el material sólido con las distintas MNPs (Figura IV c)). Tras la separación de los ligandos de ácido mercaptohexanoico del material sólido y la eliminación de éste, se obtienen cada una de las MNPs funcionalizadas únicamente con un grupo carboxilo.

Si se quieren obtener MNPs con un número preciso de múltiples ligandos funcionales por nanopartícula, valor fundamental para el posterior control de la etapa de bioconjugación, se deben emplear técnicas de fraccionamiento como la electroforesis en gel o la cromatografía.^{39,40} Esto se debe a que, aunque se asuma el 100 % de eficacia de unión, la incubación de "n" ligandos por nanopartícula aporta una distribución estadística que refleja la obtención de MNPs con n-1, n+1, n-2, etc. ligandos superficiales por nanopartícula. La formación de las especie principales de dicha distribución se puede controlar mediante el número de ligandos que se añaden.⁴¹

I.4.1. Tipos de ligandos empleados en la estabilización y solubilización de MNPs

Idealmente, los ligandos deben sintetizarse de manera sencilla a gran escala, tener un tamaño pequeño que minimice el radio hidrodinámico de las nanopartículas funcionalizadas, poseer gran afinidad por la superficie de la nanopartícula permitiendo el acceso de otras moléculas a la misma, no reaccionar indeseadamente con otras sustancias presentes en medios biológicos, no ser tóxicos y, por último, no tener influencia significativa sobre las propiedades intrínsecas de la nanopartícula ni sobre la biomolécula conjugada a la superficie de la misma.³⁵

Gracias a la cantidad de estudios realizados sobre la solubilización de nanopartículas, existen numerosos tipos de ligandos alternativos disponibles (surfactantes, ciclodextrinas, compuestos tiolados, etc.) que se pueden emplear para proporcionar elevada estabilidad coloidal a las MNPs en un intervalo amplio de pH y a distintas concentraciones de sales. En el caso concreto de las AuNPs se ha demostrado que los compuestos tiolados son los que aportan una mayor estabilización y dispersión en disolución acuosa, lo cual se debe básicamente a que los grupos tiol de esos compuestos (bases débiles) poseen elevada afinidad por la superficie del oro (ácido débil), siendo la quimisorción del grupo SH sobre el oro muy selectiva y fuerte (\simeq 30 kcal/mol).⁴²⁻⁴⁴ En función del número de grupos tiol presentes en los ligandos, se pueden encontrar del tipo monodentado y bidentado.

El uso extendido de los ligandos tiolados monodentados surge de la facilidad con la que se pueden utilizar y manejar, su precio y disponibilidad comercial. No obstante, debido a que la interacción metal-tiol es dinámica, las MNPs tienden a precipitar a medio plazo con este tipo de recubrimientos ya que provocan una menor estabilidad coloidal en comparación con ligandos que actúan mediante dos átomos de azufre.³⁵ Ejemplos ilustrativos de este tipo de compuestos más utilizados actualmente

son la Glutationa (GSH), Ácido mercaptopropionico (MPA), Cisteína, Polietilenglicol funcionalizado con grupo tiol (PEG-SH), etc. Para conseguir solucionar los problemas de estabilidad de los recubrimientos monotiolados, bibliográficamente se han propuesto otros compuestos para ejercer dicha función como el ácido dihidrolipoico.

I.4.2. Ácido dihidrolipoico

El ácido dihidrolipoico (DHLA) es una molécula carboxilada que se puede coordinar fuertemente a la superficie de las nanopartículas de oro debido a que presenta un grupo ditiol, actuando como un ligando bidentado ya que reacciona a través de sus dos átomos de azufre (Figura V b)). De esta manera, se obtienen los grupos carboxilo en los extremos exteriores, por lo que la solubilidad en disolución acuosa de los nanopartículas resultantes tras el proceso de intercambio de ligandos depende únicamente de la desprotonación de los grupos carboxilo terminales, lo cual condiciona su estabilidad coloidal a pH básicos.



Figura V. Estructura molecular del a) Ácido lipoico y b) Ácido dihidrolipoico.

Otras ventajas de utilizar este ligando es que se obtiene fácilmente a partir del reactivo comercial Ácido α -lipoico (LA). El LA (Figura V *a*)) es un compuesto organosulfurado que se sintetiza en pequeñas cantidades por microorganismos, plantas, animales y humanos. Además, se caracteriza por ser un derivado del ácido octanoico que posee dos átomos de azufres enlazados al carbono 6 (C₆) y 8 (C₈), respectivamente. El C₆ es el centro quiral de la molécula, por lo que el LA tiene dos isómeros ópticos, el enantiómero R (+) y el S (-), aunque también existe como mezcla racémica. En su forma oxidada, el LA posee un anillo de cinco átomos en el que dos de ellos son los átomos de azufre, que están unidos entre sí mediante un enlace disulfuro (S-S). Esta forma oxidada se puede reducir para dar lugar a una estructura de cadena abierta que posee dos grupos sulfhidrilos, es decir, al DHLA.⁴⁵ En el caso de modificar nanopartículas de oro, no es necesario llevar a cabo una etapa de reducción del enlace disulfuro del LA con borohidruro de sodio (NaBH₄) ya que se produce

directamente la apertura del ciclo cuando entran en contacto las moléculas de LA con las AuNPs debido a la elevada afinidad existente entre el oro y azufre.³⁵ Esto es de gran importancia porque se disminuye el número de etapas para que tenga lugar la modificación, lo que no ocurre en otros casos como por ejemplo en presencia de un tipo muy utilizado de nanopartículas como son los quantum dots (QDs), donde la etapa de reducción previa del LA siempre es necesaria.⁴²

Otras características de los ligandos de DHLA es que pueden inducir interacciones inespecíficas con moléculas cargadas positivamente, por ejemplo, en aplicaciones celulares, fenómeno que se puede reducir porque permiten su modificación con compuestos con base de polietilenglicol que pueden tener diferentes grupos funcionales.⁴⁶⁻⁴⁸

I.4.3. Compuestos con base de polietilenglicol

En su forma más común, el polietilenglicol (PEG) es un poliéter (lineal o ramificado) que posee grupos hidroxilo terminales y cuya estructura general se muestra en la Figura VI. En comparación con otros polímeros, el PEG tiene un índice de polidispersidad en el rango que va desde 1.01 para sustratos PEG de bajo peso molecular (< 5 kDa) hasta 1.1 para compuestos PEG de alto peso molecular (> 50 kDa).⁴⁹



Figura VI. Estructura general del polietilenglicol.

La propiedad más importante del PEG es que es soluble tanto en disoluciones acuosas como en disolventes orgánicos, lo que hace que sea un reactivo muy adecuado empleado en la conjugación química a moléculas biológicas. Además, estudios de PEG en disolución han revelado que típicamente se unen 2 ó 3 moléculas de agua por cada unidad de óxido de etileno presente en la estructura, hecho que si se suma a la elevada flexibilidad de la cadena principal, permite que las moléculas de PEG actúen como si fuesen hasta diez veces más grandes que una proteína soluble de comparable peso molecular. Estas características son las que han justificado la habilidad que presenta el PEG de precipitar proteínas o prevenir la degradación por enzimas.⁴⁹

Gracias a estas propiedades, los recubrimientos con base PEG también aumentan la afinidad de las nanopartículas por el agua y su estabilidad coloidal en disoluciones con gran contenido de sales, reducen las interacciones inespecíficas en medios biológicos y proporcionan a las nanopartículas una biocompatibilidad muy elevada, lo que es esencial para aplicaciones "in vitro" e "in vivo".³⁴ Por otro lado, si el objetivo es acoplar las nanopartículas resultantes de la modificación a moléculas receptoras, se tienen que emplear ligandos PEG que posean grupos funcionales reactivos en uno de sus extremos. Dichos ligandos modificados se consiguen mediante la activación del PEG con el grupo funcional de interés, cuya elección depende del grupo reactivo presente en la molécula que se quiere unir al PEG. Así, al emplear esta estrategia, se controla en todo momento el número de receptores por nanopartícula, o lo que se conoce como valencia de conjugación.⁴³

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, podría justificarse el empleo de PEG y derivados en la solubilización y estabilización de nanopartículas metálicas con fines bioanalíticos.

II. OBJETIVOS

La presente Memoria constituye el Trabajo de Fin de Máster necesario para la superación de los 12 créditos de la asignatura Trabajo Fin de Máster del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo.

Con el trabajo realizado y recogido en dicha Memoria se ha pretendido desarrollar una serie de actividades que permiten complementar la formación adquirida por el alumno firmante del trabajo dentro del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas. Dentro de estas actividades cabe destacar las siguientes:

- Revisión bibliográfica de artículos relacionados con la temática del trabajo, empleándose para ello distintas bases de datos.
- Puesta en práctica e integración de los conocimientos teóricos adquiridos a lo largo de las asignaturas de los diferentes módulos (asignaturas obligatorias, optativas y prácticas en empresa).
- Redacción de la Memoria y exposición y defensa del trabajo realizado.

De acuerdo con lo expuesto en la introducción, el objetivo general que se abordó a lo largo del trabajo experimental fue el estudio de las condiciones más favorables para la obtención de nanopartículas de oro modificadas con Ácido α -lipoico y Monometoxipolietilenglicol funcionalizado con un grupo tiol (MeO-PEG-SH) para un futuro control de la interacción entre un anticuerpo específico y las mencionadas nanopartículas. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

- Síntesis de nanopartículas de oro por el método químico de *vía húmeda*.
- Caracterización básica de las AuNPs sintetizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectrofotometría UV-Visible.
- Caracterización exhaustiva de las AuNPs cuando se modifican mediante un proceso de intercambio de ligandos empleando dos ligandos distintos (Ácido αlipoico y MeO-PEG-SH) en distintos porcentajes en volumen.
- Discusión de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de análisis para las AuNPs sintéticas modificadas y comparación las propiedades observadas al emplear nanopartículas de oro comerciales.

En la caracterización exhaustiva se evalúan las siguientes propiedades:

- ✓ Estudio de estabilidad de las AuNPs modificadas en disolución acuosa a distintos valores de pH y concentración de sales a través de medidas de Espectroscopía UV-Visible.
- ✓ Análisis de la forma, tamaño y grado de homogenización de las AuNPs mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).
- ✓ Evaluación del perfil de distribución de tamaño de las AuNPs modificadas mediante medidas de Dinamic Light Scattering (DLS).
- ✓ Determinación de la carga superficial de las AuNPs solubilizadas por Electroforesis en gel.
- ✓ Medidas de la relación molar azufre/oro (S/Au) para cada tipo de AuNPs modificadas empleando Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

En resumen, a lo largo del trabajo se pretende estudiar la posibilidad de solubilizar AuNPs con Ácido α -lipoico y/ó MeO-PEG-SH y además, se pretende hacer una comparación crítica del empleo de ambos compuestos como agentes estabilizantes de AuNPs empleando para ello una gran variedad de técnica de caracterización complementarias. Esta etapa es necesaria para asegurar un éxito en el futuro empleo de las nanopartículas resultantes de la modificación en bioanálisis.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Instrumentación y Reactivos

En esta sección se enumeran tanto los instrumentos y aparatos utilizados durante el desarrollo del trabajo, así como los diferentes reactivos y disoluciones que se han empleado. También se indican los programas informáticos y "software" en los que el alumno se ha apoyado para evaluar, procesar y expresar los resultados obtenidos.

III.1.1. Instrumentos y aparatos

- Espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10 S UV-Vis.
- Microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL-2000 EX-II de kilovoltaje máximo de 200 kV y poder de resolución de 3,4 Å entre líneas.
- Equipo de medidas de Dynamic Light Scattering (DLS) Zetasizer NazoZS (Malvern Instruments).
- Espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) triple quadrupolo modelo Agilent 8800.
- pH-metro Crison micro pH 2000.
- Unidad de electroforesis horizontal con alimentación eléctrica.
- Equipo de agua Milli-Q Advantage, Millipore.
- Baño de ultrasonidos Selecta "Ultrasons".
- Balanza analítica Mettler Toledo New Classic MS, con precisión hasta ± 0.01 mg.
- Balanza granataria Scaltec SPO 51.
- Centrífuga Heraeus Biofuge Stratus.
- Agitador magnético modelo Agimatic-N (Selecta).

III.1.2. Software y programas informáticos

- UV-Visible Emmafluo Software.
- Microsoft Excel 2007, Microsoft Office. versión 14.0.6129.5000 (32 bits) para el tratamiento de los datos.
- Origin 9 versión 90E.

- Zetasizer Software.
- Sistema digital micrograph GATAN para el tratamiento de las imágenes obtenidas por TEM.

III.1.3. Material

- Micropipetas regulables Eppendorf Research Plus (10-100 µL y 100-1000 µL) con puntas de plástico desechables.
- Celda de cuarzo para medidas espectrofotométricas, Hellma modelo 114F-QS (1400 µL con paso óptico de 10 mm).
- Celda de cuarzo para medidas espectrofotométricas, Hellma modelo 114F-QS (300 µL con paso óptico de 10 mm).
- Celda capilar Zetasizer Nano Series DTS1070 (Malvern).
- Celda de cuarzo ZEN0040, 400 µL (Malvern).
- Tubos Eppendorf con volumen de 1.5 mL.
- Agitadores magnéticos.
- Tubos de plástico con volúmenes de 12 y 50 mL.
- Filtros de ultrafiltración Amicon Ultra de 50 kDa de tamaño de poro de membrana (Millipore).

III.1.4. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados durante la parte experimental han sido de calidad analítica y no se ha realizado ningún tipo de purificación previa a no ser que se indique lo contrario. Las disoluciones acuosas se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de reactivo sólido con agua ultrapura desionizada obtenida en un sistema Milli-Q System.

Reactivos para la síntesis de AuNPs:

- Citrato sódico dihidratado, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O \ge 99\%$ (Sigma-Aldrich).
- Tetracloroaurato de sodio dihidratado, NaAuCl₄·2H₂O 99% (Aldrich).

Reactivos para la modificación del recubrimiento de las AuNPs:

- Ácido α-lipoico, 98+% (Acros Organics).
- Monometoxipolietilenglicol funcionalizado con un grupo tiol, MeO-PEG-SH (Laysan Bio, Inc.).
- Hidróxido sódico, NaOH 99.1 % (Fisher Chemical).

Reactivos y disoluciones para la caracterización y demás estudios:

- AuNPs estabilizadas en buffer de citrato (Aldrich).
- Disoluciones reguladoras: Buffer de fosfatos (PBS) 100 mM y 10 mM a pH 6.7 y 7.4, buffer de Tris-borato-EDTA (TBE) 2.5x y 0.5 x a pH 8.3 y 8.4.
- Agarosa, P.A. (Cambrex).
- Ácido clorhídrico, HCl 37 % P.A. (Merck).
- Cloruro de sodio, NaCl 99 % P.A. (VWR Chemicals Prolabo BDH).
- Cloruro de potasio, KCl 99 % P.A. (Panreac).
- Fosfato de sodio di-básico anhidro, Na₂HPO₄ P.A. (Panreac).
- Fosfato dihidrógeno de potasio, KH₂PO₄ P.A. (Merck).
- Glicerol, 85 % P.A. (Merck).
- Patrón de azufre para ICP, 1000 mg·L⁻¹ S (Merck).
- Patrón de oro para ICP, 1000 mg \cdot L⁻¹ Au (J.T.Baker).

III.2. Métodos experimentales

III.2.1. Síntesis y purificación de nanopartículas de oro

La síntesis de nanopartículas de oro se lleva a cabo en el laboratorio siguiendo un procedimiento descrito por G. Frens.²⁹ Así, se preparan 50 mL de NaAuCl₄·2H₂O al 0.02 % y 10 mL de C₆H₅Na₃O₇·2H₂O al 1% en agua ultrapura Milli-Q. A continuación, se introducen los 50 mL de NaAuCl₄·2H₂O al 0.02 % y un agitador magnético en un matraz de dos bocas, el cual está colocado (al baño María) sobre una placa calefactora que posee sistema de agitación y que está equipada con un controlador de temperatura. Se programa la temperatura a 120 °C y se activa el sistema de agitación, de manera que cuando la disolución hierve, se añade rápidamente 1 mL de $C_6H_5Na_3O_7\cdot 2H_2O$ al 1%. La mezcla resultante se deja en agitación y calentamiento durante diez minutos, observándose un cambio en la coloración de la disolución acuosa de AuCl₄⁻ pasando en primer lugar de un color amarillo pálido inicial a un tono amarillo más intenso y posteriormente a color azul oscuro-violáceo. Tras el calentamiento, se deja enfriar la mezcla durante media hora, tiempo tras el cual la disolución resultante (disolución A) muestra un color rojo rubí, que indica la presencia de AuNPs de aproximadamente 8–10 nm de diámetro e incluso mayores. El cambio de color en la disolución durante el proceso de síntesis es indicativo del avance de la reacción.



Figura VII. Ilustración esquemática del proceso de síntesis y purificación de AuNPs solubilizadas con $C_6H_5Na_3O_72H_2O.$

Tras el proceso de síntesis se lleva a cabo una etapa de purificación en la que se elimina el exceso de reactivos. En este caso, la mayor parte de la disolución A se almacena (en nevera y oscuridad) y la purificación se realiza a unos pocos mililitros de la misma con el objetivo de conocer si las etapas que intervienen en dicha purificación perjudican o favorecen a las AuNPs resultantes. De esta manera, la porción a purificar se hace pasar en primer lugar por un filtro de 0.45 μ m y posteriormente se introduce en un tubo de centrífuga que posee un Amicon de 100 kDa, centrifugándose 10 minutos a 7000 g. El precipitado obtenido se somete a sucesivos lavados y procesos de centrifugación a 7000 g en agua ultrapura Milli-Q (2 x 10 min) para su purificación.

Por último, el precipitado final se redisuelve en el volumen inicial de purificación con agua ultrapura Milli-Q, obteniéndose la disolución B, cuya concentración debería ser igual que la de la disolución A si no hay pérdida significativa de analito durante las sucesivas etapas de purificación.

Todas las etapas empleadas en la síntesis y purificación de las AuNPs sintetizadas con citrato se ilustran de manera esquemática en la Figura VII.

III.2.2. Caracterización de las AuNPs sintetizadas con citrato

Las AuNPs sintetizadas con citrato se someten a dos estudios básicos de caracterización para conocer su tamaño y forma y sus propiedades espectrofotométricas previamente y posteriormente a la purificación.

III.2.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se toman fotografías de una rejilla de Cobre recubierta con membrana de carbón sobre la que se deposita previamente un pequeño volumen de disolución A para establecer la forma, estimar el grado de homogeneidad y llevar a cabo la medición precisa del tamaño del núcleo de la nanopartícula, parámetros que se pueden conocer gracias al gran poder de resolución de esta técnica.

III.2.2.2. Espectrofotometría UV-Visible

A efectos comparativos, se realiza una dilución 1:2 de disolución A o B, según corresponda, y se registran frente a un blanco de agua ultrapura Milli-Q entre 250 y 800 nm para obtener los espectros de absorción UV-Visible que revelan si el proceso de purificación influye o no significativamente sobre las AuNPs sintetizadas.

III.2.3. Obtención y purificación de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

Se preparan 1.35 mL de MeO-PEG-SH $1.52 \cdot 10^{-2}$ M y 5 mL de Ácido α -lipoico 7.53 $\cdot 10^{-3}$ M en agua ultrapura Milli-Q y ambas disoluciones se llevan hasta pH 9 con NaOH 0.5 M para asegurar la completa desprotonación del grupo carboxilo terminal del Ácido α -lipoico (pK_a= 4.85) en el caso de dicha disolución y para trabajar en las mismas condiciones de pH en el caso de la disolución de MeO-PEG-SH. Tras esto, se preparan cinco mezclas de 0.5 mL con distintos porcentajes en volumen de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH (Tabla II). Posteriormente, cada una de las mezclas se pone en

contacto con 2 mL de disolución A en viales de vidrio, sometiéndose todos ellos a agitación a temperatura ambiente durante 24 horas para que se favorezca el proceso de intercambio de ligandos.

Mezcla	Ácido α-lipoico/ MeO-PEG-SH (% v/v)
1	100/0
2	75/25
3	50/50
4	25/75
5	0/100

Tabla II. Porcentajes en volumen de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH para las distintas mezclas.

Una vez se ha producido el proceso de intercambio de ligandos, las cinco disoluciones de los viales de vidrio se centrifugan 15 minutos a 3500 rpm en tubos de centrífuga con Amicon de 50 kDa. La purificación del precipitado para eliminar el exceso de reactivos en todos los casos se lleva a cabo con sucesivos lavados y procesos de centrifugación a 3500 rpm en agua ultrapura Milli-Q (2 x 15 min). Por último, el precipitado final se lleva a 2.5 mL con agua ultrapura Milli-Q en cada una de las cinco situaciones, obteniéndose lo que a partir de ahora se denominará disoluciones C.

III.2.4. Caracterización de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

III.2.4.1. Espectrofotometría UV-Visible

Para el estudio de la estabilidad de las AuNPs con DHLA y/ó MeO-PEG-SH en diferentes entornos químicos, esto es, a distintos valores de pH y concentración de sales, se emplea la Espectrofotometría UV-Visible.

III.2.4.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer

Cuando el objetivo es conocer la influencia de sales, se preparan tres muestras para cada una de las disoluciones C, conteniendo cada una de ellas 250 μ L de la disolución C correspondiente y 1000 μ L de agua, PBS 10 mM a pH 7.4 o PBS 100 mM a pH 6.7.

III.2.4.1.2. Estabilidad a la variación del pH

El ensayo que aporta información acerca del comportamiento de las AuNPs a distintos valores de pH se lleva a cabo preparando muestras que están constituidas por

30 μ L de disolución C y 120 μ L de disolución de PBS a pH 5.7, 8.8, 7.4, 10.7 ó 11.9, según corresponda.

Los espectros de absorción UV-Visible se obtuvieron registrando todas las muestras mencionadas anteriormente frente a un blanco de agua ultrapura Milli-Q entre 200 y 800 nm.

III.2.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Al igual que en el caso de las AuNPs cuya superficie estaba modificada con citrato, se realizan fotografías de rejillas de Cobre recubiertas con membrana de carbón sobre las que se deposita un pequeño volumen de la disolución C correspondiente.

III.2.4.3. Dinamic Light Scattering

Las medidas de DLS se efectuaron a cinco muestras resultantes de tomar 10 microlitros de las disoluciones C que posteriormente fueron diluidos a 2 mL con agua ultrapura Milli-Q.

Se crearon archivos de medida específicos para tamaño de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se configuró que cada medida se repitiese tres veces consecutivas con la finalidad de calcular parámetros estadísticos básicos (media y desviaciones estándar) tal y como aconseja el fabricante.

III.2.4.4. Electroforesis en gel

Previamente a la electroforesis en gel, se prepara TBE 0.5x a partir de TBE 2.5x a pH 8.3. Tras esto, se calientan 100 mL de TBE 0.5x a pH 8.4 en un Erlernmeyer que posee en su interior un agitador magnético. Cuando este tampón acuoso comienza a hervir, se le añade 1 g de agarosa seca en polvo bajo agitación. La mezcla resultante se deja hervir hasta que la agarosa se haya fundido completamente y se obtenga una disolución transparente. A continuación, ésta última se vierte en un molde para gel (que posee un "peine" de electroforesis para obtener los sitios de carga de las muestras) y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido de 10 cm de longitud.

Una vez se obtiene el gel, se introduce en una cubeta, se cubre completamente con TBE 0.5x (tampón de electroforesis) y se quita el "peine" con el objetivo de cargar las muestras en el gel. Se preparan cinco muestras que están constituidas por 150 μ L de la disolución C correspondiente y 25 μ L tampón de carga (obtenido con 32 mL TBE 0.5x, 16 mL glicerol y 160 mg azul de bromofenol), cargándose 20 μ L de cada una de ellas en el gel de agarosa. Tras esto, la cubeta se pone en contacto con dos electrodos, un ánodo (que constituye el polo positivo) y un cátodo (que actúa como polo negativo), los cuales se conectan a una fuente de alimentación eléctrica para llevar a cabo la electroforesis. En la Figura VIII se ilustra una representación esquemática del modo de trabajo empleado en dicha electroforesis, en la cual se fija en primer lugar un voltaje de 100 V, alcanzándose una intensidad de 25 mA y una potencia de 2.5 W y trabajando a un campo eléctrico (E) de 10 V/cm durante 20 minutos mientras que posteriormente se aumenta el voltaje a 200 V, trabajándose a 70 mA, 13 W y E=20 V/cm durante 32 minutos.



Figura VIII. Ilustración esquemática del modo de trabajo empleado en una electroforesis horizontal.

III.2.5. Caracterización de las AuNPs sin modificar comerciales

Las AuNPs comerciales sin modificar y estabilizadas en buffer de citrato también se caracterizan por Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectrofotometría UV-Visible siguiendo el mismo protocolo de trabajo explicado para las AuNPs sintetizadas.

III.2.6. Obtención y purificación de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

Las etapas desarrolladas en esta experiencia son las mismas que las que se explican en el apartado III.2.3., diferenciándose que en este caso se preparan 5 mL de MeO-PEG-SH 8.66 $\cdot 10^{-3}$ M y 5 mL de Ácido α -lipoico 5.14 $\cdot 10^{-3}$ M en agua ultrapura Milli-Q, las mezclas de 0.5 mL con distintos porcentajes en volumen de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH se ponen en contacto con 2 mL de disolución comercial de AuNPs sin modificar y que la centrifugación y purificación de las disoluciones

resultantes del proceso de intercambio de ligandos se lleva a cabo a 5500 rpm, obteniéndose lo que a partir de ahora se denominará disoluciones D.

III.2.7. Caracterización de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

III.2.7.1. Espectrofotometría UV-Visible

Se preparan muestras conteniendo cada una de ellas 150 μ L de la disolución D correspondiente y 600 μ L de agua, PBS 10 mM a pH 7.4, PBS 100 mM a pH 6.7 ó disolución de PBS a pH 4.5, 5.6, 7.4, 8.8, 10.1 ó 11.9, según corresponda.

III.2.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se toman fotografías de rejillas de Cobre recubiertas con membrana de carbón sobre las que se deposita un pequeño volumen de las disoluciones D.

III.2.7.3. Dinamic Light Scattering

Con esta técnica las medidas se realizan a seis muestras, siendo una de ellas resultante de tomar 100 μ L de la disolución comercial de AuNPs sin modificar y las otras cinco de tomar 114 μ L de la respectiva disolución D, diluyéndose todas ellas a 5 mL en agua ultrapura Milli-Q.

III.2.7.4. Electroforesis en gel

El protocolo de trabajo empleado para la electroforesis en gel es el mismo que se describe en el apartado III.2.4.4. pero en este caso se preparan cinco muestras que están constituidas por 60 μ L de la disolución D correspondiente y 10 μ L del mismo tampón de carga. Además, la electroforesis se lleva a cabo a un voltaje fijo de 100 V durante 60 minutos.

III.2.7.5. Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo

Se toman 100 μ L de una disolución patrón de 1000 ppm de S y se llevan a 10 mL con HCl al 1 %, obteniéndose una disolución de 10⁴ ppb de S (disolución E). Tras esto, se preparan patrones en los que se mantiene constante la concentración de Au (todos ellos contienen 50 μ L de una disolución patrón de Au de 1000 ppm) mientras que se va aumentando la concentración de S (0, 25, 50, 75 y 100 μ L de disolución E, respectivamente). Todos los patrones se llevan a 10 mL con HCl al 1 % y se procede a su medida en ICP-MS.

Por otro lado, se preparan cinco muestras conteniendo cada una de ellas 250 μ L de la disolución D correspondiente, volumen que se lleva a 2.5 mL con agua ultrapura Milli-Q. Estas muestras se miden en el ICP-MS tras un proceso de limpieza exhaustivo del equipo posteriormente a la medida de los patrones.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

IV.1. Caracterización de las AuNPs sintetizadas con citrato

Las nanopartículas de oro sintetizadas en el laboratorio de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado III.2.1. fueron caracterizadas empleando la Microscopía Electrónica de Transmisión y la Espectrofotometría UV-Visible.

IV.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión

La caracterización del tamaño y la forma del oro coloidal es de gran importancia para asegurar que las partículas son homogéneas en diámetro y que no hay agregados presentes en la dispersión.

En nuestro caso, una de las múltiples imágenes obtenidas de la disolución de AuNPs sintetizadas y estabilizadas con citrato se muestra en la Figura IX. Se puede observar que la síntesis llevada a cabo en el laboratorio origina AuNPs con una distribución de tamaño bastante homogénea con un diámetro de nanopartícula en torno a 18 nm. Además, las nanopartículas no poseen completamente una forma esférica, lo que podría repercutir en los resultados que se obtendrían tras la caracterización de las AuNPs sintetizadas cuando se someten a un proceso de intercambio de ligandos con Ácido α -lipoico y/ó MeO-PEG-SH. Por último, se puede apreciar que las nanopartículas muestras signos de agregación, fenómeno que se puede producir por la transferencia de la disolución de AuNPs estabilizadas con citrato a la rejilla de cobre, como ocurre en la bibliografía.⁴³



Figura IX. Imagen TEM de AuNPs recubiertas con citrato.

IV.1.2. Espectrofotometría UV-Visible

Gracias a sus propiedades ópticas excepcionales, las nanopartículas de oro también se pueden caracterizar mediante el estudio del pico de absorción (la posición e intensidad de λ_{max}) de la banda del SPR, fenómeno que en el caso de las AuNPs se produce a longitudes de onda correspondientes a la región visible del espectro. El espectro obtenido informa directamente del tamaño, estado de agregación, y en base a la ley de Beer (Ecuación 1), de la concentración de nanopartículas.

$$A = -\log (T) = -\log \left(\frac{I_0}{I}\right) = \mathcal{E}b\mathcal{C} \quad (1)$$

Los espectros de absorción UV-Visible obtenidos en este ensavo se muestran en la Figura X, la cual pone de manifiesto que para ambas disoluciones (A y B, siendo la A la de AuNPs estabilizadas con citrato sin purificar y la B la de AuNPs estabilizadas con citrato purificada) el máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 526 nm. No obstante, se puede apreciar que la absorbancia a dicho valor es inferior tras la etapa de purificación (0.790 frente a 0.930 que se corresponde con la máxima absorbancia de la disolución A) y que el ancho de pico al 75 % de la altura del mismo es de 60 y 76 nm para la disolución A y B, respectivamente. Además, habitualmente se emplea el valor resultante de la relación de los valores de absorbancia a 650 nm y el máximo de absorción de la muestra para detectar la presencia o no de agregados en la misma. De esta manera, cuando dicha relación es inferior o igual a 0.1, es indicativo de que no hay agregados en la muestra mientras que cuando es superior a 0.1, si hay presencia de agregados. Así, en nuestro caso, la razón entre los valores de absorbancia a 650 y 526 nm es 0.1 y 0.4 para la disolución A y B, respectivamente. Esto indica que el proceso de purificación no mejora la calidad de las nanopartículas sintetizadas y provoca agregaciones indeseadas.

Por otro lado, la concentración en AuNPs de las disoluciones A y B se puede calcular si se sustituyen los datos espectrofotométricos obtenidos para cada una de las diluciones en la ley de Beer y se conoce el coeficiente de extinción molar de éstas últimas. Para este último requisito se emplea la Ecuación 2, la cual refleja que se produce un aumento drástico en el coeficiente de extinción molar a medida que aumenta el diámetro "core" de las nanopartículas de oro, siendo ε el coeficiente de extinción en M⁻¹cm⁻¹, *D* el diámetro "core" de las nanopartículas (que en este caso es 18 nm comprobado por TEM), k = 3.32111 y a = 10.80505.⁵⁰ Así, aplicando esta ecuación y teniendo en cuenta el factor de dilución, la concentración determinada es 2.55 · 10⁻⁹ M y 2.16 · 10⁻⁹ M en AuNPs para la disolución A y B, respectivamente.

 $\ln \varepsilon = k \ln D + a \quad (2)$



Como se puede observar, toda la información extraída de los espectros indica que las etapas que intervienen en la purificación empobrecen la calidad de las AuNPs sintetizadas. Por lo tanto, los experimentos posteriores se verán favorecidos si se trabaja directamente con la disolución de AuNPs estabilizadas con citrato sin purificar.

IV.2. Obtención y purificación de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

La modificación con Ácido α-lipoico y/ó MeO-PEG-SH del recubrimiento original de las AuNPs estabilizadas con citrato y sintetizadas en el laboratorio se lleva a cabo teniendo en cuenta que el empleo de ligandos bidentados para la solubilización de AuNPs ofrece numerosas ventajas en términos de estabilidad coloidal y propiedades físicas de las nanopartículas dispersas en medios acuosos. Además, la combinación de estos ligandos con compuestos de base PEG que poseen diferentes grupos funcionales es sencilla, proporciona a las nanopartículas una biocompatibilidad muy elevada y reduce drásticamente las adsorciones inespecíficas.

Teniendo en cuenta lo comentado previamente, el derivado PEG que se emplea en este trabajo de investigación es el Monometoxipolietilenglicol funcionalizado con un grupo tiol (MeO-PEG-SH) porque por un extremo presenta un grupo tiol que se va a unir fuertemente a la superficie del oro mientras que por el otro lado posee un grupo metoxi en lugar del grupo hidroxilo que evita la presencia de interacciones inespecíficas. A menudo se considera que el grupo hidroxilo en el PEG-SH es relativamente inerte. Sin embargo, en algunas situaciones puede reaccionar con ciertos grupos funcionales que comúnmente intervienen en la etapa de bioconjugación (p.ej. isocianato), lo cual no interesa.⁴²

La modificación del recubrimiento original de las AuNPs sintetizadas en el laboratorio ocurre a través del proceso de intercambio de ligandos que se esquematiza en la Figura XI, en el cual la apertura del ciclo del Ácido α -lipoico es instantánea debido a la gran afinidad del azufre por el oro, por lo que a partir de este momento este ligando pasa a ser ácido dihidrolipoico.



Figura XI. Ilustración esquemática del proceso de intercambio de ligandos de citrato a DHLA y/ó MeO-PEG-SH.

Los volúmenes de las disoluciones de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH que se toman para cada mezcla se han seleccionado buscando que en cada una de ellas se

tenga un exceso de ambos ligandos frente al número de moles de átomos superficiales de Au en 2 mL de disolución A $(7.27 \cdot 10^{-8})$, parámetro que se obtiene fácilmente si se conoce el número de átomos superficiales de Au por nanopartícula (SA). Este último valor depende del número de capas (de átomos de oro) que componen la nanopartícula y se puede estimar empleando la Ecuación 3, donde *n* es el número de capas y se determina dividiendo el radio de la nanopartícula entre 0.238 nm.⁴³ Así, en nuestro caso el número de moles que se pone de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH es 50 y 100 veces superior al número de moles de átomos superficiales de Au a los que se uniría cada tipo de recubrimiento teóricamente en cada una de las disoluciones C, cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $2 \cdot 10^{-9}$ M. El exceso para el MeO-PEG-SH es el doble que para el Ácido α -lipoico para compensar el número de átomos de azufre iniciales de cada compuesto.

$$SA = 10 n^2 + 2$$
 (3)

IV.3. Caracterización de AuNPs recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

Los datos experimentales que se muestran en esta sección son resultado de realizar un estudio exhaustivo de caracterización de las AuNPs recubiertas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH, dentro del cual se engloba el análisis de la estabilidad de las nanopartículas en distintos entornos químicos, su tamaño y forma, perfil de distribución de tamaño y carga superficial.

IV.3.1. Espectrofotometría UV-Visible

IV.3.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer

Los espectros de absorción obtenidos para las tres muestras (cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $4 \cdot 10^{-10}$ M) de cada disolución C se ilustran en la Figura XII, de donde se pueden sacar varias conclusiones. En primer lugar, para todas las situaciones estudiadas el máximo de absorción sufre un ligero desplazamiento batocrómico en comparación con la longitud de onda de absorción máxima de las AuNPs recubiertas con citrato (de 526 a 530-532 nm), como ocurre en la bibliografía.⁴³ Por otro lado, las AuNPs recubiertas con las distintas mezclas de

DHLA y MeO-PEG-SH presentan valores de absorbancia ligeramente superiores a aquellos que se obtienen para las AuNPs recubiertas únicamente con DHLA ó MeO-PEG-SH en medio acuoso, lo que indica que éstos dos últimos tipos de nanopartículas presentan una estabilidad sutilmente menor en el medio de partida. Asimismo, en las AuNPs que teóricamente poseen un 100 % o 75 % de moléculas de DHLA en su recubrimiento son las que más se ven afectadas por la fuerza iónica del medio que las contiene, agregándose principalmente a elevada concentración de sales. A su vez, a medida que aumenta el % en volumen de MeO-PEG-SH, las AuNPs muestran menos diferencias significativas en cuestión de estabilidad al variar la concentración de electrolitos, siendo las que están recubiertas por 100 % de moléculas de MeO-PEG-SH las que presentan un comportamiento ideal, como se describe en la bibliografía.²⁵



Figura XII. Espectros de absorción UV-Visible cuando la relación Ácido α-lipoico/MeO-PEG-SH (% v/v) es (----) 100/0, (-----) 75/25, (-----) 50/50, (-----) 25/75 y (------) 0/100 en A) agua, B) PBS 10 mM a pH 7.4 y C) PBS 100 mM a pH 6.7.

Este hecho se puede explicar considerando que la estabilidad de las nanopartículas en disolución depende principalmente de características superficiales tales como la carga superficial y la estructura de los ligandos. Como ya se ha comentado en la introducción, un aumento de la repulsión electrostática entre las nanopartículas y un mayor impedimento estérico de su superficie puede mejorar significativamente la estabilidad de las mismas en disolución. En este caso, la carga superficial de las nanopartículas disminuye considerablemente cuando se aumenta la concentración de electrolitos en las relaciones en las que se posee mayor % en volumen de Ácido α -lipoico, lo que provoca una agregación de las nanopartículas debido a una reducción de repulsiones electrostáticas entre ellas. Sin embargo, cuando se trabaja con mayores % en volumen de MeO-PEG-SH, las AuNPs se recubren de muchas cadenas de este polímero, dando lugar a una estabilidad en disolución acuosa que se debe principalmente al aumento del impedimento estérico superficial de las nanopartículas.

IV.3.1.2. Estabilidad a la variación del pH

En cuanto al estudio de la influencia del pH (Figura XIII) se puede apreciar que, al igual que lo que ocurría en medio acuoso, las AuNPs que presentan una estabilidad ligeramente superior en el intervalo de pH estudiado, que en este caso va desde 5.7 a 11.9, son las que se obtuvieron cuando se empleó un 25, 50 y 75 % en volumen de MeO-PEG-SH al efectuar el proceso de intercambio de ligandos. Por el contrario, aquellas que están recubiertas únicamente con moléculas de DHLA ó MeO-PEG-SH son las que poseen valores de absorbancia menores, los cuales aumentan a medida que lo hace el pH del medio de trabajo.



Figura XIII. Evolución de las señales de absorbancia cuando la relación Ácido α -lipoico/MeO-PEG-SH (% v/v) es (----) 100/0, (-----) 75/25, (-----) 50/50, (------) 25/75 y (----------) 0/100 con el aumento del pH (λ = 530 nm).

IV.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Si se compararan las fotografías realizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión para las AuNPs con recubrimientos de DHLA y/ó MeO-PEG-SH con aquellas realizadas para las de recubrimiento de citrato (Ver Figura IX), se puede observar que, tras la modificación superficial, los núcleos de Au no sufren aparentes modificaciones en tamaño y forma. Sin embargo, lo que sí se puede apreciar es que las AuNPs recubiertas únicamente con DHLA (Figura XIV A)) parece que sufren una mayor tendencia a la agregación como ocurría en el caso de las AuNPs recubiertas con citrato mientras que se obtiene una distribución bien dispersa de las nanopartículas en el caso de las AuNPs recubiertas solo con MeO-PEG-SH (Figura XIV B)).



Figura XIV. Imagen TEM de AuNPs recubiertas con A) DHLA y B) MeO-PEG-SH.

IV.3.3. Dinamic Light Scattering

Las medidas en DLS se llevan a cabo con el objetivo de adquirir una distribución del tamaño de partícula para cada disolución obtenida tras el proceso de intercambio de ligandos al emplear distintos porcentajes en volumen de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH, hecho que desde el punto estadístico no se puede llevar a cabo con adecuada precisión empleando la Microscopía Electrónica de Trasmisión debido a que en ésta última solo se miden decenas o cientos de partículas. Además, a diferencia de lo que ocurre en TEM, en esta técnica no se estudian nanopartículas bajo condiciones de vacío o sequedad, sino que las medidas que se obtienen son de diámetro hidrodinámico, las cuales tienen en cuenta el tamaño del núcleo más el del recubrimiento en disolución y el del entorno de hidratación.

Estas medidas se fundamentan en la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada con el tiempo de las AuNPs en suspensión, las cuales están en continuo

movimiento debido al bombardeo de las moléculas de disolvente que las rodean (movimiento Browniano). Así, las partículas que dispersan más intensidad de luz poseen menor coeficiente de difusión y en consecuencia mayor radio hidrodinámico mientras que aquellas que dispersan menos intensidad tienen mayor coeficiente de difusión pero son más pequeñas. La relación inversamente proporcional entre el diámetro hidrodinámico y el coeficiente de difusión viene dada por la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 4), donde d (H) es el diámetro hidrodinámico, D el coeficiente de difusión translacional, k la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (4)$$

Los datos obtenidos al medir las cinco muestras de AuNPs modificadas con Ácido α -lipoico y/ó MeO-PEG-SH, cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de 10^{-11} M, son muy similares entre sí, por lo que la discusión se va a centrar en aquellos resultados obtenidos para la muestra de la disolución C que posee AuNPs recubiertas únicamente con DHLA, siendo extrapolable dicha discusión para el resto de las muestras.

En la Figura XV *A*) se representa el porcentaje relativo de la luz dispersada de las AuNPs frente al tamaño, obteniéndose la distribución de tamaño de partícula en intensidad (para la muestra de la disolución C que contiene AuNPs con DHLA), la cual es bimodal con dos picos principales a 28 y 647 nm, lo que indica que hay agregados presentes en la muestra. No obstante, la conversión de dicha representación a una distribución de tamaño en volumen mediante la teoría de Mie (Figura XV *B*)) muestra que estos agregados están presentes en baja concentración (aproximadamente el 90 % de la muestra consiste en partículas de 28 nm). Aunque estos agregados son muy pocos, son capaces de dispersar una cantidad significante de luz que contribuye al pico más intenso de la Figura XV *A*).

La Figura XV A) se puede convertir a su vez en una distribución de tamaño en número, la cual es monomodal con un pico principal a 24.5 nm (Figura XV C)). Este resultado sugiere que si la muestra se caracteriza utilizando una técnica basada en

número (TEM por ejemplo), la mayoría de las partículas visibles serían las pequeñas, como ocurre en la Figura XIV *A*), mientras que la presencia de partículas grandes únicamente se vería si se contase un número suficiente de ellas. A diferencia de lo que ocurre en TEM, la técnica de DLS posee una resolución muy baja, por lo que no es capaz de resolver materiales que posean mucha diferencia entre sus tamaños. Esto se traduce en que si se mide una muestra que posea una mezcla de partículas individuales y agregados de 2, 3 ó 4 partículas, el resultado final obtenido para el diámetro hidrodinámico se vería influenciado por las partículas más grandes ya que dispersan la mayoría de la luz. Existen dos parámetros, diámetro "Z-average" (diámetro hidrodinámico principal) e índice de polidispersidad, PDI (estimación del ancho de la distribución) que son sensibles a la presencia de agregados.



Figura XV. Distribución de tamaño en A) intensidad, B) volumen y C) número obtenida para la muestra de AuNPs con DHLA.

En nuestro caso, en las tres medidas de cada una de las cinco muestras se obtienen valores elevados para "Z-average" e PDI que indican la presencia, en muy baja concentración, de agregados en las muestras. Estos agregados no se deben a la aglomeración de las AuNPs porque todas las disoluciones C poseen color rojo y no azul (o color intermedio entre rojo y azul) que es el indicativo directo de agregación, por lo que la presencia de agregados se asocia a un exceso de reactivos que no se eliminó correctamente durante el proceso de purificación para obtener las disoluciones C o a posibles impurezas que provienen del medio en el que se preparan las muestras. Debido a esto, no se puede dar un valor de diámetro hidrodinámico representativo de las AuNPs que se poseen en disolución (ya que es el que se corresponde con el Z-average), pero lo que sí se puede extraer es información acerca del diámetro hidrodinámico en número que más se repite (la moda) para cada tipo de AuNPs. Estos valores, como cabría esperar, son superiores a los obtenidos por TEM y se encuentran comprendidos entre 20 y 25 nm (Figura XVI).



Figura XVI. Diámetro hidrodinámico en número que más se repite para cada tipo de AuNPs.

IV.3.4. Electroforesis en gel

El empleo de la electroforesis (técnica de separación que se basa en la diferente movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico) en este trabajo de investigación se realiza con el objetivo de verificar si las AuNPs recubiertas con DHLA migran más hacia el ánodo como consecuencia de que poseen mayor carga superficial que aquellas cuyo recubrimiento es únicamente de MeO-PEG-SH, comparación que se puede hacer porque existen ligeras diferencias significativas entre los diámetros hidrodinámicos en número que más se repiten para cada tipo de AuNPs.

De esta manera, el resultado obtenido tras analizar las suspensiones de AuNPs (cuyas concentraciones son del orden de $1.7 \cdot 10^{-10}$ M) mediante la electroforesis en un medio anticonvectivo como es el gel de agarosa se muestra en la Figura XVII *A*). Se puede apreciar que existe un bajo contraste que dificulta observar las bandas en la

imagen, lo que se debe a que las bandas en el gel tienden a difundirse y espaciarse a medida que avanzan las partículas, hecho incontrolable que se debe al tamaño de los poros del gel. Por este motivo, se destacan en la imagen (Figura XVII B)) las zonas en donde aparecen las bandas al igual que se indica el orden de carga de las muestras en el gel (Tabla III), observándose a modo cualitativo que las AuNPs recubiertas con DHLA son las que con diferencia recorren más distancia hacia el ánodo mientras que aquellas que se encuentran rodeadas únicamente por MeO-PEG-SH son las que lo hacen en menor medida. Como se encuentra descrito en la bibliografía, cuanto mayor es la cantidad de compuesto de base PEG empleada, mayor es el recubrimiento de las nanopartículas, hecho que contribuye a la obtención del mayor diámetro hidrodinámico (ver Figura XVI) y que junto a la ausencia de carga del MeO-PEG-SH, hacen que las bandas electroforéticas queden más alejadas del ánodo.³⁴ Asimismo, se puede apreciar que no hay resolución suficiente para distinguir entre las distancias recorridas por las AuNPs que teóricamente poseen en su recubrimiento tanto DHLA como MeO-PEG-SH, pero lo que sí se puede afirmar es que lo hacen en magnitudes similares.



Figura XVII. Imagen ilustrativa del gel de electroforesis A) real y B) con las bandas destacadas.

Como se ha podido comprobar, algunas de las técnicas analíticas empleadas anteriormente en la caracterización de las AuNPs sintetizadas y modificadas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH no proporcionan los resultados más óptimos para las nanopartículas al trabajar con distintos porcentajes en volumen de ambos recubrimientos. Ante esta situación, se podrían nombrar varios factores que hayan podido influenciar en la obtención de estos resultados anómalos, siendo quizá la diversidad de formas de las partículas observada en la Figura IX la más influyente de todas.

La ausencia de reproducibilidad tanto en el tamaño como la forma de las nanopartículas son fenómenos que bibliográficamente se asocian a procesos de síntesis que se llevan a cabo en las condiciones no más favorables. Para el conocimiento de estas condiciones más favorables u óptimas es necesario realizar en primer lugar un proceso de optimización en la síntesis de AuNPs que requiere tiempo y disponibilidad de equipos instrumentales para llevar a cabo la caracterización de las nanopartículas obtenidas en cada situación. Cuando no se posee alguno de estos dos requisitos, una alternativa muy empleada por muchos científicos es hacer uso de nanopartículas reproducibles tanto en tamaño y forma que se encuentran disponibles comercialmente. Esta estrategia es la que se ha empleado en la segunda parte de este trabajo de investigación, de manera que se lleva a cabo un estudio de caracterización básico de la disolución comercial y coloidal de AuNPs estabilizadas con citrato empleando la Microscopía Electrónica de Transmisión y la Espectrofotometría UV-Visible y un estudio de caracterización exhaustivo de las AuNPs recubiertas con citrato cuando se modifican con Ácido α-lipoico y/ó MeO-PEG-SH a través del empleo de la Microscopía Electrónica de Transmisión, Espectrofotometría UV-Visible, Dinamic Light Scattering, Electroforesis en gel y Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo.

IV.4. Caracterización de las AuNPs comerciales

Las especificaciones del proveedor de la disolución de oro coloidal comercial estabilizada en buffer de citrato indican que ésta última posee partículas con diámetro de 20 nm, existiendo un índice de dispersión del 10 %, lo que quiere decir que puede haber presencia de partículas con diámetros comprendidos entre 18 y 22 nm.

IV.4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión y Espectrofotometría UV-Visible

Para verificar las especificaciones indicadas por el fabricante, en primer lugar se analiza la disolución de AuNPs comercial por TEM, obteniéndose varias imágenes

como las que se muestran en la Figura XVIII, donde se destaca una mejora en la forma (todas las nanopartículas poseen forma esférica) y monodispersidad frente a las AuNPs sintetizadas y estabilizadas con citrato. Además, la mayoría de las AuNPs poseen un diámetro de partícula en torno a los 20 nm, aunque hay algunas de ellas que lo tienen por debajo de dicho valor (entre 17 y 20 nm).



Figura XVIII. Imágenes TEM de AuNPs comerciales recubiertas con citrato.

Por otro lado, aunque en este caso se conozca la concentración en AuNPs de la disolución coloidal de oro comercial $(1.09 \cdot 10^{-9} \text{ M})$, es igualmente interesante analizar esta muestra mediante medidas en Espectrofotometría UV-Visible para saber la posición e intensidad de la λ_{max} del pico de absorción de la banda del SPR. Así, el espectro de absorción UV-Visible (de la dilución 1:2 de la disolución comercial de AuNPs estabilizadas con citrato) adquirido se muestra en la Figura XIX, donde se manifiesta que el máximo de absorción se encuentra a una longitud de onda de 523 nm, la absorbancia a dicho valor es 0.510, el ancho de pico al 75 % de la altura del mismo es de 49 nm y la relación de los valores de absorbancia a 650 y 523 nm es 0.06, lo que indica que no hay presencia de agregados.



Figura XIX. Espectro de absorción UV-Visible para la disolución comercial de AuNPs estabilizadas con citrato.

IV.5. Obtención y purificación de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

De forma similar a lo realizado con las AuNPs sintetizadas y estabilizadas con citrato, se lleva a cabo la modificación superficial de las AuNPs comerciales que poseen moléculas de citrato en su recubrimiento. A diferencia de lo que ocurría en el apartado IV.2., en este caso el número de moles de átomos superficiales de Au en 2 mL de disolución coloidal de oro comercial es $3.83 \cdot 10^{-8}$ (valor calculado empleando la ecuación 3) pero el número de moles que se añade de Ácido α -lipoico y MeO-PEG-SH sigue siendo 50 y 100 veces superior al número de moles de átomos superficiales de Au a los que se uniría cada tipo de recubrimiento teóricamente en cada una de las disoluciones de nanopartículas de oro resultantes de la modificación superficial, cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $8.72 \cdot 10^{-10}$ M.

IV.6. Caracterización de AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/o MeO-PEG-SH

IV.6.1. Espectrofotometría UV-Visible

IV.6.1.1. Estabilidad a la fuerza iónica del buffer y a la variación del pH

La variación de las señales de absorbancia en función del % en volumen de MeO-PEG-SH para las tres muestras (cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $1.744 \cdot 10^{-10}$ M) de cada disolución resultante de la modificación superficial se muestra en la Figura XX *A*), donde puede apreciar que para todas las situaciones se mantiene el máximo de absorción en 523 nm. Además, al igual que en el caso de las AuNPs sintetizadas y modificadas con MeO-PEG-SH, las AuNPs comerciales recubiertas por 100 % de moléculas de MeO-PEG-SH son las que no muestran diferencias significativas en los valores de absorbancia al cambiar la fuerza iónica del medio que las contiene. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en la Figura XII, las AuNPs que teóricamente poseen un 75, 50 o 25 % de moléculas de DHLA en su recubrimiento apenas se ven afectadas al variar la concentración de electrolitos, lo que no ocurre con las AuNPs rodeadas completamente por DHLA, que se siguen agregando en menor grado de significación a elevada concentración de sales.

Por otro lado, en la Figura XX B) se observa que todos los tipos de AuNPs resultantes de la modificación superficial, a excepción de las que están recubiertas únicamente por moléculas de DHLA, mantienen sus valores de absorbancia prácticamente constantes en el intervalo de pH estudiado, que en este caso va desde 4.5 a 11.9.



Figura XX. A) Variación de las señales de absorbancia en función del % en volumen de MeO-PEG-SH en (\diamond) agua, (\blacksquare) PBS 10 mM a pH 7.4 y (\blacktriangle) PBS 100 mM a pH 6.7 y B) evolución de las señales de absorbancia cuando la relación Ácido a-lipoico/MeO-PEG-SH (% v/v) es (\longrightarrow) 100/0, (\longrightarrow) 75/25, (\longrightarrow) 50/50, (\longrightarrow) 25/75 y (\longrightarrow) 0/100 (λ = 523 nm).

De estas afirmaciones se concluye que, de carácter general, las disoluciones obtenidas tras la modificación superficial de las AuNPs comerciales y estabilizadas en citrato presentan menor sensibilidad a la variación de la fuerza iónica y del pH del medio que las respectivas disoluciones obtenidas en el caso de las AuNPs sintetizadas.

IV.6.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes adquiridas para las AuNPs comerciales modificadas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH muestran que, al igual que las AuNPs sintetizadas y modificadas con ambos ligandos, no se observan cambios en tamaño y forma de los núcleos de Au tras el proceso de intercambio de ligandos.



Figura XXI. Imágenes TEM de AuNPs comerciales recubiertas con MeO-PEG-SH.

47

Dos imágenes representativas de las AuNPs comerciales recubiertas únicamente con MeO-PEG-SH se ilustran en la Figura XXI.

IV.6.3. Dinamic Light Scattering

Las distribuciones de tamaño de partícula en intensidad y volumen de la muestra de disolución comercial de AuNPs estabilizadas con citrato y de las muestras (cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $2 \cdot 10^{-11}$ M) de las disoluciones resultantes de la modificación de las AuNPs comerciales estabilizadas con citrato revelan también existen agregados que están presentes en baja concentración. El hecho de que la disolución comercial de AuNPs recubiertas con citrato también posea el mismo tamaño de partículas grandes que las muestras de las disoluciones de AuNPs modificadas descarta la posibilidad de que los agregados se deban a una etapa de purificación incorrecta o a una eliminación incompleta del exceso de reactivos tras el proceso de intercambio de ligandos, sino que más bien se asocian a posibles impurezas que provienen del medio en el que se preparan las muestras. Tras la hipótesis descartada y teniendo en cuenta la elevada sensibilidad que muestra el DLS por los agregados, se llega a la conclusión que lo ideal hubiese sido filtrar el agua ultrapura Milli-Q previamente a la preparación de las muestras.



Figura XXII. Diámetro hidrodinámico en número que más se repite las AuNPs comerciales modificadas con Ácido α-lipoico y/ó MeO-PEG-SH.

Como ya se comentó previamente, al trabajar en presencia de agregados no se puede dar un valor de diámetro hidrodinámico representativo de las AuNPs que se poseen en disolución. Por ello, la información que se aporta en la Figura XXII es acerca del diámetro hidrodinámico en número que más se repite para las AuNPs comerciales recubiertas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH. Se debe mencionar que el diámetro en número que más se repite para las AuNPs comerciales estabilizadas en buffer de citrato es de 21.265 ± 0.361 , valor que es superior al obtenido por TEM y que concuerda con las especificaciones del fabricante, lo que indica que las medidas por DLS ilustradas en la Figura XXII son fiables.

IV.6.4. Electroforesis en gel

El electroferograma de las muestras (cuyas concentraciones en AuNPs son del orden de $7.5 \cdot 10^{-10}$ M) obtenido se ilustra en la Figura XXIII *A*). El limitado contraste también está presente en esta ocasión, por lo que se destacan en la imagen las zonas en donde aparecen las bandas (Figura XXIII *B*)). Si se analiza el orden de carga de las muestras en el gel (Tabla IV), cualitativamente se observa que la distancia recorrida por las nanopartículas hacia el ánodo es menor a medida que teóricamente aumenta el número de moles de ligandos neutros (MeO-PEG-SH) empleados en la obtención de las disoluciones de las AuNPs comerciales modificadas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH.

A pesar de que el diámetro hidrodinámico en número que más se repite para las AuNPs comerciales recubiertas con DHLA (Figura XXII) es significativamente superior al del resto de AuNPs comerciales modificadas con distintos recubrimientos, los resultados obtenidos en esta ocasión mediante la electroforesis en gel demuestran que las AuNPs recubiertas con DHLA son las que poseen mayor carga superficial, lo cual es lógico ya que todos los ligandos que se encuentran en la superficie están desprotonados.



Figura XXIII. Imagen ilustrativa del electroferograma A) real y B) con las bandas destacadas.

IV.6.5. Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo

Esta técnica instrumental se emplea con el objetivo de conocer la relación molar S/Au para cada tipo de AuNPs y, en consecuencia, el rendimiento de funcionalización de las AuNPs comerciales estabilizadas con citrato cuando se someten a un intercambio de ligandos con Ácido α -lipoico y/ó MeO-PEG-SH.

La preparación de los patrones para obtener la curva de calibrado (cuya ecuación es $y=0.0103x - 2 \cdot 10^{-5}$, donde "y" es el Área S/Área Au y "x" son los moles S/moles Au y su coeficiente de regresión es R² = 0.9982) se ha basado en la relación molar S/Au teórica de las AuNPs comerciales tras la modificación superficial (0.071), valor que se obtiene cuando se determinan dos parámetros. El primero de ellos es el número de átomos de Au totales por AuNP (247168), valor que se puede calcular mediante la ecuación 5, donde *p* es la densidad del oro (19.3 g Au/cm³), *D* es el diámetro de nanopartícula en nm y *M* es la masa del oro (197 g/mol)^{23,50}. El otro parámetro sería número de átomos de S por AuNP, el cual se conoce suponiendo que a cada átomo superficial de Au se une un átomo de S durante el proceso de intercambio de ligandos, o sea, que el rendimiento de funcionalización de la nanopartícula es del 100 %. De esta manera, el número de átomos de S por AuNP serían los mismos que los átomos de Au superficiales por AuNP (17656), valor que se determina mediante la ecuación 3 teniendo en cuenta las instrucciones mencionadas en el apartado IV.2.

Por otro lado, las muestras se preparan de manera que los moles de Au sean los mismos que los que se emplean en la obtención de los patrones.

$$N = \frac{\pi}{6} \cdot \frac{pD^3}{M} = 30.89602D^3 \quad (5)$$

Cuando se efectúa la predicción indirecta de las AuNPs comerciales modificadas con los distintos recubrimientos empleando la curva de calibrado, se obtienen los resultados que se muestran en la Figura XXIV. Dicha figura revela que para todos los tipos de AuNPs modificadas se consigue un rendimiento de funcionalización del 100 % ya que todas las relaciones molares obtenidas experimentalmente son superiores a la teórica. Además, al mantener constante los moles de Au, se puede observar que aumentan los moles de S por AuNP cuando aumenta el % en volumen de MeO-PEG-SH empleado en la modificación superficial. Esto se puede deber a que, durante el proceso de intercambio de ligandos, las cadenas de este polímero que se encuentra en exceso se unan mediante interacciones hidrofóbicas a las cadenas de polímero que están asociadas a la superficie de la nanopartícula, obteniéndose lo que se conoce como nanopartículas con multicapas.



Figura XXIV. Representación gráfica de la relación molar S/Au en función del % en volumen de MeO-PEG-SH empleado en la modificación de las AuNPs comerciales estabilizadas con citrato.

V. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

En base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental recogido en esta Memoria científica de Trabajo de Fin de Máster, se pueden postular las siguientes conclusiones:

- Se ha llevado a cabo una síntesis de nanopartículas de oro modificadas con citrato solubles en medios acuosos. Dichas AuNPs sintetizadas han sido caracterizadas empleando técnicas convencionales, encontrando que poseen una distribución de tamaños bastante homogénea (en torno a 18 nm), no poseen completamente una forma esférica, tienen el máximo de absorción a una longitud de onda de 526 nm y tienden a agregarse fácilmente.
- En una etapa posterior, las AuNPs sintetizadas se sometieron a un proceso de intercambio de ligandos, ensayando el empleo de Ácido α-lipoico, MeO-PEG-SH y mezclas de ambos. Se ha observado que los ligandos superficiales juegan un papel importante en la estabilidad coloidal y en las propiedades espectroscópicas de las AuNPs. Así, los núcleos de las AuNPs sintetizadas no sufren aparentes modificaciones en tamaño y forma tras el proceso de intercambio de ligandos. Sin embargo, se ha observado un pequeño desplazamiento batocrómico entre 4 y 6 nm en las longitudes de onda de máxima absorción tras el intercambio de ligandos. Además, se ha observado que aquellas nanopartículas modificadas únicamente con Ácido α-lipoico o con una mezcla 75:25 (% en volumen) de Ácido α-lipoico:MeO-PEG-SH son las menos estables, sufriendo problemas de agregación al aumentar la fuerza iónica del medio. Por el contrario, las AuNPs recubiertas por un 100 % de moléculas de MeO-PEG-SH son las que presentan mejor estabilidad y propiedades ópticas.
- Tras la realización de una caracterización más exhaustiva de las nanopartículas sintetizadas y modificadas en el laboratorio, se ha observado que los valores de diámetro hidrodinámico en número que más se repite para cada tipo de AuNPs sintetizadas obtenidas tras el proceso de intercambio de ligandos son superiores a los obtenidos por TEM y se encuentran comprendidos entre 20 y 25 nm, siendo el mayor de ellos el correspondiente a las AuNPs recubiertas completamente por MeO-PEG-SH. Las AuNPs sintetizadas recubiertas completamente con DHLA y

MeO-PEG-SH son las que presentan mayor y menor movilidad electroforética, respectivamente.

- Por otro lado se ha realizado un estudio paralelo empleando nanopartículas de oro comerciales. A diferencia de las AuNPs sintetizadas, las AuNPs comerciales poseen forma esférica, tamaño de 20 nm (aunque hay algunas menores), un máximo de absorción 523 nm y tienen menos tendencia a la agregación. Además, las AuNPs comerciales que se someten a un proceso de intercambio de ligandos con Ácido α-lipoico y MeO-PEG-SH presentan menor sensibilidad a la variación de la fuerza iónica y del pH del medio que las AuNPs sintetizadas sometidas a las mismas condiciones experimentales.
- Al igual que las AuNPs sintetizadas, los núcleos de las AuNPs comerciales no manifiestan modificaciones en tamaño y forma tras el proceso de intercambio de ligandos.
- Los agregados detectados por DLS en las muestras tanto de las AuNPs comerciales como sintetizadas se asocian a posibles impurezas que provienen del medio en el que se preparan las muestras.
- El diámetro en número que más se repite para las AuNPs comerciales estabilizadas en buffer de citrato determinado por DLS concuerda con las especificaciones del fabricante mientras que los adquiridos para cada tipo de AuNPs comerciales obtenidas tras el proceso de intercambio de ligandos se encuentran comprendidos entre 20 y 25 nm, a excepción de las AuNPs recubiertas completamente con DHLA.
- Al igual que las AuNPs sintetizadas, las AuNPs comerciales recubiertas completamente con DHLA y MeO-PEG-SH son las que presentan mayor y menor movilidad electroforética, respectivamente.
- Se consigue un rendimiento de funcionalización del 100 % de las AuNPs comerciales cuando se modifican con las distintas relaciones (% en volumen) de Ácido α-lipoico:MeO-PEG-SH. Además, la relación molar S/Au aumenta a medida que lo hace el % en volumen de MeO-PEG-SH empleado en la modificación superficial, lo que puede indicar la formación de nanopartículas con multicapas durante el proceso de intercambio de ligandos.

En cuanto a las competencias de aprendizaje personales, se debe concluir que se ha conseguido interpretar la información obtenida por los distintos ensayos llevados a cabo en el laboratorio, al igual que se ha desarrollado la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados obtenidos. Por otra parte, se ha aprendido el funcionamiento, uso y aplicabilidad de nuevas técnicas de caracterización como es el caso de Dinamic Light Scattering. Por último, se han adquirido las capacidades para trabajar experimentalmente en un laboratorio de investigación, así como aquellas que involucran una correcta redacción de cualquier trabajo científico.

Como trabajos futuros en esta línea de investigación se podrían destacar los siguientes aspectos relacionados con el estudio de distintas vías de solubilización de nanopartículas en medios acuosos y su posible futura aplicación bioanalítica:

- Optimización del proceso de síntesis de AuNPs previamente al proceso de intercambio de ligandos en el caso de no emplear nanopartículas de oro comerciales.
- Estudio de la estabilidad coloidal con el tiempo de las AuNPs modificadas con las distintas relaciones (% en volumen) Ácido α-lipoico:MeO-PEG-SH.
- Estudio de la carga superficial de las AuNPs estabilizadas con citrato y modificadas con DHLA y/ó MeO-PEG-SH mediante técnicas de caracterización cuantitativas como es el z-potencial.
- Valoración de las AuNPs modificadas con las distintas relaciones Ácido α-lipoico:MeO-PEG-SH (% en volumen) como posibles marcadores ópticos de anticuerpos de reconocimiento específico. En este caso, sería necesaria una etapa de bloqueo del inmunoensayo para obtener una señal óptima y evitar la presencia de adsorciones inespecíficas, habría que estudiar el comportamiento del inmunoensayo en muestras reales, optimizando por un lado las condiciones para que ocurra el proceso de interacción entre el anticuerpo específico y el analito de interés y por otro lado, el método de detección con el objetivo de amplificar al máximo la señal analítica.

VI. BIBLIOGRAFÍA

¹ Sennuga, A.T. Biological synthesis of metallic nanoparticles and their interactions with various biomedical targets. Ph.D. Thesis, Rhodes University, December 2011.

² Panyala, N.R.; Peña-Méndez, E. M.; Havel, J. Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives. *J Appl Biomed.* **2009**, *7*, 75-91.

³ Pradeep, T.; Anshup. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films*. **2009**, *517*, 6441-6478.

⁴ Britannica Academic Edition [en línea]. [Fecha de consulta: 5 de junio de 2015]. http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1109065/nanoparticle.

⁵ Zamborini, F. P.; Bao, L.; Dasari, R. Nanoparticles in Measurement Science. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 541–576.

⁶ Moreira, A.J; Ordonez, N; Mansano, R.D. Low Pressure Plasma Study for Platinum Nanoparticles Synthesis. *Nanomater Nanotechnol.* **2013**, *3* (15), 1-5.

⁷ Liang, A.; Liu, Q.; Wen, G.; Jiang, Z. The Surface-Plasmon-Resonance Effect of Nanogold/silver and its Analytical Applications. *TrAC*. **2012**, *37*, 32-47.

⁸ Wen, Y.; Fang, H.; Zhu, Z.; Sun, S. Molecular Dynamics Investigation of Shape Effects on Thermal Characteristics of Platinum Nanoparticles. *Phys. Lett. A.* **2009**, *373*, 272-276.

⁹ Zhang, J.Z. Ultrafast Studies of Electron Dynamics in Semiconductor and Metal Colloidal Nanoparticles: Effects of Size and Surface. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 423-429.

¹⁰ Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P.P. Metal nanoparticles and their assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 27–35.

¹¹ Biju, V.; Itoh, T.; Anas, A.; Sujith, A.; Ishikawa, M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal Bioanal Chem.* **2008**, *391*, 2469-2495.

¹² Cruz, D.; Rodríguez, M.; López, J.; Herrera, V.; Orive, A.; Creus, A. Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Av. Cien. Ing.* **2012**, *3*, 67-78.

¹³ Dib, X.E.G.; Méndez, U.O.; Gúzman, S.S.; Ferrer-Lupi, D.; Yacamán, M.J. Síntesis y propiedades de nanopartículas monometálicas y bimetálicas de oro-plata. *Ingenierías*. **2009**, *XII (45)*, 72-78.

¹⁴ Grande, A.H. Nanotecnología y Nanopartículas Magnéticas: La física actual en lucha contra la enfermedad. *R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* **2007**, *101* (2), 321-327.

¹⁵ Domènech, B.; Arrieta, J.B.; Alonso, A.; Muñoz, M.; Muraviev, D.N.; Macanás, J. Bifunctional Polymer-metal Nanocomposite Ion Exchange Materials (*DOI:* 10.5772/51579).

¹⁶ Devi, G.S.; Rao V. J. Room temperature synthesis of colloidal platinum nanoparticles. *Bull. Mater. Sci.* **2000**, *23*, 467-470.

¹⁷ Shervani, Z.; Yamamoto, Y. Size and morphology controlled synthesis of gold nanoparticles in green solvent: Effect of reducing agents. *Materials Letters*. **2011**, *65*, 92-95.

¹⁸ Giljohann, D.A.; Seferos, D.S.; Daniel, W.L.; Massich, M.D.; Patel, P.C.; Mirkin, C.A. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280-3294.

¹⁹ Montenegro, J.M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, M.J.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W.J. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, *65*, 677–688.

²⁰ Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F; Ren, J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir.* **2012**, *28*, 4464-4471.

²¹ Zhu, H.; Isikman; S.O.; Mudanyali, O.; Greenbauma, A.; Ozcan, A. Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab Chip.* **2013**, *13*, 51–67.

²² Howarth, M.; Liu, W.H.; Puthenveetil, S.; Zheng, Y.; Marshall, L.F.; Schmidt, M.M.; Wittrup, K.D.; Bawendi, M.G.; Ting, A.Y. Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells. *Nat. Methods.* **2008**, *5*, 397–399.

²³ Liu, X.; Xu, H.; Xia, H.; Wang, D. Rapid Seeded Growth of Monodisperse, Quasi-Spherical, Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles via H₂O₂ Reduction. *Langmuir.* **2012**, 28, 13720-13726.

²⁴ Nguyen, D.; Kim, D.; Kim, K. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron.* **2011**, *42*, 207-227.

²⁵ Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F; Ren, J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir.* **2012**, *28*, 4464-4471.

²⁶ Njoki, P.N.; Lim, I.S.; Mott, D.; Park, H.Y.; Khan, B.; Mishra, S.; Sujakumar, R.; Luo, J.; Zhong, C.J. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* **2007**, *111*, 14664-14669.

²⁷ Escobar, B.; Barbosa, R.; Yoshida, M. M.; Gomez, Y.V. Carbon nanotubes as support of well dispersed platinum nanoparticles via colloidal synthesis. *J. Power Sources.* **2013**, *243*, 88-94.

²⁸ Tongsakul, D.; Wongravee, K.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S. Enhancement of the Reduction Efficiency of Soluble Starch for Platinum Nanoparticles Synthesis. *Carbohydr. Res.* **2012**, *357*, 90-97.

²⁹ Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspension. *Nature Physical Science*. **1973**, *241*, 20-22.

³⁰ Schmid, G. Clusters and Colloids, From Theory to Applications. *VCH: Weinheim*, **1994**, 523-536.

³¹ Pamies, R.; Cifre, J. G. H.; Espín. V. F.; González, M. C.; Baños, F. G. D.; De la Torre, J. G. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *J Nanopart Res.* **2014**, *16* (2376), 2-11.

³² Oh, J. G.; Kim, H. Synthesis of core-shell nanoparticles with a Pt nanoparticle core and a silica shell. *Curr. Appl Phys.* **2013**, *13*, 130-136.

³³ Liu, M.; Jia, C.; Jin, Q.; Lou, X.; Yao, S.; Xiang, J.; Zhao, J. Novel colorimetric enzyme immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta*. **2010**, *81*, 1625–1629.

³⁴ Lin, C. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T.; Li, P.; Zanella, M.; Chang, W. H.; Parak, W. J. Design of an Amphiphilic Polymer for Nanoparticle Coating and Functionalization. *Small.* **2008**, *4*, 334 – 341.

³⁵ Susumu, K.; Oh, E.; Delehanty, J.B.; Blanco-Canosa, J.B.; Johnson, B.J.; Jain, V.; Hervey, W.J.; IV; Algar, W. R.; Boeneman, K.; Dawson, P.E.; Medintz, I.L.; Multifunctional Compact Zwitterionic Ligands for Preparing Robust Biocompatible Semiconductor Quantum Dots and Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9480–9496.

³⁶ Chan, W.C.W; Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*. **1998**, *281*, 2016.

³⁷ Levy, R.; Wang, Z.; Duchesne, L.; Doty, R.C.; Cooper, A.I.; Brust, M.; Fernig, D.G. A generic approach to monofunctionalized protein-like gold nanoparticles based on immobilized metal ion affinity chromatography. *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 592–594.

³⁸ Hostetler, M.J.; Green, S.J.; Stokes, J.J.; Murray, R.W. Monolayers in three dimensions: synthesis and electrochemistry of -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4212–4213.

³⁹ Zanchet, D.; Micheel, C.M.; Parak, W.J.; Gerion, D.; Alivisatos, A.P. Electrophoretic isolation of discrete Au nanocrystal/DNA conjugates. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 32–35.

⁴⁰ Claridge, S.A.; Liang, H.W.; Basu, S.R.; Frechet, J.M.J.; Alivisatos, A.P. Isolation of discrete nanoparticle–DNA conjugates for plasmonic applications. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1202–1206.

⁴¹ Montenegro, J.M.; Grazu, V.; Sukhanova, A.; Agarwal, S.; de la Fuente, M.J.; Nabiev, I.; Greiner, A.; Parak, W.J. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013**, *65*, 677–688.

⁴² Mei, B.C.; Susumu, K.; Medintz, I.L.; Delehanty, J.B.; Mountziarisb, T. J.; Mattoussi, H. Modular poly(ethylene glycol) ligands for biocompatible semiconductor and gold nanocrystals with extended pH and ionic stability. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949–4958.

⁴³ Mei, B.C.; Oh, E.; Susumu, K.; Farrel, D.; Mountziarisb, T. J.; Mattoussi, H. Effects of Ligand Coordination Number and Surface Curvature on the Stability of Gold Nano particles in Aqueous Solution. *Langmuir.* **2009**, *25* (*18*), 10604-10611.

⁴⁴ Bourg, M.C.; Badia, A.; Lennox, R.B. Gold-sulfur bonding in 2D and 3D selfassembled monolayers: XPS characterization. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104*, 6562–6567.

⁴⁵ Szeląg, M.; Mikulski, D.; Molski, M. Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *J Mol Model.* **2012**, *18*, 2907–2916.

⁴⁶ Zhang, Y.; Clapp, A. Overview of Stabilizing Ligands for Biocompatible Quantum Dot Nanocrystals. *Sensors.* **2011**, *11*, 11036-11055.

⁴⁷ Sumusu, K.; Mei, B.C.; Mattoussi, H. Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 424.

⁴⁸ Sumusu, K.; Uyeda, H.T.; Mendintz, I.L.; Pons, T.; Delehanty, J.B.; Mattoussi, H. Enhancing the Stability and Biological Functionalities of Quantum Dots via Compact Multifunctional Ligands. *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987.

⁴⁹ Roberts, M.J.; Bentley, M.D.; Harris, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, *64*, 116-127.

⁵⁰ Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2007**, *58*, 3–7.