



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Desarrollo de nuevas nanopartículas como marcadores
para el análisis de proteínas en muestras de interés médico
por fluorescencia y por ICP-MS**

Alejandro Rodríguez Penedo

Oviedo, Julio 2020



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Centro Internacional de Postgrado
Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Beatriz Fernández García, Contratada Ramón y Cajal del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo y **Héctor González Iglesias**, Profesor Asociado del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “*Desarrollo de nuevas nanopartículas como marcadores para el análisis de proteínas en muestras de interés médico por fluorescencia y por ICP-MS*” ha sido realizado por el alumno Alejandro Rodríguez Penedo bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2019-20, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 17 de Julio de 2020

Fdo: Beatriz Fernández García

Fdo: Héctor González Iglesias

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas sin cuya ayuda no hubiera podido realizar este Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, me gustaría otorgarle mi más sincero agradecimiento a Ana Lores Padín por todo su apoyo brindado durante toda la parte experimental, ya que no solo me enseñó a manejar los equipos e instrumentos que se utilizaron en la sección experimental, sino que además me ayudó a diseñar los experimentos que se realizarían y a tratar los resultados obtenidos. También me gustaría agradecerle todo el conocimiento que me ha otorgado en el área de los nanoclústeres, de los cuales tenía un conocimiento muy limitado antes de la realización de este TFM.

A continuación, me gustaría agradecerles a mis tutores, la Dra. Beatriz Fernández García y el Dr. Héctor González Iglesias, por guiarme a lo largo de todo el desarrollo de la memoria. Me gustaría resaltar su apoyo brindado durante la parte experimental, durante la cual realizábamos reuniones semanales para, a la luz de los resultados obtenidos, organizar los experimentos que se realizarían a continuación. A raíz de este último punto me gustaría agradecerle a la Cat. María Rosario Pereiro García por el apoyo brindado, habiéndome ayudado a encontrar bibliografía relevante y a organizar la sección experimental.

Finalmente, me gustaría dedicarle este TFM a mis padres, a mi hermano y a mis amigos los cuales siempre me han apoyado. Sin vosotros todo esto no hubiera sido posible.

RESUMEN

Las propiedades fisicoquímicas exhibidas por los nanoclústeres metálicos (MNCs) los han llevado a convertirse en uno de los nanomateriales que más interés han suscitado en la química analítica en la última década. Sus excelentes propiedades fluorescentes, su baja toxicidad, su elevada estabilidad y su capacidad para bioconjugarse, a través de los ligandos que lo recubren, a diferentes biomoléculas han conseguido atraer un creciente interés en su aplicación como marcadores fluorescentes en análisis biológicos. Los NCs más estudiados son los de Au y Ag, sin embargo, en este TFM se ha decidido sintetizar PdNCs, los cuales han tenido una menor relevancia hasta la fecha y cuya investigación es todavía escasa.

El presente TFM se enmarca en un proyecto de investigación entre la Universidad de Oviedo y el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, en el cual se investigan los mecanismos moleculares implicados en una patología ocular denominada degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En este TFM se ha buscado desarrollar y optimizar una metodología experimental que permita sintetizar PdNCs que posean las propiedades adecuadas (fluorescencia, estabilidad, baja toxicidad, etc.) que les permitan ser utilizados como marcadores bimodales en la determinación de proteínas en muestras de interés médico mediante fluorescencia y espectrometría de masas elemental.

Los NCs sintetizados se han caracterizado empleando diversas técnicas analíticas; espectroscopía de absorbancia Vis-UV, espectroscopía de fluorescencia, dispersión dinámica de la luz (DLS) y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Nanotecnología y nanociencia.....	4
1.2	Nanoclústeres metálicos.....	7
1.2.1	Síntesis de nanoclústeres metálicos.....	9
1.2.1.1	Nanoclústeres de paladio.....	12
1.2.2	Caracterización de nanoclústeres metálicos.....	13
1.2.2.1	Espectroscopía de fluorescencia	15
1.2.2.2	Dispersión Dinámica de la Luz.....	16
1.2.2.3	Plasma de Acoplamiento Inductivo – Espectrometría de Masas	18
1.2.3	Aplicaciones de los nanoclústeres metálicos	20
1.2.3.1	Empleo de nanoclústeres como sondas fluorescentes	21
2	Objetivos	23
3	Metodología experimental.....	24
3.1	Materiales y reactivos	24
3.2	Instrumentación	24
3.3	Síntesis de nanoclústeres de paladio	25
3.3.1	Síntesis de PdNCs empleando ácido lipoico como agente protector.....	25
3.3.2	Síntesis de PdNCs empleando DHLA como agente ligante	25
3.3.3	Purificación de los nanoclústeres de paladio	26
4	Resultados y discusión.....	27
4.1	Caracterización de los PdNCs sintetizados empleando ácido lipoico.....	27

4.2	Caracterización de los PdNCs sintetizados empleando DHLA como ligando	31
4.3	Optimización de las relaciones molares de reactivos empleadas en la síntesis de PdNCs	34
4.4	Estudio del efecto del pH de la síntesis en la formación de PdNCs.....	38
4.4.1	Determinación del rendimiento de la síntesis empleando ICP-MS.....	43
5	Conclusiones	46
6	Trabajos Futuros	47
7	Referencias bibliográficas	48

1 Introducción

El 29 de diciembre de 1959 el físico teórico Richard Feynman impartió la conferencia “*There’s plenty of room at the bottom*” en la reunión anual de la Asociación Americana de Físicos. Al principio la conferencia pasó bastante desapercibida, siendo su publicación en la revista *Engineering and Science Magazine* citada únicamente por 7 autores en los primeros 20 años. Sin embargo, todo cambió en la década de los años 80, con la invención del microscopio de efecto túnel (STM) en el año 1981. Dicho descubrimiento otorgó el premio Nobel de Física a Gerd Binnig y Heinrich Rohrer en 1986 e hizo posible observar el mundo a escala nanométrica¹. Cuatro años después se descubrirían los fullerenos. Finalmente, en 1986 K. Eric Drexler (quien era conocedor de la conferencia impartida por Feynman de 1959) publicaría el libro “*Motores de la Creación: La próxima era de la Nanotecnología*”. Desde entonces el mundo “nano” se ha ido desarrollando hasta el punto de que cualquier persona está consumiendo nanomateriales constantemente. Se pueden encontrar en la ropa, en los coches, en la pasta de dientes, y hasta en la comida que se consume habitualmente. Pero ¿qué es exactamente esto de “nano”?

La palabra “nano” proviene del griego “*νάνος*”, que significa enano. Es un prefijo del Sistema Internacional que indica que es una mil millonésima parte, es decir, que un nanómetro (nm) es igual a 10^{-9} metros. Cabe resaltar que no existe una definición única sobre qué es un nanomaterial y qué no lo es², existiendo una amplia variedad de definiciones. Las más importantes son la que ofrece la Unión Europea (UE), la de la Organización Internacional de Normalización (ISO), la que otorga la administración americana de alimentos y medicamentos (FDA) y la que proporciona la agencia de protección ambiental estadounidense (EPA). En la Tabla 1 se recoge una visión general de las características que se deben cumplir para que los organismos mencionados anteriormente consideren que algo es un nanomaterial.

Tabla 1. Reglas que siguen la UE, ISO, FDA y EPA para considerar si algo es o no un nanomaterial.

	UE	ISO	FDA	EPA
Tamaño (nm)	<1 hasta 100	Entre 1 y 100	Entre 1 y 100	Entre 1 y 100
Aglomerados	Si	Si	No	Si
Artificiales	No	No	Si	Si
Solubilidad	No	No	No	No
Distribución	50% en número	No consta	No consta	10% en masa
Propiedades novedosas	No	No	Si	Si
Nanoestructurados	No	Si	No	Si

El tamaño se refiere a que al menos una de sus dimensiones debe de estar comprendida entre ese rango de valores y el término aglomerados es para saber si un aglomerado de nanomateriales se considera un nanomaterial. Artificiales se refiere a si únicamente se tienen en cuenta los que son producidos de manera intencional. Solubilidad sirve para discriminar los nanomateriales según su solubilidad (útil para saber cuáles son biopersistentes). La distribución es la cantidad de partículas nanométricas (o su masa según la EPA) que debe de tener el material para que se considere que contiene nanopartículas (NPs). El apartado de propiedades novedosas sirve para indicar si se requiere que el nanomaterial posea alguna propiedad única que no presente en la escala macroscópica. Finalmente, el apartado nanoestructurados es para saber si consideran nanomaterial a aquellos materiales macroscópicos que están formados por un conjunto de nanoestructuras.

A partir de aquí se va a utilizar la definición de la comisión europea, la cual desde 2011 considera que un nanomaterial es “un material natural, accidental o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más de las dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre un nanómetro y 100 nanómetros”³. Sin embargo, también considera algunas excepciones, como que los nanotubos de carbonos y los fullerenos deben ser considerados nanomateriales, independientemente de que una o más dimensiones externas fueran menores a 1 nm.

Existen varias maneras de clasificar los nanomateriales. En general se suelen dividir atendiendo a su origen, a su naturaleza química o a su estructura¹. Por su origen se pueden clasificar en naturales, incidentales o artificiales.

- Naturales: Son aquellos nanomateriales que se producen de manera natural, como puede ser la acción de las olas en el mar (espumas de mar), las cenizas generadas por un volcán, etc.
- Incidentales: Son los que se producen de manera no intencional, como pueden ser los que se generan en procesos de combustión o los generados al desgastarse los neumáticos.
- Artificiales: En este grupo se encontrarían los nanomateriales que son fabricados intencionalmente, es decir, diseñados para que posean unas propiedades particulares. Un ejemplo de este tipo de materiales sería el fluorografeno ($C_{60}F_{60}$), el cual es utilizado para mejorar la eficacia de los lubricantes.

Por otro lado, se pueden clasificar atendiendo a si son orgánicos o inorgánicos.

- **Orgánicos:** Son aquellos que están basados en el carbono, ya sea por si solo (p.e. fullerenos, nanotubos de carbono) o por la utilización de moléculas orgánicas (como los lipomas).
- **Inorgánicos:** Son los nanomateriales que están constituidos por elementos metálicos o moléculas inorgánicas. Dentro de este grupo están englobados una amplia variedad de nanomateriales, como lo son las NPs, los NCs, o los Quantum Dots (QDs).

Los nanomateriales también se pueden clasificar centrándose en su estructura. En concreto en el número de dimensiones que están comprendidas entre 1 y 100 nm⁴.

- **Nanomateriales de dimensión cero (0D):** Son aquellos en los que las tres dimensiones están en la escala nanométrica. En este apartado entrarían las NPs, los NCs y los QDs.
- **Nanomateriales de dimensión uno (1D).** Son los nanomateriales en los que solo dos dimensiones están en la escala nanométrica. Ejemplos de nanomateriales 1D serían los nanotubos de carbono o las nanofibras.
- **Nanomateriales de dimensión dos (2D).** Son los que únicamente poseen una dimensión en la escala nanométrica. El ejemplo más claro es el grafeno.
- **Nanomateriales de dimensión tres (3D).** Son aquellos materiales que no poseen ninguna dimensión en la escala nanométrica, sin embargo, está constituido por un conjunto de nanomateriales. Es decir, que un nanomaterial 3D es un material macroscópico (o microscópico) que es en realidad una agrupación de nanomateriales de orden cero, uno y dos, pudiendo ser una agrupación de un único tipo o una mezcla. El mejor ejemplo de este tipo de nanomateriales es el grafito, que es un material macroscópico pero que está formado por capas apiladas de grafeno. Cabe resaltar que en concreto la unión europea no considera a los nanomateriales 3D como nanomateriales.

Este es el criterio que sigue la Unión Europea y China, sin embargo, existen otros modelos diferentes, por ejemplo, el de la ISO⁴. Esta denomina nanomateriales 3D a los que tienen tres dimensiones en el rango de los nanómetros, 2D a los que tienen dos y 1D a los que solo tienen una dimensión nanométrica.

1.1 Nanotecnología y nanociencia

La Iniciativa Nacional de Nanotecnología (INN) define la nanotecnología como “la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nm, donde fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. La nanotecnología, que abarca la ciencia, la ingeniería y la tecnología a nanoescala, incluye la creación de imágenes, la medición, el modelado y la manipulación de la materia a esta escala de longitud”⁵.

Existen dos tipos de metodologías para la fabricación de nanomateriales, las técnicas descendentes (más conocidas como “*Top-Down*”) y las técnicas ascendentes (más conocidas como “*Bottom-Up*”)⁶. Las técnicas “*Top-Down*” parten de materiales en la escala macroscópica y se va reduciendo la escala hasta alcanzar el tamaño nanométrico. Esta muy desarrollada en la industria de los semiconductores, siendo capaces de fabricar y comercializar chips que integran transistores de 7 nm. La técnica que más se suele utilizar es la fotolitografía (bien sea mediante un haz de electrones o por medio de rayos UV/rayos X, más eficaces, pero más caros). Las técnicas “*Top-Down*” son las que más se han desarrollado debido a que son más simples. Sin embargo, son técnicas costosas y que pueden generar defectos en la superficie de los nanomateriales⁷ (los daños estructurales se suelen generar durante la fase de ataque). Además, este tipo de técnicas solo permiten realizar diseños con una estructura muy simple.

Las técnicas “*Bottom-Up*” parten de átomos y moléculas (que se consideran como bloques de construcción). A continuación, estos átomos/moléculas se van uniendo para ir adquiriendo nanoestructuras, las cuales pueden tener una gran complejidad⁶. Este tipo de técnicas son muy prometedoras ya que permiten obtener nanomateriales que poseen menos defectos estructurales y una distribución química más homogénea. Esto se debe a que al construirlos desde sus elementos básicos (átomos) permite acercarse al equilibrio termodinámico, minimizando los defectos cristalinos. Las técnicas más utilizadas son la síntesis química, la síntesis biológica y el autoensamblaje. En ellas se requiere muy poca intervención humana (solo requiere controlar las condiciones en las que se desarrolla el proceso). Otra técnica más complicada es la manipulación atómica mediante microscopios de sonda (STM y microscopía de fuerza atómica, AFM). Esta técnica requiere un instrumental caro, el cual debe de ser controlado por personal cualificado. El principal problema de este tipo de técnicas es que es muy difícil sintetizar nanomateriales a gran escala utilizando estos procedimientos, por lo que no se suelen utilizar a nivel comercial⁷.

Por otro lado, la nanociencia podría definirse como la ciencia que estudia el comportamiento de los objetos que están comprendidos entre 1 y 100 nm. Ahora bien, esta definición es muy vaga debido a que la nanociencia es una rama multidisciplinar de la ciencia, por lo que abarca múltiples disciplinas científicas diferentes⁸. En la Figura 1 se muestra una

pequeña selección de las diferentes áreas científicas que utilizan los nanomateriales, así como alguna de sus posibles aplicaciones.

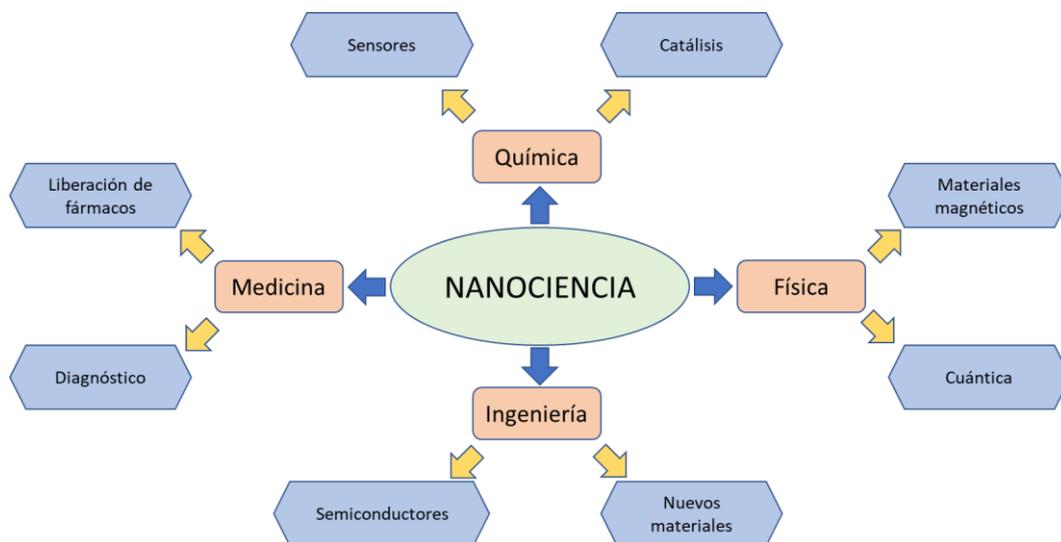


Figura 1. Diagrama donde se recogen las áreas del conocimiento que utilizan nanotecnología, así como una pequeña selección de las aplicaciones de cada área.

Esta multidisciplinariedad hace que tampoco haya una única definición para la nanociencia, ya que cada rama asocia el concepto de nanociencia a su campo de estudio⁹. Por ejemplo, los físicos e ingenieros suelen considerar nanociencia a aquello relacionado con el comportamiento de electrones y fotones y el comportamiento cuántico en estructuras del tamaño de la nanoescala. Sin embargo, la biología se centra en el estudio de las nanoestructuras que están presentes en los organismos vivos (p.e. el ADN, virus, orgánulos celulares, etc.) y, en general, cualquier estructura nanométrica de origen biológico. Si bien es cierto que estos no se pueden considerar nanomateriales según la definición de la comisión europea. Este apartado de la biología resulta muy interesante ya que como bien dijo Francis Crick en 1989, "*si desea conocer la función, determine la estructura*", por lo que preguntas que pudieran parecer tontas como "*¿cómo funciona el flagelo de una bacteria?*"¹⁰ puedan desembocar en importantes avances científicos.

En el área de la química la nanociencia se suele asociar tradicionalmente con coloides, polímeros moleculares y micelas, aunque en los últimos años han surgido nuevas estructuras como las NPs, los nanotubos de carbono y el grafeno, los cuales están siendo ampliamente estudiados debido a sus propiedades. Dentro de este campo, la química analítica es una de las áreas que más se ha beneficiado de la denominada "revolución nanotecnológica". Se puede considerar que existen tres tipos de vías para la utilización de los nanomateriales en la química analítica. La primera de ellas es como nuevos analitos. La segunda es como herramientas para mejorar las capacidades de las técnicas analíticas (p.e. diseñar sensores más pequeños y sensibles). También se podrían incluir dentro de este segundo tipo otras técnicas como la

extracción en fase sólida utilizando polímeros molecularmente impresos (MIP). Por último, está la que se suele denominar “tercera vía”, que es una combinación de las dos anteriores. Se basa en la utilización de los nanomateriales como herramientas analíticas para caracterizar otros nanomateriales (p.e. utilización de nanotubos de carbono como sorbentes).

Así mismo cabe destacar que los avances obtenidos en el área de la química analítica también suponen un beneficio para la nanociencia y la nanotecnología, pudiendo considerarse una relación sinérgica¹¹ entre ellas. En otras palabras, la mejora de las técnicas de análisis hace que se pueda conocer mejor el mundo nanoscópico, lo que a su vez provoca un desarrollo de la nanotecnología. Esta relación sinérgica se ilustra de modo esquemático en la Figura 2.

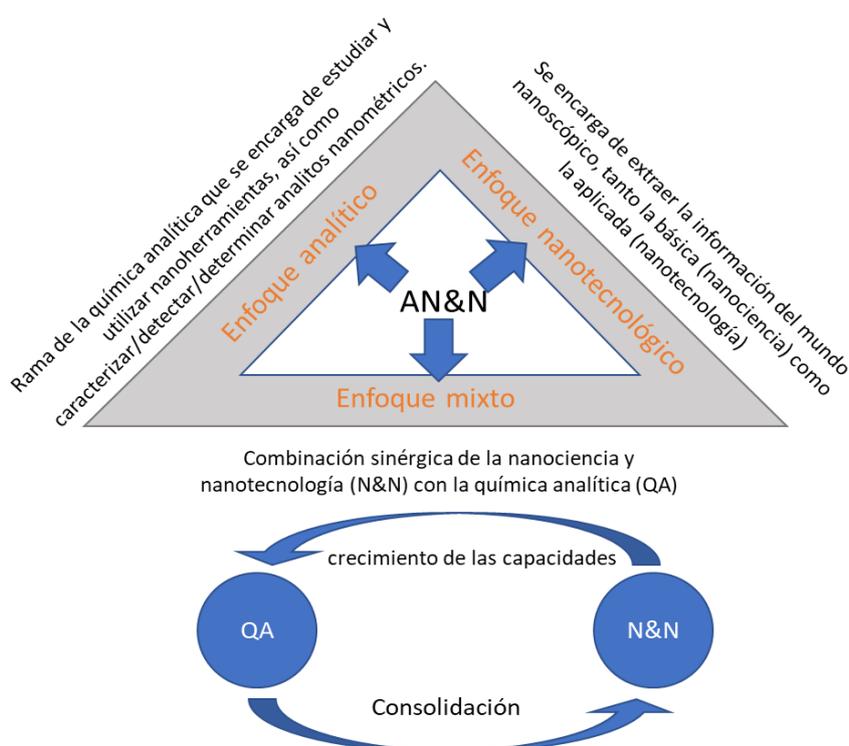


Figura 2. Esquema que ilustra cómo la mejora de la Nanociencia Analítica y Nanotecnología (AN&N) supone una mejora tanto para la nanociencia y nanotecnología (N&N) como para la química analítica (QA). Modificado del artículo publicado por Soriano, M. L. et al.¹¹.

En el presente trabajo de fin de máster (TFM) se propone como objetivo desarrollar la síntesis de nuevos nanomateriales que posean propiedades luminiscentes y que puedan ser aplicados en el campo de la bioanalítica. Concretamente investigará la síntesis y empleo de MNCs (nanomateriales inorgánicos de dimensión cero).

1.2 Nanoclústeres metálicos

Los MNCs consisten en agrupaciones de unos pocos centenares de átomos cuyo tamaño es similar a la longitud de onda de Fermi¹², lo que provoca que las bandas energéticas, propias de los metales y de las NPs metálicas, se dividan en niveles energéticos discretos, lo que se traduce en una variación en las propiedades optoelectrónicas. En la Figura 3 muestra un esquema donde se pueden ver los diferentes niveles energéticos dependiendo del tamaño del material.

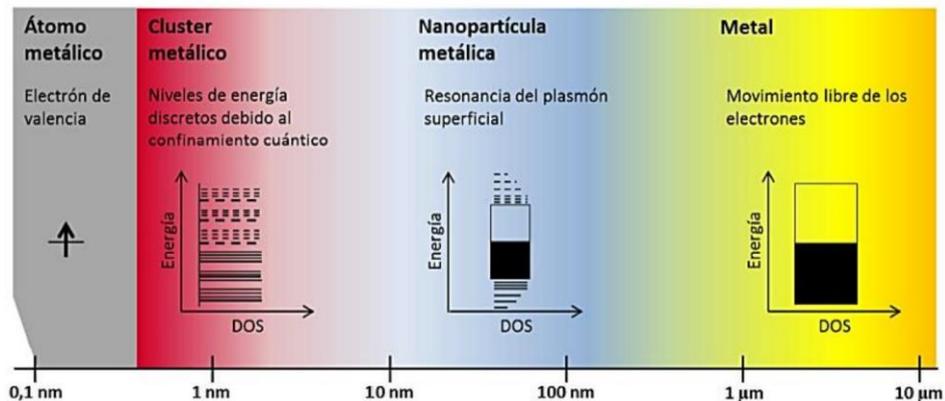


Figura 3. Variación de los niveles energéticos respecto al tamaño. Se puede observar que los niveles energéticos de los NCs son discretos (a diferencia de las NPs), lo que provoca que puedan tener lugar transiciones energéticas. Imagen extraída de la Tesis Doctoral realizada por Trapiella Alfonso, L.⁸.

La desaparición de las bandas de energía provoca que los NCs no sean conductores. Además, el pequeño tamaño de los NCs provoca que la oscilación colectiva de los electrones no se pueda producir, haciendo que en los NCs no se exhiba el fenómeno de la resonancia del plasmón superficial. Esto es una limitación debido a que se ha demostrado que la resonancia del plasmón de superficie puede ser utilizado en una amplia variedad de técnicas de imagen (p.e. nuevas técnicas de “bioimaging” en el ámbito de la biomedicina)^{13,14}.

Por otro lado, la ventaja de que posean niveles discretos de energía es que se pueden producir transiciones entre estados energéticos cuando se irradian con radiación electromagnética, por lo que los NCs se caracterizan por tener una intensa emisión fluorescente¹⁵. Así mismo también poseen otras características muy interesantes:

1. No solo son fluorescentes, sino que la longitud de onda de excitación y la de emisión varían al modificarse el diámetro del NC, el metal (no es igual un NC de oro que de plata), el disolvente en el que se encuentra y los ligandos que posee¹⁶. Estos aspectos tienen una serie de ventajas e inconvenientes. Por un lado, esta variabilidad de la longitud de onda de emisión y de excitación hace que se puedan diseñar NCs que posean unas condiciones de

emisión y excitación particulares, pudiendo incluso utilizar varios tipos de NCs para hacer la determinación simultánea de múltiples analitos.

La principal limitación reside en que se deben controlar muy bien las condiciones de la síntesis para que los NCs tengan un tamaño muy similar (deben ser monodispersos). Si no fuera así podrían existir NCs de tamaños diferentes (cada uno con su propio máximo de emisión) lo que provocaría un descenso significativo del rendimiento cuántico de emisión.

2. También poseen otras características optoelectrónicas destacables. No sufren fotoblanqueo (i.e. destrucción del fluoróforo al incidir la radiación electromagnética sobre él, muy común en moléculas fluorescentes orgánicas) y tienen un elevado desplazamiento de Stokes (diferencia entre la longitud de onda del máximo de excitación y el de emisión), si bien es cierto que suelen tener unos rendimientos cuánticos algo inferiores a los fluoróforos orgánicos (aunque depende en gran medida de los ligandos que se utilicen¹⁷).
3. Se puede conseguir que los NCs metálicos tengan una escasa toxicidad al recubrirlos de ligandos que sean biocompatibles. Los ligandos también permiten la solubilización de los NCs y su bioconjugación a diferentes biomoléculas. Estas propiedades unidas a sus cualidades fluorescentes hace que los NCs sean uno de los nanomateriales que más aplicaciones podrían tener en el campo de la biomedicina, bien sea únicamente para la detección y cuantificación de los biomarcadores de una enfermedad o bien para realizar estudios terapéuticos (combinación de diagnóstico y tratamiento)^{17,18}. Aun así se requiere que se realicen más estudios centrados en estudiar la biocompatibilidad de los NCs, ya que se sabe que las proteínas y otras biomoléculas tienen tendencia a interactuar con las NPs. Además, los metales de los que está hecho el NC podrían ser tóxicos, por lo que sería peligroso si el NC se degradase (liberaría átomos). Por estas razones se necesita profundizar aún más en este ámbito antes de que se puedan explotar todas sus posibilidades en el área de la medicina.
4. Al ser partículas muy pequeñas (< 3nm) la relación área/volumen es muy grande, lo que los hace catalizadores muy eficaces¹⁹.

Se puede apreciar que las cualidades de los NCs los hace ideales para su aplicación en “bioimaging” (baja toxicidad, son resistentes al fotoblanqueo, son fluorescentes, son fácilmente bioconjugables, etc.). También existe otro tipo de nanomateriales que presenta excelentes propiedades fluorescentes, los Quantum Dots. Los QDs son nanopartículas inorgánicas semiconductoras cuyo núcleo está constituido normalmente por una combinación de dos heteroátomos diferentes (p.e. CdS, ZnS, GaAs, etc.). Sus propiedades optoelectrónicas son muy similares a los NCs (amplio desplazamiento de Stokes, resistentes al fotoblanqueo, etc.)²⁰ y además suelen tener rendimientos cuánticos superiores a los NCs. Sin embargo, el empleo de QDs

presentan algunas limitaciones respecto a los NCs; suelen ser menos estables y la emisión que producen no es continua (parpadean)¹⁷. Por otro lado, su síntesis suele ser bastante compleja.

Los NCs que más se utilizan son los de oro (AuNCs)^{17,18} y los de plata (AgNCs)¹⁹, aunque también se pueden utilizar otros metales como el cobre (CuNCs)²², el platino (PtNCs)²³ y el paladio (PdNCs)²⁴. Así mismo también se pueden hacer NCs que están compuestos por dos metales diferentes, a los cuales se les denomina como bimetalicos. Ejemplos de esta clase de NCs pueden ser los diseñados por Huang et al.²⁵ (Au/AgNCs) y Zheng et al.²⁶ (Ag/PtNCs).

1.2.1 Síntesis de nanoclústeres metálicos

Existe una gran variedad de opciones a la hora de llevar a cabo la síntesis de MNCs, sin embargo, los métodos basados en la reducción del ion metálico en presencia de un agente protector son los que más se utilizan. Se pueden emplear dos tipos de agentes protectores (que evitan la agregación del metal): la síntesis en molde y la síntesis utilizando ligandos protectores.

La síntesis en molde es un método *bottom-up* en el que los NCs crecen en el interior de una estructura, la cual suele ser un dendrímero²⁷, un polímero²⁸ o una biomolécula²⁹. Los dendrímeros tienen la desventaja de que, por lo general, hace que se produzcan partículas con un elevado índice de polidispersidad, lo que provoca que no solo se formen NCs sino también NPs, reduciendo notablemente el rendimiento de la síntesis³⁰. Aun así, los NCs sintetizados de esta manera pueden llegar a tener excelentes rendimientos cuánticos; Zheng, J. et al.²⁷ fueron capaces de sintetizar AuNCs con un rendimiento cuántico del 42%. Existen numerosos artículos en los que se han conseguido obtener NCs fluorescentes utilizando sustratos poliméricos. Shang y Dong³¹ fueron capaces de sintetizar AgNCs fluorescentes (18,6% de rendimiento cuántico) utilizando como sustrato polimetilmetacrilato, el cual es barato y sencillo de obtener.

Alternativamente, también se ha observado que las biomoléculas pueden ser sustratos muy adecuados para la síntesis de NCs, en concreto destacan las proteínas (y péptidos) y el ADN (en forma de oligonucleótidos). La principal ventaja de usar biomoléculas es que permiten sintetizar los NCs *in-vivo*. Este hecho quedó demostrado Yu, J. et al.³², los cuales fueron capaces de producir AgNCs fluorescentes en el interior de células NIH 3T3. Los oligonucleótidos también pueden ser un sustrato excelente cuando se desea sintetizar AgNCs, ya que los iones de plata poseen una elevada afinidad por la citosina. En el artículo de revisión publicado por Han, B. y Wang, E.³³ se muestran múltiples maneras de sintetizar AgNCs, así como las diferentes aplicaciones que estos NCs pueden tener. El principal problema de utilizar este tipo de síntesis es que hace que el tamaño total de los NCs se incremente en gran medida (los sustratos son voluminosos), produciendo que

sean poco adecuados para utilizarlos como marcadores. La Figura 4 ilustra cómo el ligando/sustrato que se utiliza en la etapa de síntesis puede afectar al tamaño total del NC.

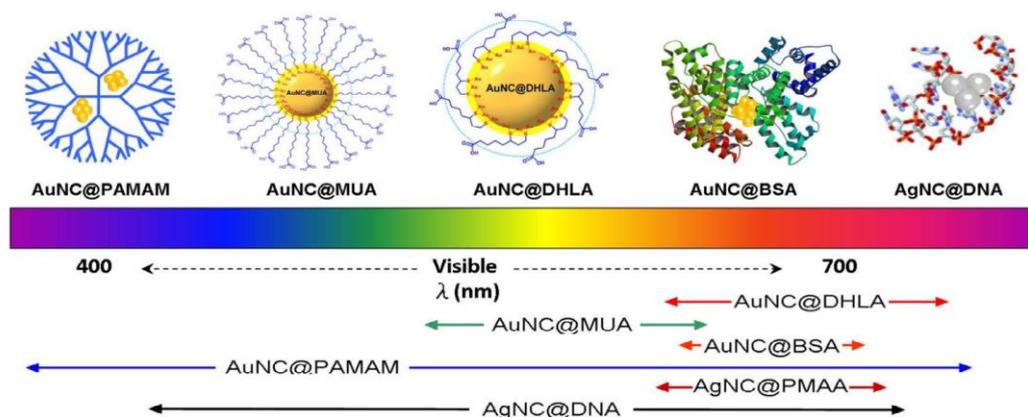


Figura 4. Esquema donde se muestran tres AuNCs sintetizados utilizando moldes (AuNC@PAMAM, AuNCs@BSA y AgNC@DNA) y dos AuNCs sintetizados utilizando ligandos protectores (AuNC@MUA y AuNC@DHHLA). Se puede observar tanto el tamaño de cada uno de ellos como el rango de longitudes de onda en el que emiten. Figura extraída del artículo publicado por Lin, C. A. J.³⁴. Poli(amidoamina) (PAMAM), albúmina de suero bovino (BSA), ácido mercaptoundecanoico (MUA) y ácido dihidrolipoico (DHHLA)

Otra alternativa es sintetizar los NCs utilizando ligandos protectores. Estos ligandos se caracterizan por interactuar fuertemente con el metal, creándose una capa protectora que recubre el NC, lo que evita en parte la agregación. Las principales ventajas de utilizar ligandos protectores es que los NCs que se originan tienen un reducido volumen hidrodinámico y son muy estables. También se pueden utilizar ligandos que estén funcionalizados, lo que hace que los NCs sean solubles en diferentes medios (p.e. si se usa un ligando con el extremo terminal hidrofílico se pueden solubilizar los NCs en medio acuoso) y también facilita su posterior bioconjugación.

Los ligandos suelen ser pequeñas moléculas orgánicas tioladas, como por ejemplo el ácido lipoico (LA)³⁵. La ventaja de este tipo de ligandos es que los metales interactúan fuertemente con sus grupos tiol, produciéndose un enlace muy estable (especialmente en el caso del oro)³⁶. Esta estabilidad se acentúa cuando se utilizan ligando bidentados, como es el caso del LA. Existen dos parámetros clave a la hora de controlar el tamaño de los NCs: la relación metal/ligando y el control de las condiciones de reducción³⁷. En la Figura 5 se muestra, de manera esquemática, como la relación metal/ligando afecta al tamaño de los NCs.

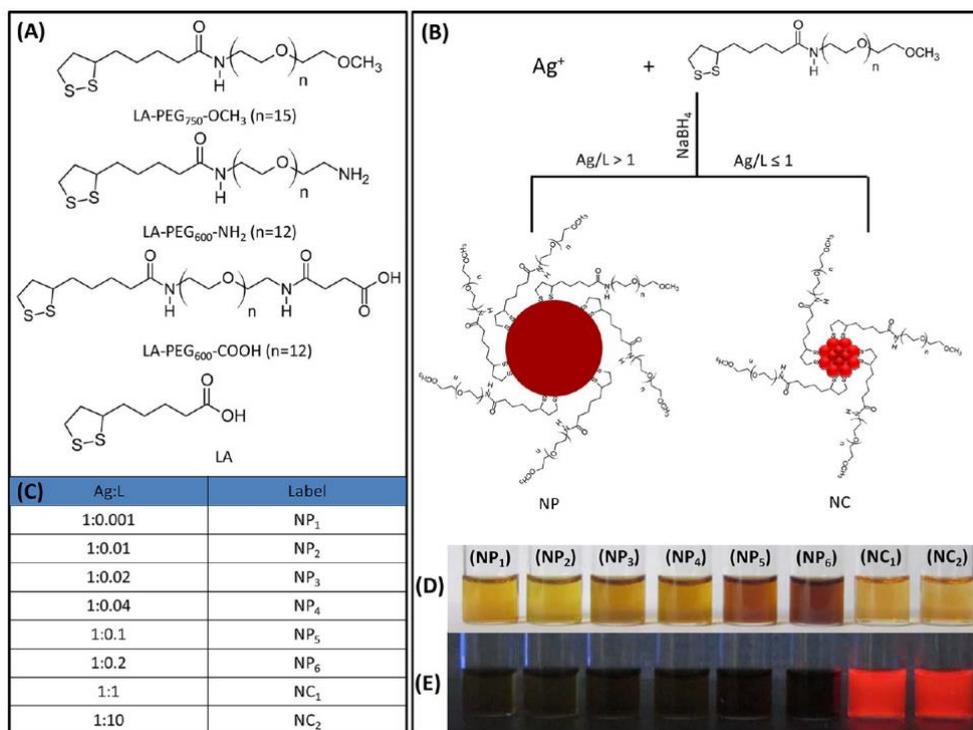


Figura 5. Representación de la formación de AgNCs funcionalizados con LA. Imagen extraída del artículo sobre AgNCs realizado por Muhammed et al.³⁵.

Se puede apreciar cómo la relación metal/ligando afecta al tamaño de los NCs, pudiendo dejar de ser fluorescentes (al alcanzar el tamaño de una NP dejan de ser fluorescente).

La reducción del metal es la etapa más importante de la síntesis ya que una reducción rápida y poco controlada provoca que los NCs que se forman tengan tamaños muy diferentes (polidispersos), lo que los vuelve más inestables y hace que las bandas de emisión sean más anchas (reduciendo el máximo de absorción). La forma más común de reducir los iones metálicos es utilizar un agente químico reductor (p.e. NaBH₄), aunque también existen otros métodos como la reducción asistida por microondas o la reducción empleando radiación electromagnética. Existen varias estrategias posibles para controlar la reducción del metal, siendo la de llevar a cabo la reacción a temperaturas bajas la que más se utiliza. También es útil limitar el poder reductor del agente químico que se utilice, por ejemplo, el NaBH₄ es menos reductor cuando se utiliza tetrahidrofurano (THF) como disolvente³⁸.

La síntesis de los NCs se puede realizar en un solo paso o en dos pasos. La síntesis en un único paso es bastante sencilla y rápida, lo que a su vez hace que sea fácil aplicarla a escala industrial. La síntesis en dos pasos consiste en sintetizar primero los NCs de manera normal añadiendo el reductor a una disolución acuosa que contiene los iones metálicos y el ligando, de esta manera se obtienen NCs con un índice de polidispersidad muy alto. Posteriormente se realiza una transferencia de fase a un medio orgánico. Yuan et al.³⁸ proponen añadir en un primer paso bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que es un surfactante catiónico, y etanol a la fase

acuosa que contienen los NCs y, posteriormente, utilizar tolueno para realizar un cambio de fase. En la fase orgánica los NCs se reorganizan, generándose los NCs que son termodinámicamente más estables, es decir, se generan NCs monodispersos. Finalmente se vuelve a realizar un cambio de fase (a una fase acuosa). Este proceso es más laborioso, pero se consiguen NCs más estables y con un índice de polidispersidad muy bajo.

A modo de resumen la Tabla 2 recoge las principales metodologías existentes para producir MNCs, así como sus aplicaciones.

Tabla 2. Recopilación de diferentes procedimientos para producir MNCs.

Referencia	Síntesis de NCs metálicos	Aplicaciones
Peng, Y. et al. ²⁴	Sal: (NH ₄) ₂ PdCl ₄ Ligando: metionina Reductor: ácido ascórbico Relación metal:ligando:reductor 1:80:42 Síntesis en medio básico calentando a 55°C durante 5,5 horas	PdNCs: Determinación de hemoglobina en sangre observando la variación en la fluorescencia de los PdNCs al añadir la hemoglobina (quencher)
Valencia, E. et al. ²¹	Sal: AgNO ₃ Ligando: LA Reductor: NaBH ₄ Relación metal:ligando:reductor 1:16:12 Medio básico y vial protegido de la luz	AgNCs: Bioconjugación con un anticuerpo <i>anti-CFH</i> , para ser utilizado en la determinación del factor H de complemento (CFH) en suero humano mediante un fluoroinmunoensayo
Huang, H. et al. ²⁵	Sal: AgNO ₃ y HAuCl ₄ , ratio molar 5:1 Ligando: LA Síntesis en medio básico calentando a 70°C durante 8 horas	Au/Ag NCs: Estudio de la citotoxicidad en células HeLA y detección <i>in vitro</i> de Fe ³⁺ aprovechándose de que éste actúa como un quencher
Tanaka, S. I., et al. ²³	Sal: H ₂ PtCl ₆ Reductor: NaBH ₄ La síntesis se lleva a cabo en presencia de PAMAM. A continuación, se realiza un intercambio de ligandos, utilizando ácido mercaptoetanóico	PtNCs: Bioconjugación con una proteína y con el anticuerpo <i>anti-CXCR4</i> para estudiar el receptor CHO-K1 en células vivas mediante microscopía confocal de fluorescencia
Lin, C. A. J. et al. ³⁴	Se parte de AuNP@DDAB y se añade HAuCl ₄ (en tolueno). Los AuNC@DDAB no son fluorescentes, por lo que se realizó un cambio de ligando con DHLA (en fase acuosa)	AuNCs: No se desarrollaron aplicaciones. Sin embargo, se realizó su bioconjugación con estreptavidina para que se uniera a la biotina, ensayando un medio de cultivo sin suplementar como control y otro que contenía biotina

1.2.1.1 Nanoclústeres de paladio

Las PdNPs y los PdNCs han sido ampliamente utilizados como catalizadores en múltiples reacciones, como puede ser la reacción Suzuki–Miyaura³⁹. Sin embargo, los PdNCs no han tenido prácticamente relevancia en el ámbito de la química analítica. Existen autores como Wang, Z., et

al.⁴⁰ que han desarrollado trabajos en los que se sintetizaban PdNPs con un diámetro muy pequeño (en este caso 6 nm), por lo que es probable que si se realiza la síntesis utilizando una mayor relación metal/ligando (en el artículo utilizan una relación molar 1:1 MUDDA/PdCl₄²⁻) se pudiera reducir notablemente el tamaño de las NPs, obteniéndose NCs.

Por otro lado, Peng, Y. et al.²⁴ desarrollaron un método eficaz para sintetizar PdNCs fluorescentes y monodispersos. Para ello tomaron 12 mL de una disolución acuosa que contenía (NH₄)₂PdCl₄ (2,5mM) a la que se le añadieron 24 mL de una disolución acuosa de metionina (0,1M) y 3,6 ml de una disolución de NaOH (0,6M). Se mantuvo agitando durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 9 mL de ácido ascórbico (0,14 M) como agente reductor. Se calentó a 60°C y se mantuvo durante cinco horas y media. Los PdNCs así obtenidos tenían un tamaño medio de 1,91 nm y un rendimiento cuántico del 5,47%. Cabe resaltar que dichos NCs eran estables sin importar la fuerza iónica (se evaluó su estabilidad a concentraciones de NaCl de entre 0,1 y 1000 mM). Sin embargo, su estabilidad dependía en gran medida del pH de la disolución, siendo muy estables en medios neutros y básicos (pH entre 6 y 11), pero se descomponían en medio ácidos (pH<5). Dichos resultados experimentales se atribuyen a que la metionina se reduce en esas condiciones de pH.

1.2.2 Caracterización de nanoclústeres metálicos

Es importante realizar una correcta caracterización estructural de los NCs metálicos sintetizados debido a que las propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas de los NCs dependen en gran medida de su tamaño y morfología. Además, el entendimiento de cómo varían las propiedades al modificarse la morfología del NC es clave a la hora de realizar la optimización de la síntesis, la cual variará según el campo de aplicación donde se vayan a emplear. Por ejemplo, las propiedades electrocatalíticas de los NCs son muy dependientes del tamaño del núcleo⁴¹.

La forma más sencilla de caracterizar NCs es aprovecharse de sus propiedades ópticas. Los NCs no disponen de la banda asociada a la resonancia del plasmón de superficie, lo que hace que la espectroscopía Vis-UV sea una técnica muy útil¹⁵ ya que permite identificar si solo se han sintetizado NCs (tienen bandas características) o si por el contrario se han sintetizado también NPs (habría una banda intensa correspondiente a la resonancia del plasmón de superficie). También se puede utilizar la espectroscopía de fluorescencia para comprobar si los NCs sintetizados emiten fluorescencia, pudiendo conocer su rendimiento cuántico, su polidispersidad (cuanto más estrecha sea la banda de absorción menos polidispersos serán) e identificar la presencia de posibles impurezas. Ambas técnicas son muy utilizadas^{25,42}. Otra técnica útil (aunque menos utilizada) es el dicroísmo circular, el cual permite conocer información sobre la estructura

estereoquímica y la quiralidad de los NCs³⁷. La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) se suele emplear para estudiar la superficie de los NCs, ya que permite estudiar el mecanismo de formación del NC al comparar el espectro FT-IR obtenido para el NC con el obtenido para el ligando libre⁴¹.

La principal ventaja de las técnicas ópticas es que los equipos que utilizan son bastante sencillos de manejar y económicos. Sin embargo, este tipo de técnicas ofrecen una información limitada, por lo que en la mayoría de los casos es necesario realizar una caracterización estructural más exacta (composición química y tamaño de los NCs). La técnica de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) y el DLS permiten averiguar tanto el tamaño promedio de los NCs como la polidispersidad de los mismos⁴³. La AFM y el STM también pueden ser empleados para esta labor.

Una de las técnicas más utilizadas para obtener información elemental es la espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)⁴². Para este fin también se pueden emplear diferentes técnicas de espectrometría de masas (MS), sobre todo se utiliza ICP-MS³⁴. Sin embargo, la técnica que mayor potencial tiene en este ámbito es la ionización por electrospray acoplada a un MS (ESI-MS), ya que permite conocer con exactitud la composición química del NC (tanto de la parte metálica como de la orgánica), lo que proporciona su fórmula molecular (M_xL_y)⁴⁵. Esta técnica se suele emplear junto con una electroforesis en gel, que permite separar los NCs en función de su tamaño.

Otras técnicas que también se pueden emplear para la caracterización de los NCs son⁴¹:

- La resonancia magnética nuclear (RMN), que sirve para estudiar la estructura y el entorno químico del ligando.
- La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)⁴⁴, que permite obtener información sobre los estados de oxidación en los que se encuentran los metales del núcleo.
- Los análisis termogravimétricos (TGA), que sirven tanto para calcular el porcentaje (en peso) que corresponde al ligando como para observar posibles impurezas.

En la Tabla 3 se muestra, de manera resumida, qué información permite obtener el empleo de las diferentes técnicas descritas.

Tabla 3. Técnicas empleadas para la caracterización de NCs.

Técnica	Información
Espectroscopía de fluorescencia y Vis-UV	Permite conocer si se han sintetizado correctamente y además permite determinar la presencia de impurezas
FT-IR	Estudio de los enlaces metal-ligando que se producen en la superficie del NC
HR-TEM, DLS, AFM, STM	Tamaño de los NCs y polidispersidad
EDS, ICP-MS	Información elemental, principalmente del núcleo del NC. También permiten identificar impurezas (sobre todo ICP-MS)
PAGE-ESI-MS	Composición química del NC, tanto del núcleo como de los ligandos
RMN, DC	Información estereoquímica, estructural y quiral
XPS	Permite conocer los estados de oxidación del núcleo del NC
TGA	Identificar impurezas y calcular la relación metal/ligando

Cabe destacar que para caracterizar correctamente los NCs se deben emplear varias de estas técnicas, con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible. Un buen ejemplo de esto es el artículo publicado por Adhikari y Banerjee⁴², en el cual sintetizan AgNCs fluorescentes y los caracterizan empleando espectroscopía Vis-UV, espectroscopía de fluorescencia, FTIR, HR-TEM, XRD, DLS y ESI-MS. También estudian la conductividad de los NCs.

En el presente trabajo se van a caracterizar los NCs sintetizados mediante espectroscopía Vis-UV, espectroscopía de fluorescencia, DLS e ICP-MS.

1.2.2.1 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia molecular es un proceso mediante el cual una molécula absorbe radiación electromagnética para pasar a un estado electrónico excitado y, a continuación, vuelve al estado fundamental emitiendo radiación electromagnética en el proceso. Dicha radiación emitida es de mayor longitud de onda de la que fue absorbida inicialmente⁴⁷.

En la figura 6 se muestra el diagrama de Jablonski, que sirve para ilustrar el mecanismo en el que se fundamenta la fluorescencia.

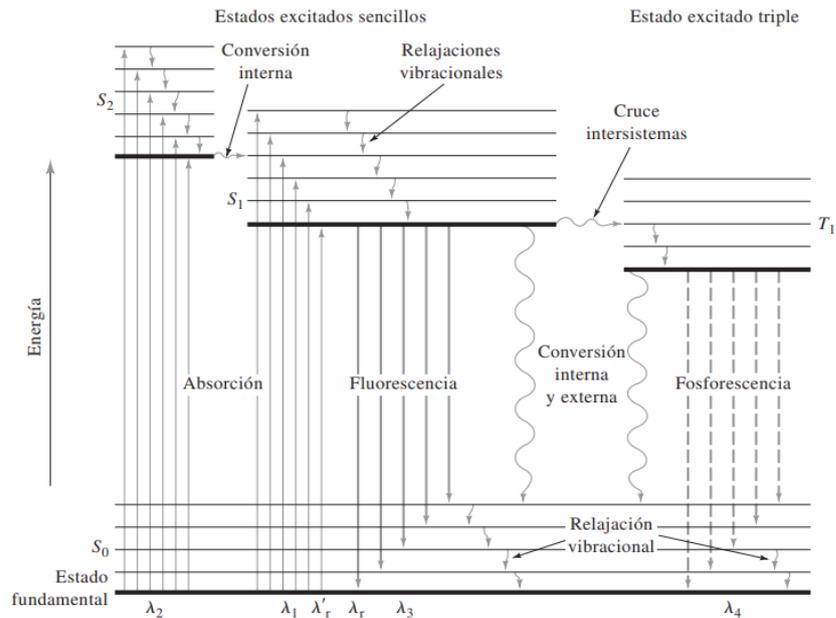


Figura 6. Diagrama de Jablonski. Imagen extraída del libro “*Principios de análisis instrumental*”⁴⁷.

En el diagrama de Jablonski se representan los diferentes estados electrónicos de una molécula. El proceso comienza cuando un electrón en el estado fundamental es excitado mediante la absorción de radiación electromagnética, pasando a un estado excitado. Dicho estado excitado se suele desactivar mediante procesos no radiacionales (conversión interna y relajaciones vibracionales). La desactivación también se puede producir mediante transiciones radiativas (fluorescencia y fosforescencia)⁴⁷.

La fluorescencia se produce cuando el electrón pasa del primer estado excitado singlete hasta el estado fundamental, emitiendo radiación electromagnética en el proceso. Cabe resaltar que dicho proceso es más lento que la relajación vibracional y la conversión interna, esto supone un problema debido a que el camino más probable para la desactivación es aquel que minimiza el tiempo que el electrón pasa en un estado excitado. Esto provoca que solo unas pocas moléculas sean fluorescentes.

1.2.2.2 Dispersión Dinámica de la Luz

La técnica DLS es una técnica no invasiva que se utiliza para medir el tamaño de partículas con un diámetro comprendido entre 10 μm y 1 nm. También sirve para observar cómo está distribuido el tamaño, de modo que es muy útil para estudiar la polidispersidad de disoluciones de NCs y NPs.

Las partículas de la disolución se mueven de manera aleatoria y continua debido a los choques con las moléculas del disolvente (movimiento browniano), de modo que si se hace incidir un haz láser sobre la disolución la longitud de onda sufre una dispersión, cuya intensidad variará con el tiempo. Esto es debido a que la intensidad resultante depende de la suma de todas las ondas de luz dispersadas, produciéndose así interacciones constructivas y destructivas. Las fluctuaciones de la intensidad con el tiempo se pueden correlacionar para poder obtener información sobre el tamaño y la forma de las partículas⁴⁸. En la figura 7 se muestra cómo se correlacionan los datos obtenidos.

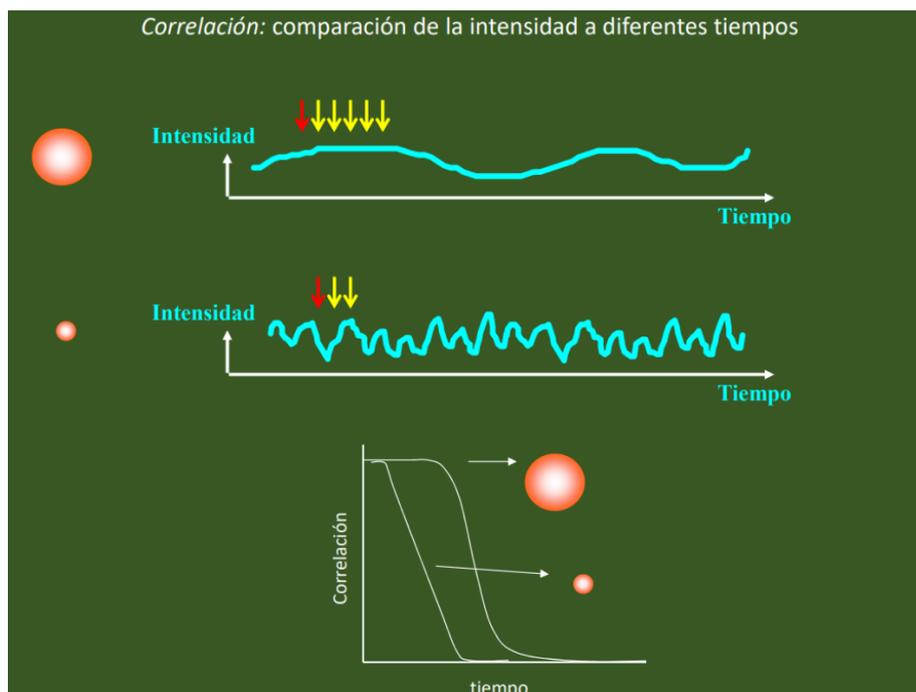


Figura 7. Medida de la fluctuación de la intensidad con el tiempo (arriba) y correlograma (abajo). Imagen extraída de la página web <http://nanobiotecnologia.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/115/2018/03/Clase-Determinacion-tama%C3%B1o-y-potencial-Z.pdf>

Se puede observar que la velocidad con la que fluctúa la intensidad respecto al tiempo es mucho mayor en las partículas pequeñas que en las grandes. Esto es debido a que cuanto más pequeña es la partícula más rápido se mueve⁴⁹, lo que a su vez provoca que la correlación disminuya más rápidamente con el tiempo. Lo abrupta que sea la caída en la intensidad sirve para indicar la polidispersidad de las partículas, siendo la caída más abrupta cuanto menor sea la polidispersidad de las mismas⁴⁹. La ecuación de Stokes-Einstein (ec. 1) se puede utilizar para calcular el radio hidrodinámico de la NP (se supone que se comporta como una esfera sólida).

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{ec. 1})$$

Donde D_h es el diámetro hidrodinámico, K la constante de Boltzman, T la temperatura (en kelvin), η la viscosidad del disolvente, y D el coeficiente de difusión traslacional.

El software del equipo utiliza la ec. 1 para proporcionar, en forma de gráfica, la distribución de los tamaños, la cual puede ser otorgada en número, en volumen o en intensidad. En la figura 8 se muestran las gráficas que se obtendrían si se midiera una disolución que contuviera NPs de 5 nm y de 50 nm con una estequiometría 1:1.

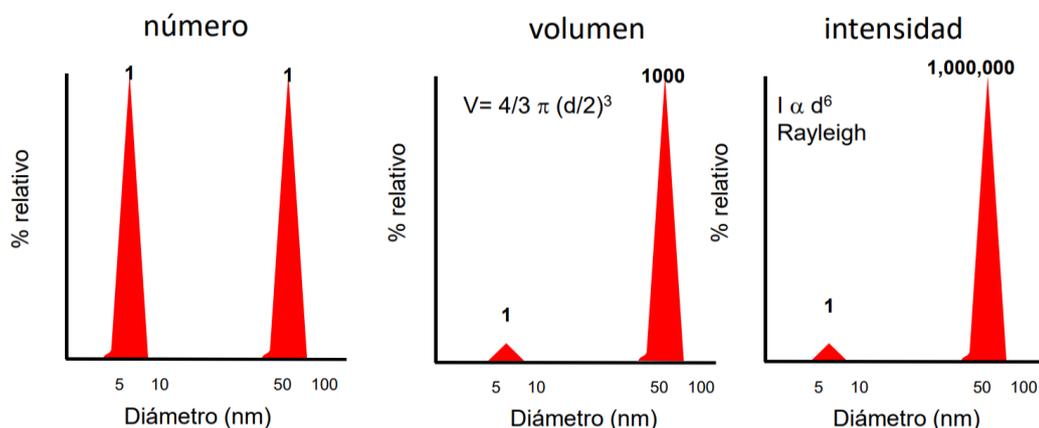


Figura 8. Distribución de una mezcla 1:1 de NPs de 5 nm y de 50 nm en número (izquierda), volumen (centro) e intensidad (derecha). Imagen extraída de la página web <http://nanobiotecnologia.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/115/2018/03/Clase-Determinacion-tama%C3%B1o-y-potencial-Z.pdf>

Se puede observar cómo tanto la distribución en intensidad como en volumen hacen que las partículas de mayor tamaño tengan una señal mucha más intensa, ya que la intensidad se relaciona con el diámetro de la partícula elevado a la sexta y el volumen con el diámetro elevado al cubo. Esto no ocurre con la distribución en número, en donde se puede apreciar que ambos picos tienen la misma intensidad.

1.2.2.3 Plasma de Acoplamiento Inductivo – Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica de análisis elemental que permiten realizar análisis rápidos y multielementales⁵⁰. Se caracteriza por tener una elevada sensibilidad para la mayoría de los elementos de la Tabla Periódica, alcanzando límites de detección del rango de las ppt y con una elevada resolución espectral⁵⁰. El ICP es una fuente de ionización que causa la completa atomización de los analitos (en la literatura se le denomina como una fuente de ionización “duras”)⁵¹. En la figura 9 se muestra un diagrama con los diferentes componentes de un ICP-MS.

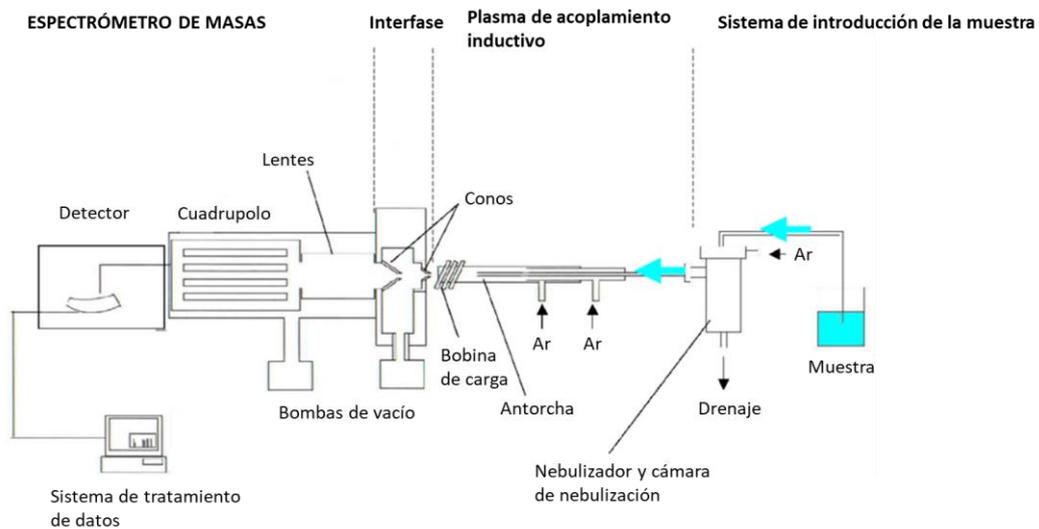


Figura 9. Diagrama de un equipo de ICP-MS con un analizador de masas de tipo cuadrupolo. Modificado de la página web ardusat.org

La primera parte importante del equipo es el sistema de introducción de la muestra, el cual se encarga de hacer llegar un flujo constante y reproducible de muestra a la antorcha. En el ejemplo que se muestra en la figura 9 se está midiendo una disolución, por lo que es necesario emplear un nebulizador junto con su correspondiente cámara de nebulización⁵⁰. Esto también es necesario en el caso de que se acople a un sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Alternativamente, otro sistema de introducción de muestra que se suele utilizar cuando se trabaja con muestras sólidas es la ablación láser (LA). Este sistema de introducción de muestra consiste en hacer incidir un haz láser sobre la superficie de un sólido para arrancar el material, el cual es arrastrado en forma de aerosol por el gas portador (usualmente Ar o He)⁵¹ hasta ser introducido en el ICP-MS.

El siguiente componente es la fuente de ionización ICP, la cual se encarga de generar el plasma de acoplamiento inductivo, que alcanza temperaturas de entre 6000 y 10000 K. La fuente de ionización está formada por una antorcha (que son tres cilindros concéntricos de cuarzo), un solenoide acoplado a un generador de radiofrecuencias y un generador de chispas⁵¹. Cabe resaltar que la fuente ICP se encuentra a presión atmosférica y que el analizador de masas se encuentra en condiciones de alto vacío. Por este motivo es necesario que exista una interfase que permita realizar este cambio de presión. Para ello se utilizan dos conos que se denominan como “sampler” (cono de muestreo) y el segundo cono “Skimmer” (de extracción). Cabe resaltar que el “sampler” está situado a una distancia de entre 10 y 20 mm de la antorcha, por lo que es necesario colocarlo en un soporte conductor, que a su vez debe estar refrigerado (normalmente se enfría mediante un flujo de agua)⁵¹.

Cuando los iones pasan de una región a presión atmosférica a una región a alto vacío tienden a dispersarse. Por ello mismo es necesario utilizar un sistema de lentes focalizadoras, el cual se encarga de volver a agrupar esos iones, de manera que todos lleguen al analizador de masas. Las lentes son piezas metálicas a las que se les aplica un potencial, de manera que atraen los iones y los dirigen al analizador de masas⁴⁷. El analizador de masas se encarga de separar los iones generados en función de su relación masa/carga (m/z)⁴⁷. En ICP-MS el analizador de masas más empleado es el de tipo cuadrupolo, que consiste en cuatro barras cilíndricas colocadas de forma paralela y equidistante al plano de simetría. El cuadrupolo destaca por ser un analizador de masas económico y rápido. Seguidamente está el detector, el cual se encarga de transformar los iones que chocan con él en una señal medible.

1.2.3 Aplicaciones de los nanoclústeres metálicos

Las propiedades fisicoquímicas exhibidas por los MNCs han hecho que se conviertan en uno de los nanomateriales más estudiados en la química analítica en las últimas décadas, habiéndose conseguido desarrollar una amplia variedad de aplicaciones.

Adhikari, B., y Banerjee, A.⁴² fueron capaces de determinar Hg^{2+} en agua empleando AgNCs altamente fluorescentes. El ensayo desarrollado se basa en que el Hg^{2+} actúa como un quencher, de modo que la fluorescencia de los AgNCs cae drásticamente cuando hay Hg^{2+} presente. El límite de detección encontrado era inferior a 0,02 ppb, lo que es notablemente menor a la concentración máxima de mercurio permitida en el agua potable (en España fijado en 1 ppb por la Directiva 98/83/CE). Se han desarrollado una amplia variedad de metodologías similares, las cuales se basan en detectar cationes metálicos que actúen como un quencher. Ejemplos de esto pueden ser la desarrollada por Cui M. et al.⁵² para detectar Cr (VI) empleando CuNCs o el procedimiento ideado por Lan G. Y. et al.⁵³ en el cual se emplean AgNCs para detectar Cu^{2+} en agua.

Cabe resaltar no solo pueden actuar como quencher los cationes metálicos, sino que también lo pueden ser pequeñas moléculas e incluso proteínas. Por ejemplo, Peng, Y. et al.²⁴ demostraron que se puede determinar hemoglobina empleando PdNCs, obteniendo un límite de detección de 50 nM y siendo un método altamente selectivo.

1.2.3.1 Empleo de nanoclústeres como sondas fluorescentes

El pequeño tamaño de los MNCs, sus propiedades optoelectrónicas, su biocompatibilidad y la facilidad para bioconjugarlos con biomoléculas los ha convertido en uno de los nanomateriales que más interés han generado para ser utilizados como sondas fluorescentes. Por ejemplo, Hsueh-Hsiao, W. et al.¹⁷ han conseguido utilizar AuNCs fluorescentes como marcadores biocompatibles en células endoteliales. Además, los MNCs fluorescentes han demostrado ser especialmente útiles tanto para realizar inmunoensayos como para realizar estudios de “bioimaging”.

Existen múltiples artículos científicos que han desarrollado inmunoensayos que empleaban NCs como sondas fluorescentes. En el artículo publicado por Valencia, E. et al.²¹ se realiza un fluoroinmunoensayo empleando AgNCs fluorescentes para determinar la proteína CFH en suero humano. En dicho artículo se recoge un límite de detección de 0,4 ng/mL, el cual es inferior a límite de detección que presentan los kits ELISA comerciales (2,15 ng/mL)²¹.

Por otro lado, existe una amplia variedad de trabajos que emplean NCs fluorescentes para realizar “bioimaging”. Tanaka, S. I. et al.²³ sintetizaron PtNCs fluorescentes, los bioconjugaron primero con proteína A y posteriormente a anticuerpos anti-CXCR4-Ab. Finalmente se introdujeron en células HeLa y se realizaron estudios de “bioimaging” empleando microscopía confocal de fluorescencia.

En la figura 10 se puede observar como los PtNCs bioconjugados con los anticuerpos anti-CXCR4-Ab se unen a las células HeLa, produciéndose una emisión fluorescente de color azul (470 nm) cuando se excita a 405 nm²³. Cabe resaltar que esto no ocurrió ni en las células HeLa a las que no se marcaron con Pt₅(MAA)₈-(proteína A)-(anti-CXCR4-Ab) ni tampoco cuando se marcaron células CHO-K1, por lo que se puede decir que son altamente selectivos²³.

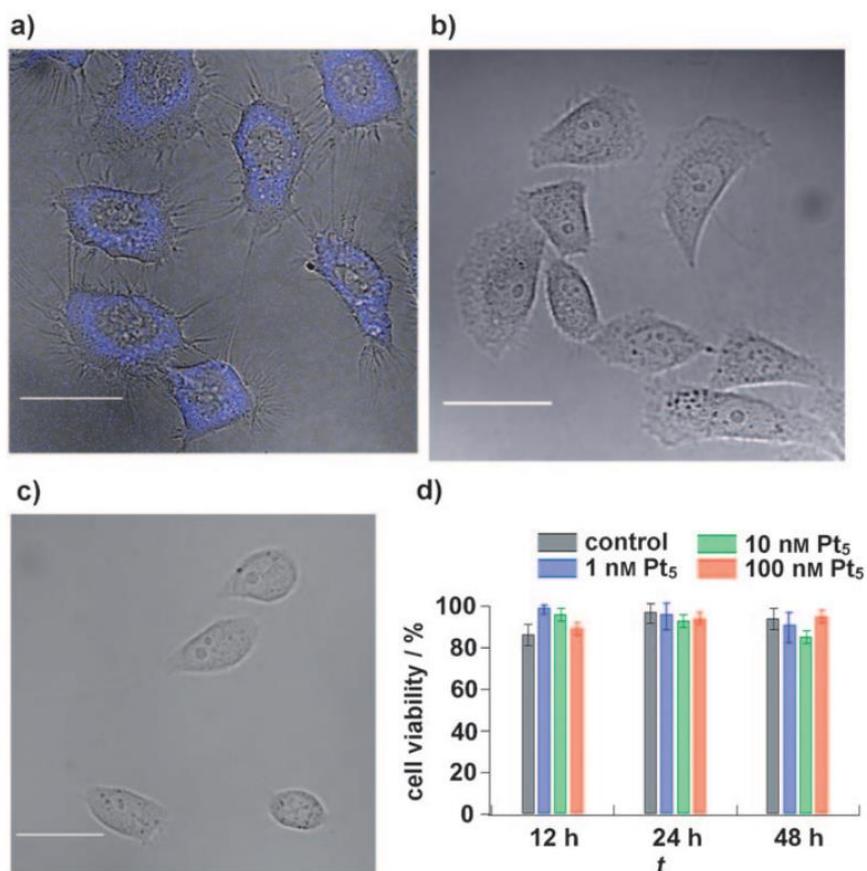


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal fusionadas con imágenes de microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) para células HeLa vivas marcadas, con (a) y sin (b) Pt5(MAA)8-(proteína A)-(anti-CXCR4-Ab). Para células CHO-K1 vivas marcadas con Pt5(MAA)8-(Protein A)-(anti-CXCR4-Ab) (c). Y estudio de la viabilidad celular de las células HeLa al ser incubadas con 1, 10 y 100nm de PtNCs a 37 °C (d). Figura extraída del artículo publicado por Tanaka, S. I. et al.²³. Ácido mercaptoacético (MAA).

Los NCs fluorescentes no solo sirven para realizar "bioimaging" en células tumorales, también se puede aplicar a muestras más complejas. Por ejemplo, Cruz-Alonso, M. et al.⁵⁴ han conseguido realizar un mapeado de la distribución de metalotioneína 1/2 (MT 1/2) y metalotioneína 3 (MT 3) en tejido ocular empleado AuNCs bioconjugados con anti-MT1/2 humana y con anti-MT3 humana, respectivamente. El "bioimaging" se realizó empleando LA-ICP-MS, el cual posee una elevada resolución lateral (5-10 μm)⁵¹. Cabe destacar que los resultados obtenidos mostraron una buena correlación con las técnicas tradicionales de inmunohistoquímica, por lo que la técnica LA-ICP-MS puede ser una alternativa muy eficaz frente a la inmunohistoquímica cuando se trata de realizar "bioimaging" de proteínas de manera cuantitativa⁵⁴.

2 Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster consiste en el desarrollo de una metodología de síntesis de PdNCs fluorescentes que puedan ser empleados como marcadores bimodales (detección por fluorescencia y espectrometría de masas elemental) para la determinación de proteínas en muestras de interés médico. Para ello se han fijado los siguientes objetivos parciales:

- Realizar una búsqueda bibliográfica en profundidad sobre MNCs con una baja polidispersidad y que sean fluorescentes, así como buscar diferentes metodologías de síntesis y aplicaciones.
- Seleccionar los reactivos a emplear durante el desarrollo experimental y conocer el manejo del equipamiento que va a ser utilizado en el laboratorio.
- Sintetizar PdNCs siguiendo metodologías propuestas en la bibliografía.
- Caracterización de los PdNCs sintetizados mediante medidas de fluorescencia y absorbancia.
- Optimizar la síntesis evaluando diferentes parámetros, como pueden ser el pH de la reacción o la temperatura.
- Realizar un estudio de la estabilidad de los PdNCs sintetizados.
- Caracterizar los PdNCs sintetizados en las condiciones óptimas empleando ICP-MS.

3 Metodología experimental

3.1 Materiales y reactivos

- Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L y 100 μ L, Eppendorf, Alemania.
- Amicon Ultra-0,5, membrana PLBC, 3 kDa, Millipore Amicon, Cork, Irlanda.
- Amicon Ultra-4, membrana PLBC, 3 kDa, Millipore Amicon, Cork, Irlanda.
- Cubeta de fluorescencia de cuarzo Suprasil de Hellma, modelo 114F-QS, Sigma*-Aldrich. Tiene un paso óptico de 10 mm y un volumen de cámara de 3 mL.
- Material genérico de laboratorio (pipetas Pasteur, viales, tubos Falcon, etc.).
- Ácido lipoico (pureza > 98%), Scross Organics; Bélgica.
- Hidróxido de sodio (pureza >98%), Sigma-Aldrich; USA.
- Tetracloropaladato de potasio (pureza > 99,99%), Sigma-Aldrich; USA.
- Borohidruro de sodio (pureza > 98%), Sigma-Aldrich; USA.
- Ácido Clorhídrico (pureza > 37%), VWR International; USA.
- Agua ultrapura Milli-Q.

3.2 Instrumentación

- Balanza analítica de precisión NewClassic MF, Mettler Toledo, Barcelona; España.
- Baño de Ultrasonidos, J.P. Selecta; España.
- pH-metro Crisol micropH 2000; Crisol Instruments S.A.; España.
- Espectrofotómetro Cary 60 UV-VIS, Agilent Technologies; USA.
- Espectrofluorímetro LS-50-B, Perkin Elmer; USA.
- ICP-MS modelo 7700, Agilent Technologies; USA.
- Centrífuga Gyrozen and Co.; República de Corea.
- Placa calefactora-agitadora, Fisher Scientific.

3.3 Síntesis de nanoclústeres de paladio

3.3.1 Síntesis de PdNCs empleando ácido lipoico como agente protector

En un vial protegido de la luz solar se disolvieron 0,0502 gramos de LA en 20 mL de agua a la cual se le habían añadido previamente 240 μ L de NaOH (2 M). El LA se disuelve bastante mal, por lo que fue necesario introducir el vial en un baño de ultrasonidos durante 10 min. Una vez que se hubo disuelto todo el LA se introdujo un agitador magnético en la disolución y se introdujo el vial en una nevera a 9°C que contenía una placa agitadora para que se produjera una agitación constante. Transcurridos 10 min se añadieron, gota a gota y con agitación, 1 mL de una disolución de K_2PdCl_4 (0,0254 g K_2PdCl_4 y se llevó a 5,04 g con agua). Se dejó agitando durante 15 min.

A continuación, se prepararon 2 mL de una disolución acuosa que contenía 0,0067 g de $NaBH_4$. Dicha disolución se añadió muy lentamente (una gota cada 5 s) con ayuda de una jeringuilla. Finalmente se dejó la mezcla reaccionando y se tomaron alícuotas a diferentes horas (pasadas 15 h, 21 h y 24 h), las alícuotas se conservaron a 9°C. La relación molar utilizada en este caso fue de 1:16:12 (K_2PdCl_4 :LA: $NaBH_4$).

Siguiendo un protocolo similar, se preparó otra síntesis a temperatura ambiente (en lugar de 9°C) y un blanco, el cual no contenía K_2PdCl_4 .

3.3.2 Síntesis de PdNCs empleando DHLA como agente ligante

Se pesaron 0,0509 g de LA y se añadieron a un vial protegido de la luz solar que contenía 18 mL de agua y 240 μ L de NaOH (2 M). Al igual que en el caso anterior, fue necesario introducir el vial en un baño con ultrasonidos para que se disolviera mejor. Una vez disuelto se añadió un imán y se dejó agitando en una placa agitadora. Seguidamente se preparó una disolución de $NaBH_4$ (1,14 M), e inmediatamente se añadieron 2 mL de dicha disolución al vial y se mantuvo la agitación durante 2 h. Todo este proceso se realizó tres veces, habiéndose utilizado en todos los casos una relación molar LA: $NaBH_4$ de 1:10 en los tres casos.

Una vez pasadas las 2 h se procedió a añadir, lentamente y con agitación, 1 mL de una disolución de K_2PdCl_4 (0,0259 g K_2PdCl_4 y se llevó a 5,08 g con agua). En dicho momento la disolución, que antes era transparente, se tornó de un color muy oscuro. Para finalizar, se añadieron lentamente y con agitación, 2 mL de $NaBH_4$ (64 mM) (relación molar K_2PdCl_4 : $NaBH_4$

1:10) a uno de los viales y 2 mL de NaBH₄ (32 mM) (relación molar K₂PdCl₄:NaBH₄ 1:5) a otro. Al tercero de ellos no se le añadió más NaBH₄ que el que se adicionó para reducir el LA. Se tomaron alícuotas a las 15 h y a las 21 h de haber añadido el NaBH₄.

La relación molar empleada en este caso fue de 1:10 (LA:NaBH₄) y 1:16 (K₂PdCl₄:DHLLA).

3.3.3 Purificación de los nanoclústeres de paladio

Una vez finalizada la síntesis se procedió a la purificación de los PdNCs, separando así los NCs del exceso de agente protector y del NaBH₄ que quedasen sin reaccionar, así como de posibles subproductos de la síntesis. Esto se llevó a cabo mediante ultrafiltración por centrifugación, empleando amicones de 0,5 mL o 4 mL con un tamaño de poro de 3 kDa. Para el proceso de purificación se siguió la siguiente secuencia:

1. Un ciclo a 5300 rpm durante 10 min.
2. Un ciclo de lavado (añadiendo agua Milli-Q) a 5300 rpm durante 10 min.
3. Un ciclo a 5300 rpm durante 10 min para reducir el volumen.

Una vez purificado se llevó la disolución purificada de PdNCs al volumen inicial empleando agua Milli-Q.

4 Resultados y discusión

Los PdNCs sintetizados según los procedimientos descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2. del Experimental, se caracterizaron mediante espectroscopía de fluorescencia y Vis-UV, empleando además DLS para comprobar su tamaño y polidispersidad. Además, también se midió el pH y se tomaron fotografías de las síntesis a diferentes horas, para poder observar cómo variaba el color con el tiempo.

4.1 Caracterización de los PdNCs sintetizados empleando ácido lipoico

Las condiciones en las que se realizó la síntesis estaban basadas en las utilizadas por Elías Milla, F.⁵⁵. A diferencia de lo recogido en dicho trabajo, en el presente TFM se realizó la síntesis tanto a temperatura ambiente como a 9°C, tomándose alícuotas a las 15 h, a las 21 h y a las 24 h. A continuación, se muestra el pH de cada una de las alícuotas recogidas, así como el pH inicial de la síntesis (antes de añadir el NaBH₄):

- pH = 12,18 para la síntesis a temperatura ambiente antes de añadir el NaBH₄.
- pH = 12,10 para la síntesis a temperatura ambiente a las 15 h.
- pH = 12,15 para el blanco a las 15 h.
- pH = 12,20 para la síntesis a 9°C a las 21 h.
- pH = 12,14 para la síntesis a temperatura ambiente a las 21 h.
- pH = 12,19 para el blanco a las 21 h.
- pH = 12,21 para la síntesis a 9°C a las 24 h.
- pH = 12,18 para la síntesis a temperatura ambiente a las 24 h.
- pH = 12,32 para el blanco a las 24 h.

A la vista de los resultados, no parece haber diferencias significativas en el pH durante el transcurso de la síntesis. También se tomaron fotografías a diferentes tiempos de reacción de la síntesis que se dejó reaccionando a temperatura ambiente. Dichas imágenes se muestran en la figura 11.

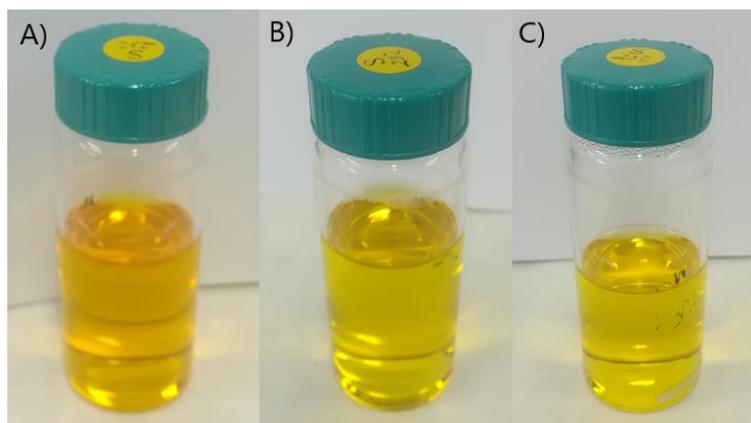


Figura 11. Fotografías de las disoluciones de síntesis justo después de añadir el K_2PdCl_4 (A), a los 40 min de haber añadido el $NaBH_4$ (B), habiendo transcurrido 15 h (c).

Se puede observar que antes de añadir el $NaBH_4$ la disolución tiene un color relativamente intenso y que después de añadir el $NaBH_4$ la disolución se vuelve menos coloreada. El color no parece variar de manera significativa cuando se mantuvo reaccionando durante 15 h.

A continuación, se realizaron los espectros de absorbancia de las diferentes alícuotas recogidas. La síntesis era bastante coloreada, por lo que el primer paso fue estudiar diferentes diluciones, decidiendo que se consideraría que la óptima sería aquella en la que se vieran correctamente el máximo número de bandas posibles. Para ello se realizó el espectro de absorbancia para la síntesis sin purificar realizada a $9^\circ C$ habiendo transcurrido 15 h desde el comienzo de la reacción. En este caso se estimó que la dilución más adecuada para trabajar era la dilución 1:20, por lo que se decidió emplear dicha dilución para el resto de las medidas.

En la figura 12 se muestran los espectros realizados para las síntesis purificadas (tanto la realizada a temperatura ambiente como a $9^\circ C$), para los desechos, para las síntesis sin purificar, para el blanco, y para una disolución de K_2PdCl_4 (misma concentración que en la síntesis).

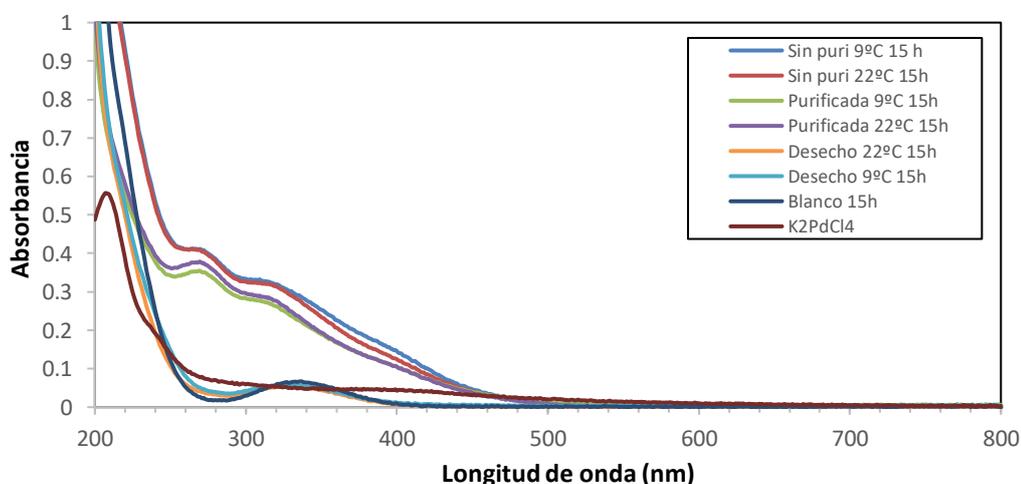


Figura 12. Espectros de absorbancia obtenidos (empleando una dilución 1:20) para las síntesis, los desechos y el blanco, habiendo transcurrido 15 h desde la adición del $NaBH_4$.

Se puede observar que tanto el blanco como el desecho tienen una banda a 330 nm, correspondiente al LA. También se puede observar que la síntesis muestra un espectro de absorbancia claramente diferenciado del blanco y de la disolución de K_2PdCl_4 , observándose un pico a 270 nm y otro a 315 nm. También cabe resaltar que el espectro de la síntesis sin purificar es muy similar al obtenido para la síntesis purificada, siendo la única diferencia que la síntesis purificada posee una absorbancia ligeramente inferior, que podría atribuirse a que al no poseer LA (o bien a que el rendimiento de la purificación no fue perfecto habiéndose podido quedar PdNCs retenidos en el filtro).

También se realizaron los espectros de absorbancia para las alícuotas extraídas a las 21 h y a las 24 h. A modo de poder comparar mejor los resultados se ha decidido elaborar la figura 13, en la cual se comparan los espectros de absorbancia obtenidos para todas las síntesis, habiéndose utilizado una dilución 1:20 en todos los casos.

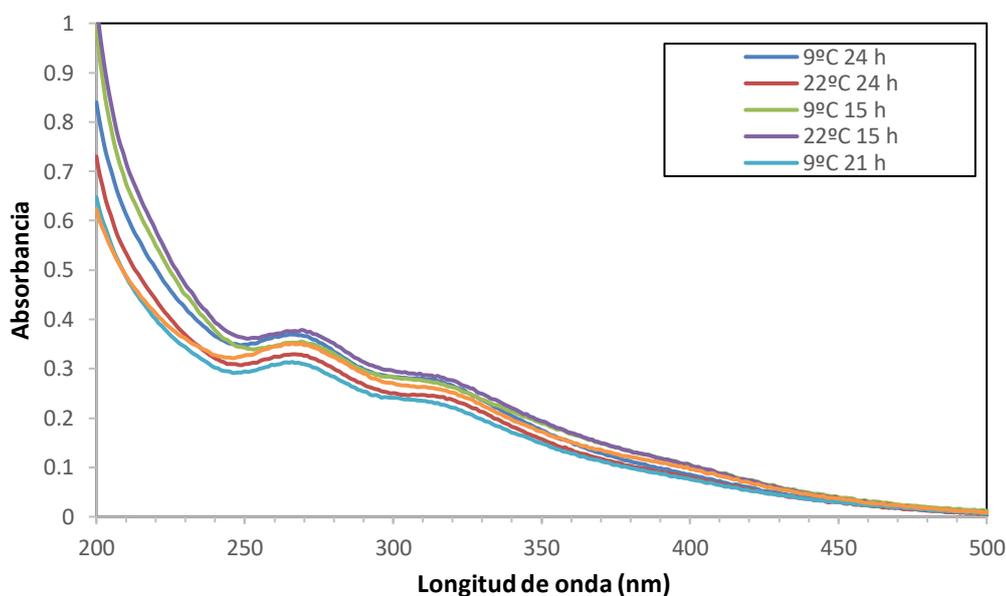


Figura 13. Espectros de absorbancia obtenidos para la síntesis realizada a 9°C y para la realizada a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C).

Como se puede apreciar en la figura, no parece haber diferencias entre la síntesis realizada a 9 °C y la realizada a temperatura ambiente. Tampoco parece haber diferencias significativas cuando se comparan las alícuotas extraídas a diferente tiempo de reacción. Lo único destacable es que la absorbancia es ligeramente mayor para las alícuotas extraídas a las 15 h de haberse iniciado la reacción.

Un detalle interesante es que se puede apreciar que a longitudes de onda inferiores a 230 nm la síntesis a 22°C para un tiempo de reacción de 21 h es la que menos absorbe. Sin embargo, a partir de ahí su intensidad aumenta ligeramente hasta situarse en un valor promedio entre el resto de las síntesis: el pico de 270 nm es más pronunciado que en los otros casos.

También se realizaron espectros de emisión y de excitación tanto del blanco como de las diferentes síntesis (15 h, 21 h y 24 h tanto para la síntesis a 9 °C como para la realizada a 22°C). Para poder realizar la mayor cantidad de espectros en el menor tiempo posible se probó un modo denominado “3D”, en el cual se selecciona una λ_{ex} inicial (en este caso 250 nm), el rango en el que se desea recoger el espectro de emisión (entre 280 nm y 800 nm), cada cuantos nm se realiza el espectro (25 nm) y hasta que λ_{ex} se realiza la excitación (hasta 575 nm). Se encontró que cuando se excitaba a 375 nm aparecía una meseta entre el Raman del agua (que excitando a 375 nm se produce a 434 nm) y 570 nm. Dicho espectro se muestra en la figura 14.

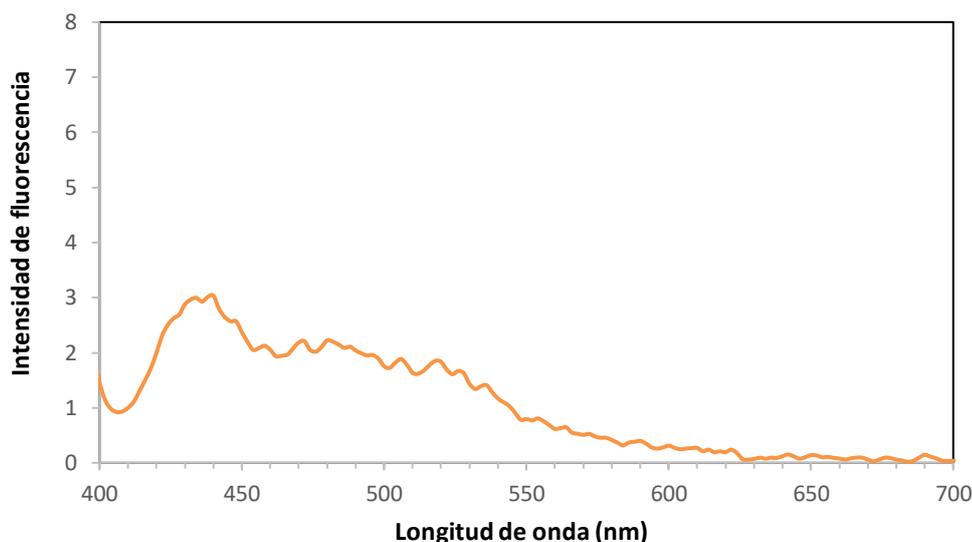


Figura 14. Espectro de emisión para la síntesis a 9 °C (purificada y sin diluir) correspondiente a la alícuota tomada a las 24 h.

A raíz este resultado se decidió realizar el espectro de emisión del blanco y del desecho, excitando a 375 nm. En ninguno de los dos se encontró ninguna banda en la región cercana a 500 nm. A continuación, se decidió repetir los espectros 3D realizados, empleando diferentes diluciones. Sin embargo no se observó ninguna diferencia significativa.

En este caso también se caracterizaron los PdNCs sintetizados empleando la técnica DLS. Los resultados obtenidos mostraron no contenía NCs sino partículas de gran tamaño (aproximadamente 160 nm de diámetro hidrodinámico) con un índice de polidispersidad bastante alto. Además, según el equipo, los resultados obtenidos eran poco fiables y esto podría deberse a la presencia de sedimentos o de partículas de gran tamaño. En la figura 15 se muestra la distribución en número y el correlograma que se obtuvieron empleando una alícuota de la síntesis a 9°C (extraída a las 21 h) y con dilución 1:8. También se midió la síntesis realizada a 22°C y se probaron diferentes diluciones. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los recogidos en la figura 15 para la síntesis a 9°C.

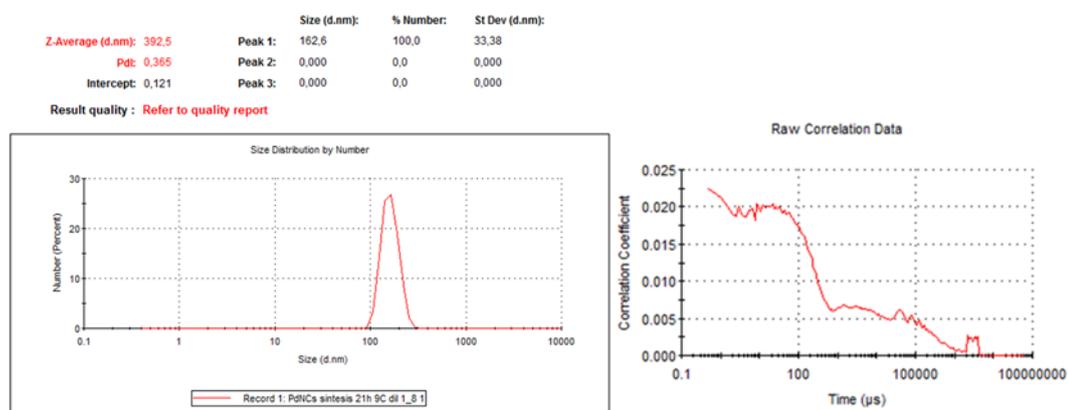


Figura 15. Distribución en número y correlograma obtenidos para la síntesis a 9°C (habiendo estado reaccionando durante 21h) y empleando una dilución 1:8.

A raíz de los resultados obtenidos se decidió variar la síntesis y reducir previamente el agente ligante (el LA pasaría a DHLA) empleando NaBH_4 . Esto se realizó con el objetivo de que el DHLA tuviera una mayor afinidad por el paladio que el LA.

4.2 Caracterización de los PdNCs sintetizados empleando DHLA como ligando

De manera similar a lo que se hizo empleando el LA como ligando, se midió el pH de las disoluciones en diferentes momentos. En este caso se comprobó el valor de pH, a los 15 min de haber añadido el NaBH_4 , se observándose los siguientes valores:

- Añadido una relación de 1:10 ($\text{K}_2\text{PdCl}_4:\text{NaBH}_4$) \rightarrow pH de 11,49
- Añadido una relación de 1:15 ($\text{K}_2\text{PdCl}_4:\text{NaBH}_4$) \rightarrow pH de 11,58
- Sin añadir más NaBH_4 \rightarrow pH de 11,55

También se comprobó el pH una vez transcurridas 21 h, obteniéndose un pH de 11,61 para la síntesis a la que se le añadió NaBH_4 en relación 1:10, pH=11,68 para la que se adicionó NaBH_4 en proporción 1:5 y pH=11,64 para la síntesis que no se introdujo más NaBH_4 . Además, se tomaron fotografías a diferentes tiempos de reacción, las cuales se muestran en la figura 16.

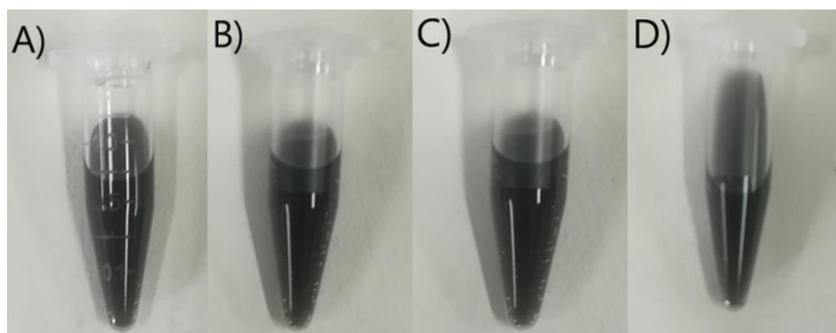


Figura 16. Fotografías de la alícuota extraída justo después de añadir la sal de paladio (A), alícuota extraída 15 h después de añadir NaBH_4 en relación 1:10 (B), alícuota extraída 15 min después de añadir NaBH_4 en relación 1:5 (c), y alícuota extraída de la síntesis a la que no se le añadió más NaBH_4 (d).

Se puede observar que la disolución de LA junto con NaBH_4 se tornó de un color negro nada más que se añadió la sal de paladio (antes era transparente), lo que parece indicar que el NaBH_4 no se había consumido completamente con la reducción del LA. Otro dato interesante es que el color no varió después de añadir más NaBH_4 , lo que parece indicar que todavía quedaba mucho NaBH_4 sin reaccionar en el momento en el que se añadió la sal de paladio.

Las medidas de absorbancia se realizaron empleando una dilución 1:20, para poder compararlas con la síntesis anterior. Se midieron las síntesis sin purificar y purificadas. También se ha realizado el espectro de absorbancia para el blanco y para el desecho resultante de la purificación. Esto se realizó tanto para la síntesis a la que no se le añadió más NaBH_4 como para la que se adicionó NaBH_4 en relación 1:5 ($\text{K}_2\text{PdCl}_4:\text{NaBH}_4$). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17.

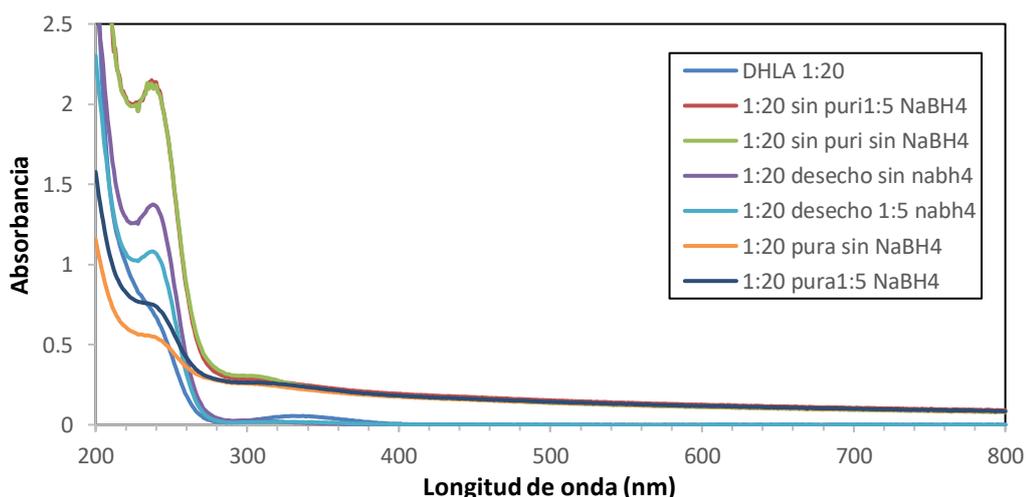


Figura 17. Comparación de los espectros de absorbancia (dilución 1:20 en todos los casos) obtenidos para la síntesis después de haber transcurrido 15 h con los obtenidos para el desecho, para el DHLA y para la síntesis sin purificar.

Se puede observar que el DHLA posee un pico a 330 nm (característico del LA), lo que parece indicar que el LA no se ha reducido completamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta

también que el DHLA tiene tendencia a reoxidarse a sí mismo mediante una reacción intramolecular para dar otra vez LA⁵⁶, por lo que no es descartable que el LA se hubiera reducido a DHLA, pero que al pasar varias horas en la nevera se haya convertido parcialmente de nuevo en LA. En lo referente a la síntesis, se puede ver que el pico a 240 nm que aparecía en la síntesis sin purificar también aparece en la síntesis purificada. Sin embargo, el pico se ha reducido drásticamente. Dicho pico también se observa en el desecho, lo que parece indicar que corresponde al DHLA o a un subproducto de la síntesis.

Los primeros espectros de fluorescencia se realizaron empleando el método 3D. Se encontró que se producía un pequeño pico cuando se excitaba a 375 nm. A continuación, se procedió a ensayar diferentes diluciones, encontrándose que la dilución 1:20 era la más adecuada. Finalmente se realizaron los espectros de fluorescencia tanto para la síntesis purificada a la que no se le añadió más NaBH₄, habiendo transcurrido 15 h desde el comienzo de la reacción, como para el blanco, obteniéndose los espectros que aparecen en la figura 18. Se puede observar que el pico que aparece a 520 nm en la síntesis purificada no aparece en el blanco, lo que parece indicar que no se debe al DHLA que pudiera quedar sin reaccionar.

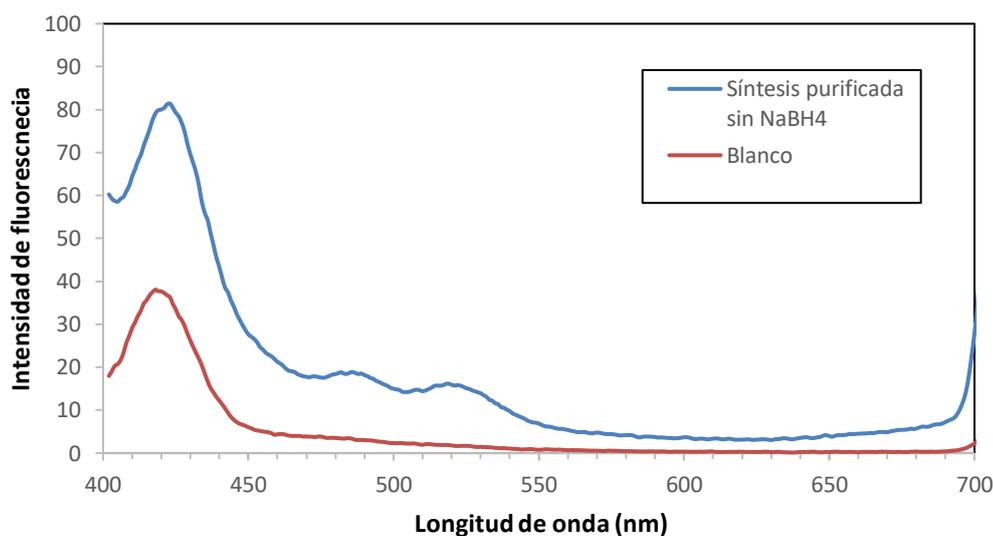


Figura 18. Espectros de emisión, excitando a 375 nm, para el blanco y para la síntesis purificada a la que no se le adicionó más NaBH₄, habiendo transcurrido 15 h. Ambos espectros se realizaron utilizando una dilución 1:20 con agua Milli-Q.

Los PdNCs sintetizados también se caracterizaron mediante DLS. Los resultados indicaban que se habían sintetizado partículas de aproximadamente 12 nm de diámetro hidrodinámico con una baja polidispersidad (< 0,3). Cabe resaltar que el diámetro medido mediante DLS es el tamaño hidrodinámico y no el tamaño del núcleo metálico, el cual será notablemente inferior. Aun así, parece ser que no se han sintetizado PdNCs sino PdNPs de pequeño tamaño.

4.3 Optimización de las relaciones molares de reactivos empleadas en la síntesis de PdNCs

La proporción metal-ligando-reductor que se emplea en la síntesis suele tener una elevada influencia tanto en el tamaño del núcleo metálico como en el tamaño de los NCs sintetizados³⁶. De este modo, en una segunda etapa se decidió estudiar diferentes relaciones molares tanto de la sal precursora y el ligando (K_2PdCl_4 /DHLA) como del ligando con el agente reductor (LA/ $NaBH_4$). En concreto se decidió estudiar la reducción del LA utilizando diferentes relaciones molares de LA: $NaBH_4$ (1:2,5, 1:5, 1:7,5 y 1:10) y se estudiaron dos proporciones de DHLA respecto al K_2PdCl_4 (1:16 y 1:8).

Las síntesis se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2, sin embargo, se modificaron las cantidades añadidas debido a que se realizaron en tubos de plástico. En lugar de los 23 mL iniciales se prepararon 11,5 mL. También se realizó un blanco utilizando una relación molar de 1:16 (K_2PdCl_4 :DHLA) y 1:10 (LA: $NaBH_4$).

En la figura 19 se muestra una fotografía en la que aparecen tanto el blanco como las síntesis realizadas, habiendo transcurrido 15 h desde el comienzo de la reacción. También se muestra una toma cenital, de modo que se puedan identificar cada una de las síntesis.

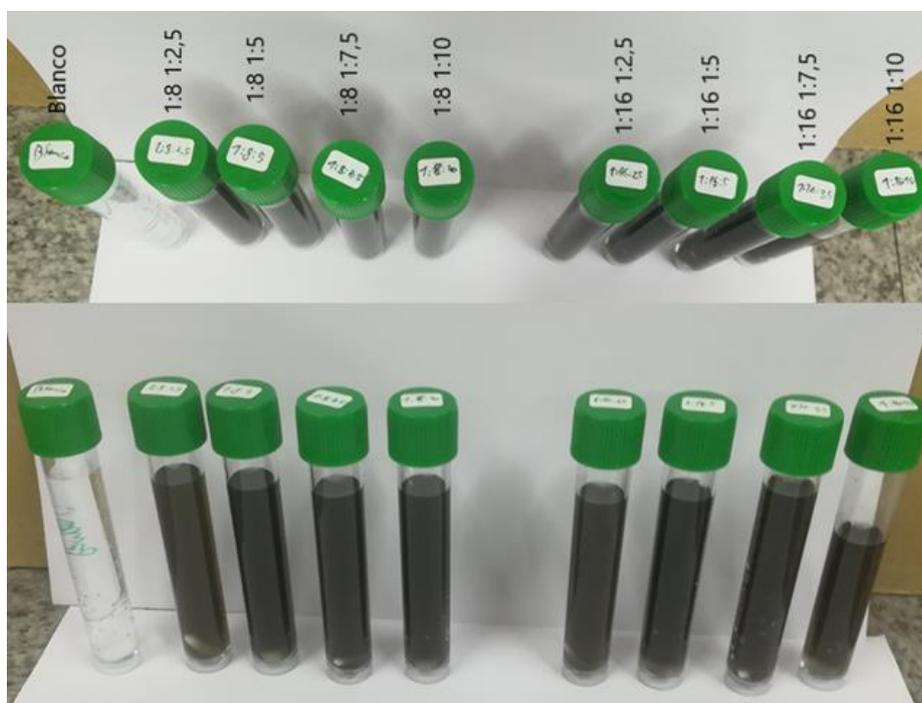


Figura 19. Imagen tomada para el blanco (a la izquierda) y las diferentes síntesis, ordenadas según se indica en el plano cenital (imagen superior donde se recogen las relaciones molares de sal de paladio:LA: $NaBH_4$).

En la figura se puede apreciar que todas las disoluciones tienen un color oscuro y que las disoluciones preparadas empleando una relación molar 1:2,5 de LA/NaBH₄ están menos coloreadas. Así mismo no se puede apreciar que el blanco haya cambiado de color (sigue transparente). Por otro lado, la síntesis con una proporción 1:16 (K₂PdCl₄:DHLA) y 1:10 (LA:NaBH₄) tiene menos volumen. Esto es debido a que se sacó una alícuota para medir el pH, el cual resultó ser de 11,46.

Las síntesis se caracterizaron mediante espectroscopía de absorción Vis- UV. En este caso se ha decidido utilizar la dilución 1:20 para poder comparar los espectros obtenidos con los de la síntesis recogida en el apartado anterior. En la figura 20 se compara el espectro de absorbancia obtenido para la síntesis purificada que posee una relación molar 1:8 (K₂PdCl₄:DHLA) y 1:2,5 (LA:NaBH₄) con los obtenidos para el blanco y el desecho. También se muestra el espectro de absorbancia obtenido para la síntesis empleando DHLA que se realizó anteriormente.

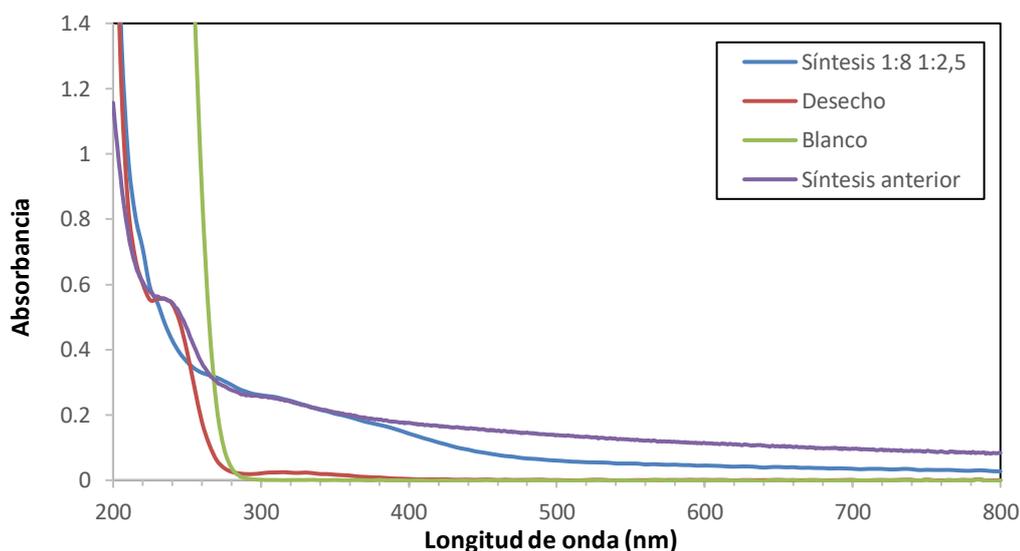


Figura 19. Espectros de absorbancia para la síntesis purificada con relación molar 1:8 – 1:2,5 (K₂PdCl₄:DHLA - LA:NaBH₄), para el blanco, para el desecho y para la síntesis realizada anteriormente, con relación molar 1:16 – 1:10 (K₂PdCl₄:DHLA - LA:NaBH₄).

En el espectro se puede observar que la síntesis no presenta el pico correspondiente al DHLA que presenta tanto el blanco (se sale de la escala) como el desecho. Para el caso del desecho el pico es bastante pequeño, lo que parece indicar que la mayor parte del DHLA inicial formó una capa protectora alrededor de los NCs sintetizados. Así mismo también se puede apreciar en el desecho un pequeño pico a 330 nm, que es donde absorbe el LA. Este hecho podría atribuirse a que el DHLA presente en la síntesis se ha reoxidado para dar lugar a LA. Este hecho no ocurre en el blanco, cuya concentración de NaBH₄ inicial era 8 veces superior.

Si se compara el espectro resultante para la síntesis purificada con el que se realizó para la primera síntesis en la que se empleó DHLA como ligando (líneas azul y morada en la figura 19,

respectivamente) se puede observar como el pico que antes aparecía a 240 nm (debido al DHLA) ahora no aparece. Esto puede deberse a que la proporción de DHLA respecto a la sal de paladio es menor en la síntesis actual (antes era una relación 16:1 y ahora 8:1). También se puede apreciar que el espectro entre 270 nm y 370 nm es prácticamente el mismo en ambas síntesis. A partir de ahí la síntesis purificada absorbe menos, lo que puede deberse a que su color era menos intenso. Adicionalmente en la figura 20 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos para las otras síntesis tras 5 días almacenadas en la nevera, a 6°C y sin acción de la luz solar, junto con el del blanco y el de la síntesis purificada que se había medido con anterioridad.

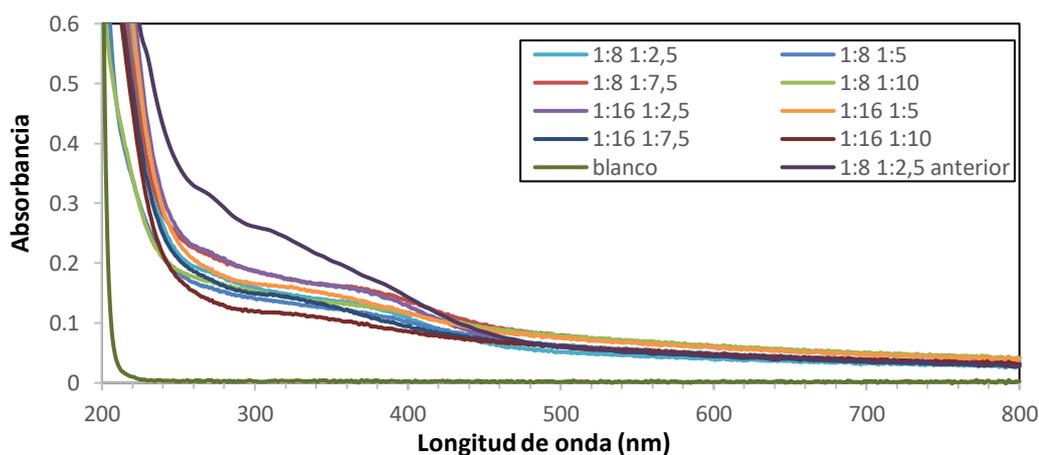


Figura 20. Espectro de absorbancia obtenidos para cada una de las síntesis purificadas, así como para el blanco y para la síntesis que se caracterizó anteriormente. En la leyenda de la figura se recogen las relaciones molares empleadas para la sal de paladio:DHLA y LA:NaBH₄.

En el espectro se puede observar que la absorbancia obtenida es notablemente inferior en la síntesis con proporción 1:8 y 1:2,5 (K₂PdCl₄:DHLA y LA:NaBH₄, respectivamente) que cuando se había caracterizado hace 5 días, lo que podría indicar que los PdNCs se han degradado parcialmente. También se pueden observar diferencias entre las síntesis. Por ejemplo, se puede apreciar que las síntesis que emplean una proporción 1:16 - 1:10 y 1:16 - 1:7,5 absorben menos que el resto, es decir, aquellas en las que se añadió mayor cantidad de NaBH₄. Las síntesis que poseen una mayor absorbancia son las que se corresponden con las proporciones 1:16 - 1:2,5 y 1:8 - 1:7,5 (K₂PdCl₄:DHLA - LA:NaBH₄).

A continuación, se caracterizaron los PdNCs sintetizados mediante espectroscopía de fluorescencia. Lo primero que se hizo fue realizar un espectro 3D para comprobar si se producía algún pico, empleando para ello la síntesis sin purificar con unas relaciones molares de 1:16 (K₂PdCl₄:DHLA) y 1:10 (LA:NaBH₄). Al igual que en las síntesis anteriores aparecía un pequeño pico a 525 nm cuando se excitaba a 375 nm. El siguiente paso fue estudiar diferentes diluciones, lo cual se muestra en la figura 21.

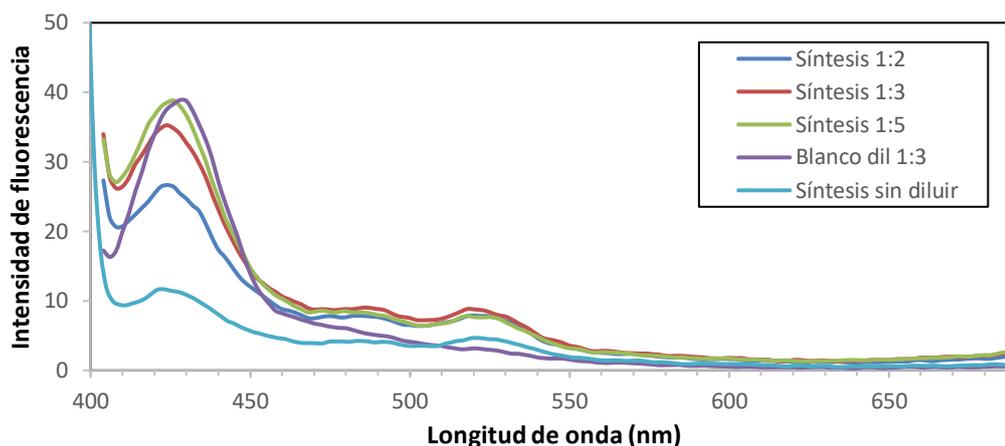


Figura 21. Espectros de emisión obtenidos excitando a 375 nm para la síntesis con una relación molar 1:16 (K_2PdCl_4 :DHLA) y 1:10 (LA: $NaBH_4$), estudiando diferentes diluciones (1:2, 1:3 y 1:5).

Como se muestra en los espectros, el pico que aparece a 425 nm es debido al Raman. También se puede observar que en las síntesis aparece un pico a 520 nm, el cual es más intenso cuando se le aplica una dilución 1:3. Cabe resaltar que dicho pico no se observó en el blanco cuando se midió con una dilución 1:3.

Para finalizar se realizaron medidas para todas las síntesis purificadas, con una dilución 1:3. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22.

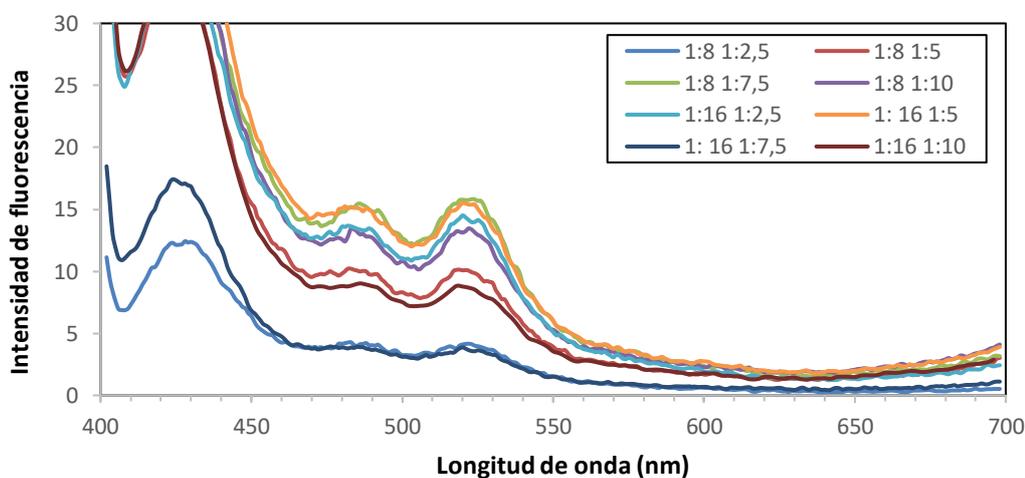


Figura 22. Espectros obtenidos excitando a 375 nm para las diferentes síntesis purificadas y diluidas 1:3 con agua Milli-Q. En la leyenda de la figura se recogen las relaciones molares empleadas para la sal de paladio:DHLA y LA: $NaBH_4$.

Los resultados experimentales muestran que todas las síntesis presentan un pico a 520 nm. También se puede observar que la síntesis que corresponde a una proporción 1:16 - 1:7,5 (K_2PdCl_4 :DHLA - LA: $NaBH_4$) y en la que se empleó una relación molar 1:8 - 1:2,5 tienen una intensidad de emisión bastante inferior al resto. Cabe resaltar que la síntesis que posee una mayor intensidad de fluorescencia (además de una mayor absorbancia) es la que se empleó una relación

1:8 - 1:7,5. Por lo tanto, se ha considerado que estas relaciones molares eran las más adecuadas para estudios posteriores.

4.4 Estudio del efecto del pH de la síntesis en la formación de PdNCs

Finalmente se decidió estudiar cómo influía el pH en la síntesis en la formación de los PdNCs. Para ello se utilizó la relación molar que se había considerado óptima (1:8 K_2PdCl_4 :DHLA y 1:7,5 LA: $NaBH_4$) y se realizaron 3 síntesis con un pH diferente siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.3.2. Se preparó una síntesis añadiendo la misma cantidad de NaOH (pH = 11,97), otra en la que solo se añadieron 40 μ L de NaOH (pH = 10,01) y una última que se llevó a cabo a pH 7,83. Además, se preparó un blanco cuyo pH inicial era de 12,03. Se tomó una fotografía de las disoluciones una vez transcurridas 15 h desde el inicio de la reacción, la cual se muestra en la figura 23.

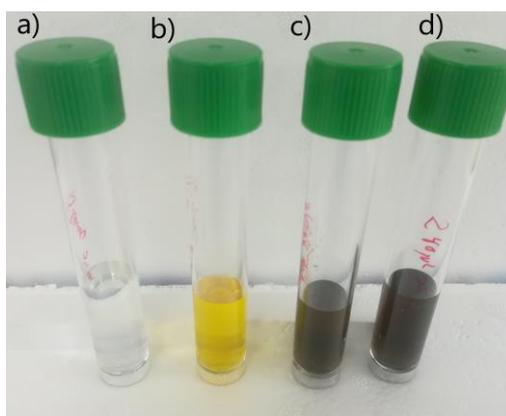


Figura 23. Fotografías de diferentes síntesis de PdNCs: blanco (a), síntesis a pH 7,83 (b), síntesis a pH 10,01 (c) y síntesis a pH 11,97 (d) una vez pasadas 15 h.

Se puede observar que la síntesis realizada a pH 11,97 tiene un color marrón oscuro y que la síntesis cuyo pH era de 10,01 presenta el mismo color, aunque un poco menos intenso. También se puede apreciar que la síntesis realizada a pH 7,83 presenta un color amarillo (muy similar al obtenido para la síntesis en la que se utilizó LA como ligando) y que la disolución del blanco es transparente.

Las diferentes síntesis se caracterizaron mediante espectroscopía de absorbancia Vis-UV. En esta ocasión las medidas se realizaron empleando una dilución 1:10 en lugar de 1:20 (con 1:20 no se observaban correctamente las bandas). En la figura 24 se muestran los espectros obtenidos para las síntesis purificadas, los desechos resultantes de la purificación y el blanco. También se muestra el espectro realizado para la síntesis en la que se había empleado LA como ligando.

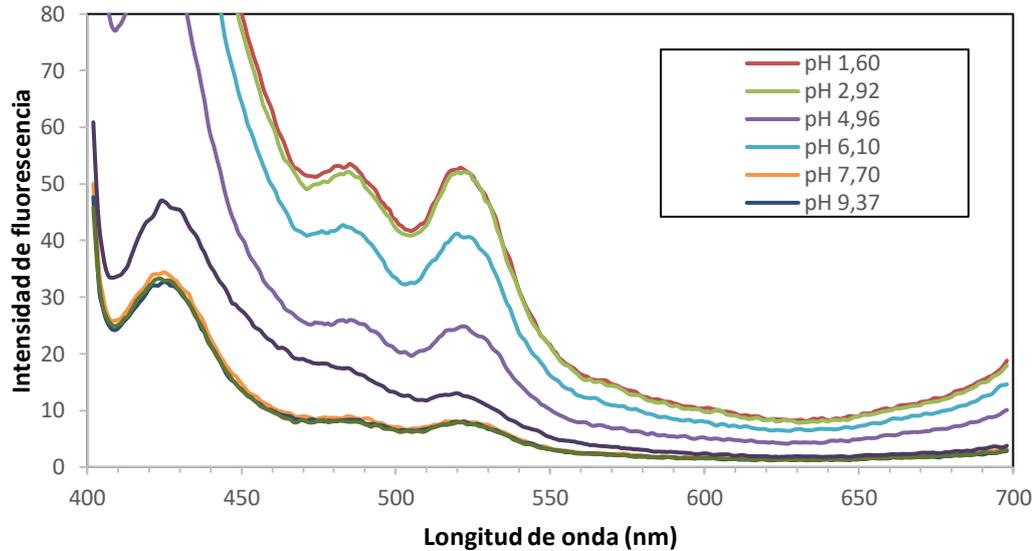


Figura 25. Espectros de emisión obtenidos ajustando el pH de las disoluciones antes de medir la fluorescencia para la síntesis que se realizó a pH 11,96 (dilución 1:3).

A la vista de los resultados experimentales se puede discernir que a pH básico apenas hay emisión fluorescente y ésta comienza a aumentar significativamente cuando se reduce el pH de la disolución. Se observa que la emisión es máxima para los pH de 1,60 y 2,92.

Seguidamente se estudió la fluorescencia del blanco al variar el pH de la disolución. Como se puede observar en la figura 26 (espectros de emisión obtenidos excitando a 375 nm y empleando una dilución 1:3) la emisión del blanco es prácticamente nula y no se aprecian diferencias significativas al variar el pH.

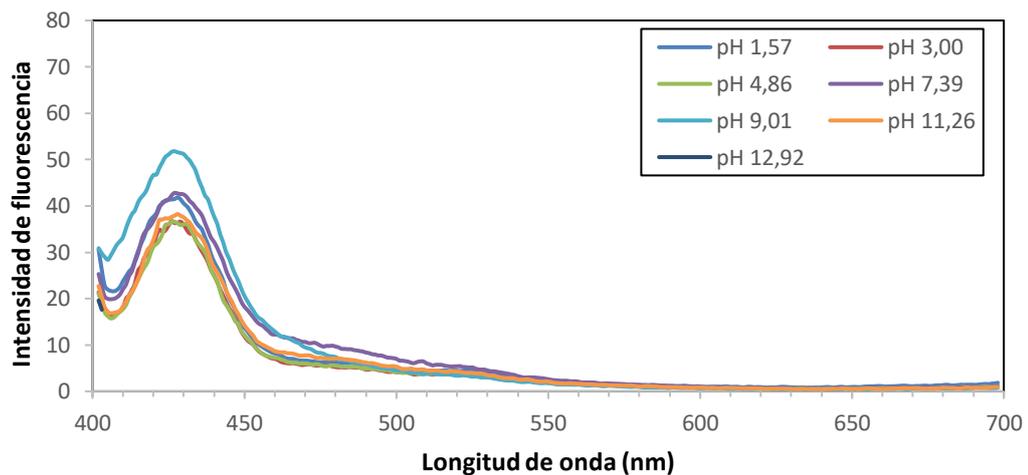


Figura 26. Espectros de emisión obtenidos para el blanco ajustando el pH de las disoluciones antes de medir la fluorescencia (dilución 1:3).

Para poder comparar mejor los resultados se ha realizado un gráfico de barras en el que se compara la emisión a 520 nm del blanco y de la síntesis de PdNCs a cada uno de los pH ensayados (figura 27).

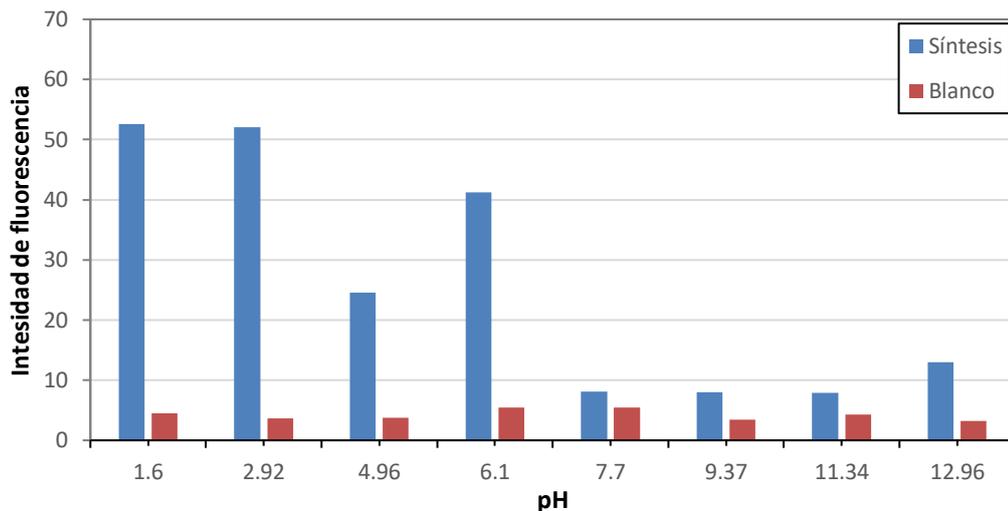


Figura 27. Intensidad de fluorescencia de las disoluciones de PdNCs y los blancos a diferentes valores de pH (dilución 1:3).

Se puede comprobar que a pH ácidos es donde la fluorescencia de los PdNCs es mayor. Sin embargo, pH tan ácidos (inferiores a 3) no son los más adecuados para trabajar con muestras biológicas, en donde las disoluciones tampón utilizadas suelen tener un pH de entre 6 y 8. Por lo tanto se ha decidido considerar el pH 6 como el más adecuado para trabajar con las disoluciones de PdNCs

Finalmente se realizaron los espectros de excitación para las síntesis llevadas a cabo a pH 10,01 y pH 7,83. En ambos casos los espectros se realizaron empleando una dilución 1:3 y ajustando el pH a 6. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28.

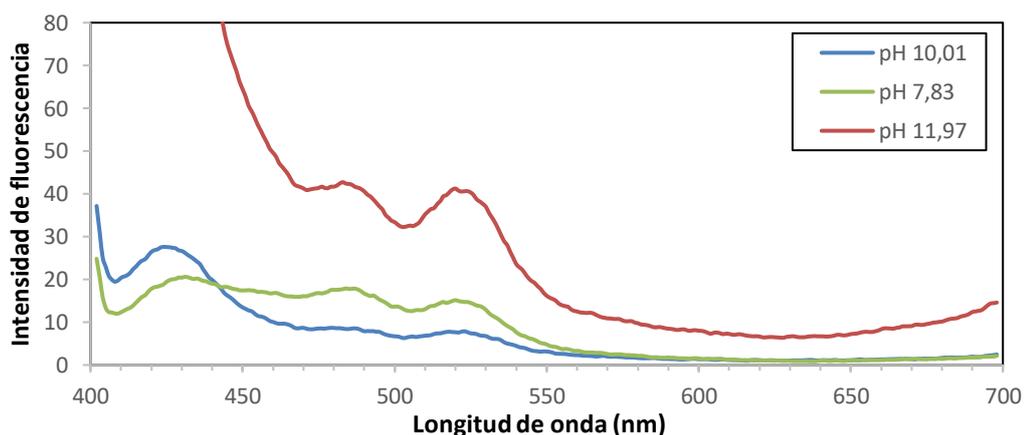


Figura 28. Espectros de emisión para las síntesis de PdNCs realizadas a diferentes valores de pH empleando una dilución 1:3 y ajustando el pH a 6 para la medida de la fluorescencia

En la figura 28 se puede apreciar que la síntesis que fue realizada a pH 11,97 es la que posee una mayor intensidad de emisión (excitación a 375 nm) y que la realizada a pH 10,01 es la que muestra una menor intensidad de fluorescencia. Además, cabe resaltar que el espectro de emisión obtenido para la síntesis realizada a pH 7,83 es un poco diferente de los otros dos: se

puede observar una meseta entre 430 nm (el Raman) y 530 nm, lo que podría indicar que los PdNCs sintetizados tienen una mayor polidispersidad o que tienen un mayor tamaño (no serían PdNCs sino PdNPs).

Por otro lado, es importante resaltar que las diferencias observadas entre las síntesis realizadas a diferentes pH, tanto en los espectros de absorción como en los de emisión, sugieren que los tamaños de los PdNCs sintetizados son diferentes. Para corroborar este hecho se caracterizaron las diferentes síntesis mediante DLS. En la figura 29 se muestra tanto la distribución en número como el correlograma obtenido para cada una de las síntesis de PdNCs.

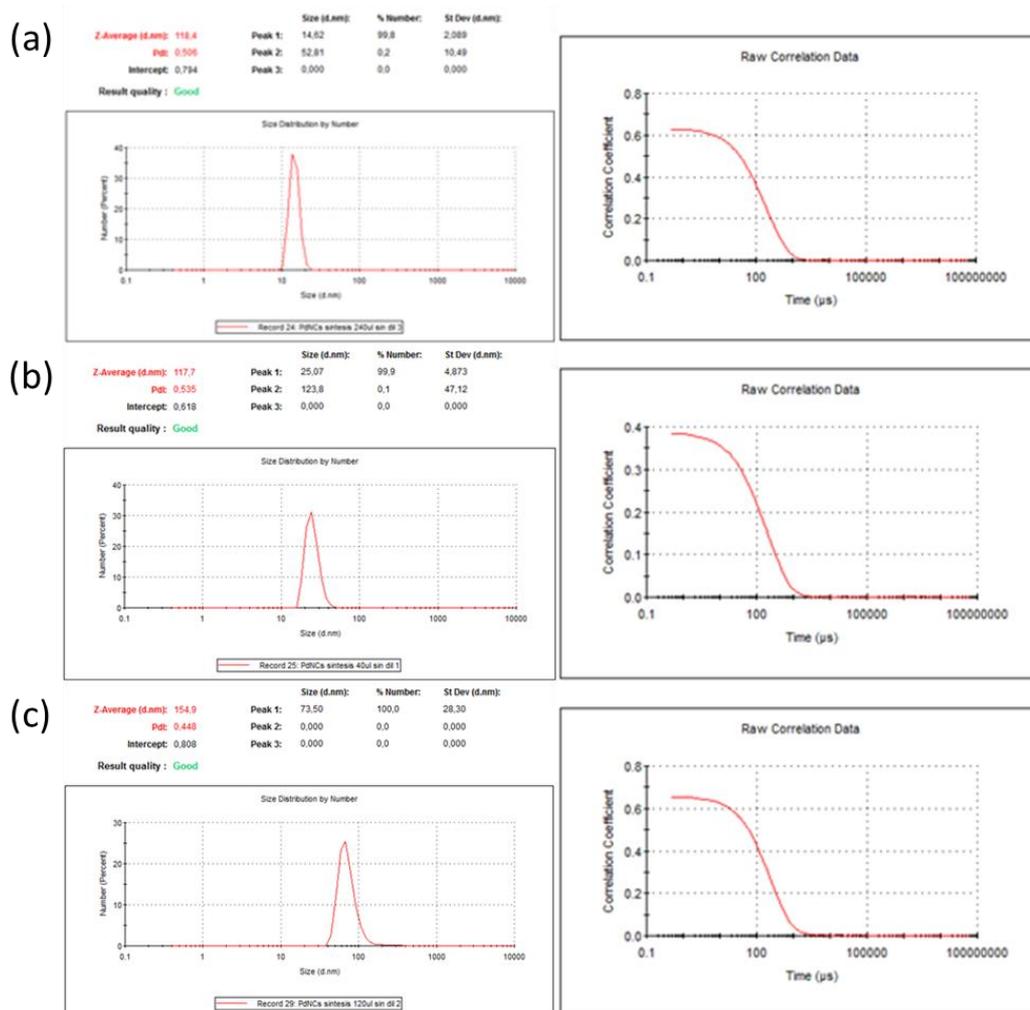


Figura 29. Análisis por DLS de las disoluciones de PdNCs donde se muestra la distribución en número y correlograma obtenidos para la síntesis realizada a pH 11,97 (a), pH 10,01 (b) y pH 7,83 (c).

En la figura 29 se puede observar que la síntesis realizada a pH 11,97 contiene partículas de aproximadamente 14 nm, lo cual es muy similar al diámetro de partícula obtenido para la primera síntesis en la que se empleó DHLA como ligando. También se puede apreciar que el diámetro de las partículas que se produjeron a pH 10,01 es de 25 nm, por lo que los hace

ligeramente mayores a los obtenidos en la síntesis realizada a pH 11,97. Así mismo las partículas sintetizadas a pH 7,83 también mostraron tener un mayor tamaño (aproximadamente 75 nm de diámetro). Los resultados experimentales obtenidos parecen indicar que la síntesis de PdNCs se ve favorecida cuanto más básico es el pH de la disolución de síntesis, formándose PdNPs en lugar de PdNCs cuando no se trabaja a pH muy básico.

4.4.1 Determinación del rendimiento de la síntesis empleando ICP-MS

Como última etapa, se decidió estudiar el rendimiento de cada una de las síntesis que se prepararon a pH 11,97, 10,01 y 7,83. Con este objetivo, se midieron por ICP-MS por nebulización convencional tanto las disoluciones de PdNCs/PdNPs purificadas como los desechos resultantes de la purificación. También se realizó la medida de una alícuota de la disolución madre de K_2PdCl_4 , a la cual se le realizó una dilución 1:23 con agua destilada para que tuviera la misma concentración que en la síntesis. El procedimiento seguido para preparar las disoluciones a medir por ICP-MS (purificación, digestión y dilución de las muestras) se recoge en la figura 30.

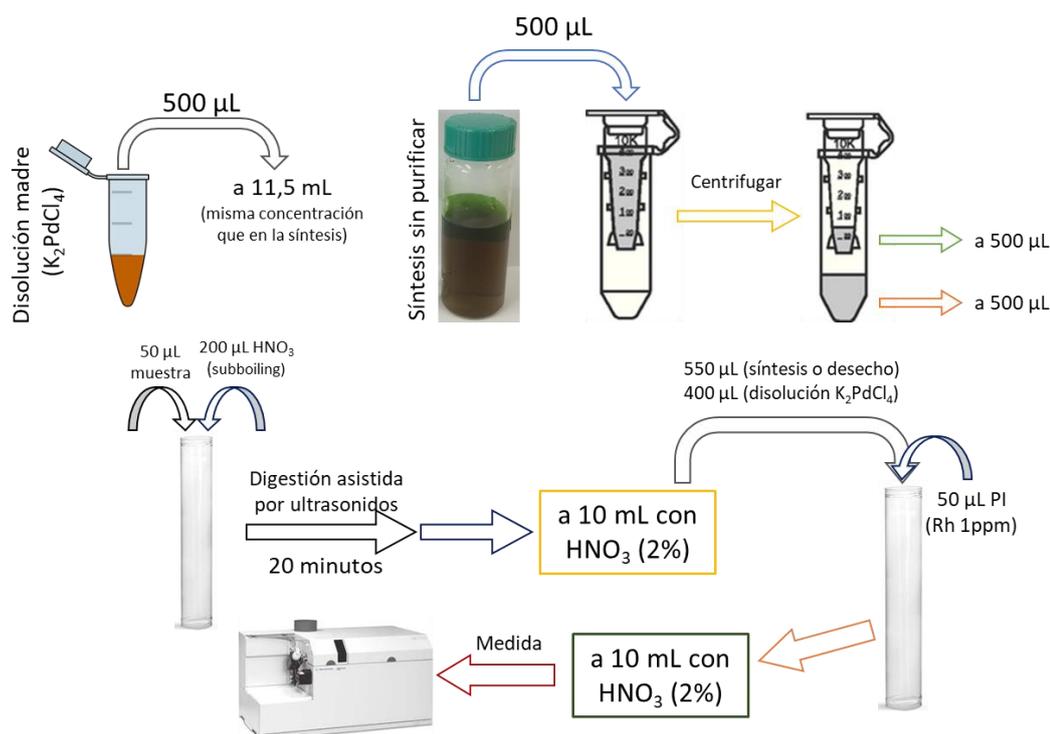


Figura 30. Esquema del procedimiento seguido para la purificación, digestión y dilución de las muestras para su análisis por ICP-MS.

Las diluciones de la disolución de la sal de Pd, así como de las disoluciones de PdNCs/PdNPs y el desecho se realizaron de tal manera que la concentración de Pd estuviera comprendida entre 0 y 30 ppb (rango seleccionado para el calibrado de Pd). Es importante

destacar que todas las diluciones se realizaron por pesada, de modo que se pudo calcular de manera exacta el rendimiento de las síntesis.

En primer lugar, se realizó la recta de calibrado por patrones externos, para lo cual se empleó Rh como patrón interno (se seleccionó Rh como patrón interno porque tiene un número másico y un potencial de ionización muy similares a los del Pd). Para ello se prepararon patrones que contenían 5 ppb de Rh y concentraciones crecientes de Pd (0 ppb, 1 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb y 30 ppb). La recta de calibrado obtenida se muestra en la figura 31.

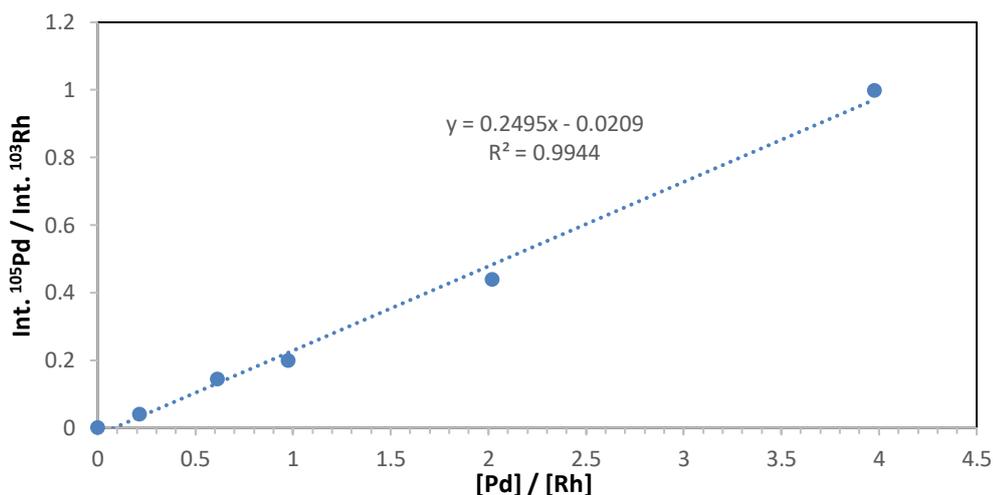


Figura 31. Recta de calibrado obtenida por ICP-MS para el Pd empleando ¹⁰⁵Rh como patrón interno.

Como se observa en la figura 31, la recta de calibrado obtenida para el Pd se ajusta correctamente a una línea recta con un buen coeficiente de correlación lineal. Así mismo cabe resaltar que se obtuvo un límite de detección de 0,014 ppb y un límite de cuantificación de 0,05 ppb. Seguidamente se midieron las diferentes disoluciones. Cabe resaltar que se realizó un blanco entre cada medida, para asegurar que no quedase nada de Pd que pudiera afectar a los resultados de la siguiente medida. También es importante resaltar que las concentraciones medidas en cada una de las diferentes muestras fueron en todo momento superiores al límite de cuantificación. En la Tabla 4 se recoge el rendimiento obtenidos para cada una de las disoluciones.

Tabla 4. Rendimiento de las síntesis realizadas a diferentes pH y del desecho de estas.

Medida	Síntesis purificada (mM)	Desecho (mM)	Síntesis purificada (% Pd)	Desecho (% Pd)
Síntesis pH 7,83	0,345	0,005	73,3	1,1
Síntesis pH 10,01	0,431	0,009	89,4	1,8
Síntesis pH 11,97	0,377	0,013	78,1	2,7

Se puede observar que los rendimientos de la síntesis son bastante altos (en todos los casos superiores al 70 %), sobre todo el obtenido para la síntesis realizada a pH 10,01 que es casi de un 90%. Sin embargo, el porcentaje de Pd en los desechos es muy bajo, lo que parece indicar que el

Pd restante se quedó retenido en el filtro que se utilizó a la hora de purificar. Cabe resaltar que también es probable que todo el Pd no se deba a los PdNCs/PdNPs sintetizados, sino que puedan haberse formado agregados cuyo tamaño sea superior a 3 kDa y haya quedado retenido en el filtro.

En este sentido, en el estudio publicado por Kettemann, F. et al.⁵⁷ se muestra que el acuocomplejo que forma el Pd²⁺ ([Pd(H₂O)₄]²⁺) tiende a hidrolizarse, lo que acaba produciendo Pd(OH)₂. Dicho hidróxido es insoluble, por lo que acaba precipitando. El empleo de una sal precursora que contenga tetracloropaladatos provoca que la disolución se vuelve turbia a las pocas horas (la reacción es más rápida a pH básico). Esto es debido a la formación de hidroxocomplejos polinucleares que tienen un diámetro superior a 20 nm⁵⁷. Este hecho podría explicar la razón por la que el rendimiento de la síntesis es tan elevado, ya que el Pd que no se hubiera consumido en la producción de PdNCs/PdNPs pudo haber formado hidroxocomplejos polinucleares, cuyo tamaño es superior a 3 kDa.

5 Conclusiones

Las conclusiones extraídas del presente TFM se pueden resumir en cinco puntos:

- ✓ Se ha conseguido sintetizar exitosamente PdNCs, los cuales se han caracterizado mediante espectroscopía de absorbancia Vis-UV, espectroscopía de fluorescencia y DLS. Esto se ha conseguido tras optimizar las condiciones en las que se realizaba la síntesis, habiendo pasado de las PdNPs que se obtuvieron inicialmente, a PdNCs. Cabe resaltar que para confirmar dicha afirmación sería necesario caracterizar los PdNCs sintetizados mediante HR-TEM.
- ✓ Se ha estudiado la utilización de LA y de DHLA como ligandos en la síntesis de PdNCs, comprobándose que los PdNCs sintetizados empleando DHLA (obtenido por reducción del LA con NaBH_4) tenían un menor tamaño y eran más fluorescentes.
- ✓ Se han estudiado múltiples relaciones molares de metal/ligando/reductor para la síntesis de PdNCs, encontrándose que la proporción más adecuada era 1:8 (K_2PdCl_4 :DHLA) y 1:7,5 (LA: NaBH_4).
- ✓ Se ha evaluado cómo influye el pH tanto a la hora de realizar la síntesis como en la emisión fluorescente producida por la disolución de PdNCs. Por un lado, se encontró que la formación de PdNCs se ve favorecida a pH básicos. Por otro lado, se encontró que, una vez sintetizados los PdNCs, su emisión fluorescente era superior cuando se realizaba la medida a pH ácido.
- ✓ Finalmente se procedió a evaluar el rendimiento de la síntesis de PdNCs trabajando a tres pH de síntesis diferentes, realizándose el análisis por ICP-MS con nebulización convencional. Los resultados experimentales mostraron que no había prácticamente Pd en el desecho, lo que parece indicar que, o bien prácticamente todo el paladio se ha consumido para formar PdNCs o que el Pd que no ha reaccionado ha formado agregados de mayor tamaño que el poro de los amicones empleados en la purificación.

6 Trabajos Futuros

La excepcional situación provocada por el Covid-19 ha hecho que el tiempo disponible para realizar la sección experimental del presente TFM se redujera en gran medida, de modo que hubo muchos experimentos que no se han podido realizar. De esta manera se ha decidido elaborar un apartado de trabajos futuros donde se incluyen los experimentos que se podrían realizar para continuar esta línea de investigación:

- Para conocer cuál es el tamaño del núcleo metálico de los PdNCs es necesario realizar medidas por HR-TEM. En este TFM no fue posible realizar estas medidas, las cuales hubieran permitido identificar si en cada una de las síntesis ensayadas se sintetizaron PdNCs o PdNPs.
- Realizar un estudio de la estabilidad de los PdNCs. Esto es especialmente importante debido a que se pudo observar que los espectros de absorbancia obtenidos el día que finalizó la síntesis eran diferentes a los que se obtuvieron después de 5 días. En dicho estudio también sería importante comprobar si los PdNCs son estables en una amplia variedad de condiciones de conservación (p.e. temperatura, pH, exposición a la luz solar, etc.).
- También sería importante comprobar cómo de reproducible es la síntesis de PdNCs. Para dicho estudio se realizaría cada una de las síntesis por triplicado. Además, para un estudio completo sería recomendable medir el tamaño de los PdNCs sintetizados empleando HR-TEM, determinar el rendimiento de la síntesis por ICP-MS y evaluar la fluorescencia de los PdNCs a diferentes pH.
- Se debería optimizar la síntesis ensayando diferentes condiciones de metal/ligando/reductor para conseguir que los PdNCs sintetizados tuvieran una mayor fluorescencia. También podría ser interesante estudiar cómo se modifican las propiedades fisicoquímicas de los NCs empleando un ligando bidentado (como el LA y el DHLA) y uno monodentado (p.e. ácido mercaptoundecanóico).
- Una vez sintetizados PdNCs estables y fluorescentes se podrían estudiar diferentes opciones de bioconjugación para emplearlos como marcas fluorescentes y elementales en la determinación de proteínas en muestras biológicas.

7 Referencias bibliográficas

1. Guozhong, C. (2004). *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications*. Word scientific.
2. Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., y Gordon, S. C. (2015). *Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 137-150.
3. Recomendación de la Comisión Europea de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (2011/696/UE).
4. Han, K. (2016). *Characterization and Technology of Nanomaterials*. 4th International Conference on Advanced Materials and Information Technology Processing (AMITP 2016). Atlantis Press.
5. <https://www.nano.gov/nanotech-101/what> (fecha de consulta: 01/07/2020)
6. Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., y Faupel, F. (2012). *Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects*. *Advances in colloid and interface science*, 170(1-2), 2-27.
7. Berlanga Mora, I. (2013). *Síntesis y caracterización de nanomateriales 0D, 1D Y 2D*. Diss. Universidad Autónoma de Madrid. (TESIS DOCTORAL)
8. Trapiella Alfonso, L.M. (2013). *Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos fluorescentes como marcadores metálicos fluorescentes*. Oviedo: Universidad de Oviedo. (TESIS DOCTORAL)
9. Whitesides, G. M. (2005). *Nanoscience, nanotechnology, and chemistry*. *Small*, 1(2), 172-179.
10. Kinoshita Jr, K., Adachi, K., y Itoh, H. (2004). *Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 245-268.
11. Soriano, M. L., Zougagh, M., Valcarcel, M., y Rios, A. (2018). *Analytical nanoscience and nanotechnology: where we are and where we are heading*. *Talanta*, 177, 104-121.
12. Zheng, J., Nicovich, P. R., y Dickson, R. M. (2007). *Highly fluorescent noble-metal quantum dots*. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 58, 409-431.
13. Ghosh, S. K., y Pal, T. (2007). *Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications*. *Chemical reviews*, 107(11), 4797-4862.
14. Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M., y Iatì, M. A. (2017). *Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002.
15. Zhang, L., y Wang, E. (2014). *Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging*. *Nano Today*, 9(1), 132-157.
16. Zheng, J., Zhang, C., y Dickson, R. M. (2004). *Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots*. *Physical Review Letters*, 93(7), 077402.
17. Hsueh-Hsiao, W., Cheng-An, J.L., Chih-Hsien, L., Yi-Chun, L., Ya-Ming, T., Ching-Ling, H., Chih-Hao, C., Cheng-Ho, T., Chun-Tai, H., Ji-Linc S., Wen-Hsiung, C., Walter, H.C. y Hung-I, Y. (2011). *Fluorescent gold nanoclusters as a biocompatible marker for in vitro and in vivo tracking of endothelial cells*. *ACS nano*, 5(6), 4337-4344.
18. Cantelli, A., Battistelli, G., Guidetti, G., Manzi, J., Di Giosia, M., y Montalti, M. (2016). *Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics*. *Dyes and Pigments*, 135, 64-79.
19. Aiken III, J. D., y Finke, R. G. (1999). *A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 145(1-2), 1-44.
20. Díaz-González, M., de la Escosura-Muñiz, A., Fernandez-Argüelles, M. T., García Alonso, F. J., y Costa-Fernandez, J. M. (2020). *Quantum Dot Bioconjugates for Diagnostic Applications*. *Topics in Current Chemistry*, 378, 35.
21. Valencia, E., Cruz-Alonso, M., Álvarez, L., González-Iglesias, H., Fernández, B., y Pereiro, R. (2019). *Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H*. *Microchimica Acta*, 186(7), 429.

22. Yang, X., Feng, Y., Zhu, S., Luo, Y., Zhuo, Y., y Dou, Y. (2014). *One-step synthesis and applications of fluorescent Cu nanoclusters stabilized by L-cysteine in aqueous solution*. *Analytica chimica acta*, 847, 49-54.
23. Tanaka, S. I., Miyazaki, J., Tiwari, D. K., Jin, T., y Inouye, Y. (2011). *Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging*. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(2), 431-435.
24. Peng, Y., Wang, P., Luo, L., Liu, L., y Wang, F. (2018). *Green synthesis of fluorescent palladium nanoclusters*. *Materials*, 11(2), 191.
25. Huang, H., Li H., Feng, J. J., y Wang, A. J. (2016). *One-step green synthesis of fluorescent bimetallic Au/Ag nanoclusters for temperature sensing and in vitro detection of Fe³⁺*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 223, 550-556.
26. Zheng, C., Zheng, A. X., Liu, B., Zhang, X. L., He, Y., Li, J., Yang, H.H. y Chen, G. (2014). *One-pot synthesized DNA-templated Ag/Pt bimetallic nanoclusters as peroxidase mimics for colorimetric detection of thrombin*. *Chemical Communications*, 50(86), 13103-13106.
27. Zheng, J., Petty, J. T., y Dickson, R. M. (2003). *High quantum yield blue emission from water-soluble Au₈ nanodots*. *Journal of the American Chemical Society*, 125(26), 7780-7781.
28. Zhang, J., Xu, S. y Kumacheva, E. (2005). *Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels*. *Advanced Materials*, 17(19), 2336-2340.
29. Hu, L., Han, S., Parveen, S., Yuan, Y., Zhang, L., y Xu, G. (2012). *Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters*. *Biosensors and Bioelectronics*, 32(1), 297-299.
30. Shang, L., Dong, S., y Nienhaus, G. U. (2011). *Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications*. *Nano today*, 6(4), 401-418.
31. Shang, L., y Dong, S. (2008). *Facile preparation of water-soluble fluorescent silver nanoclusters using a polyelectrolyte template*. *Chemical communications*, (9), 1088-1090.
32. Yu, J., Patel, S. A., y Dickson, R. M. (2007). *In vitro and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters*. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(12), 2028-2030.
33. Han, B., y Wang, E. (2012). *DNA-templated fluorescent silver nanoclusters*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 129-138.
34. Lin, C. A. J., Lee, C. H., Hsieh, J. T., Wang, H. H., Li, J. K., Shen, J. L., Chan, W.H., Yeh, H.I. y Chang, W. H. (2009). *Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: recent progress and present challenges*. *J. Med. Biol. Eng*, 29(6), 276-283.
35. Muhammed, M. A. H., Aldeek, F., Palui, G., Trapiella-Alfonso, L., y Matoussi, H. (2012). *Growth of in situ functionalized luminescent silver nanoclusters by direct reduction and size focusing*. *Acs Nano*, 6(10), 8950-8961.
36. Luo, Z., Zheng, K., y Xie, J. (2014). *Engineering ultrasmall water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications*. *Chemical communications*, 50(40), 5143-5155.
37. Zheng, K., Yuan, X., Goswami, N., Zhang, Q., y Xie, J. (2014). *Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters*. *Rsc Advances*, 4(105), 60581-60596.
38. Yuan, X., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Lee, J. Y., y Xie, J. (2011). *Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer*. *Acs Nano*, 5(11), 8800-8808.
39. Hyotanishi, M., Isomura, Y., Yamamoto, H., Kawasaki, H., y Obora, Y. (2011). *Surfactant-free synthesis of palladium nanoclusters for their use in catalytic cross-coupling reactions*. *Chemical Communications*, 47(20), 5750-5752.
40. Wang, Z., Li, H., Zhen, S., y He, N. (2012). *Preparation of carboxyl group-modified palladium nanoparticles in an aqueous solution and their conjugation with DNA*. *Nanoscale*, 4(11), 3536-3542.
41. Lu, Y., y Chen, W. (2012). *Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries*. *Chemical Society Reviews*, 41(9), 3594-3623.

42. Adhikari, B., y Banerjee, A. (2010). *Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing*. Chemistry of Materials, 22(15), 4364-4371.
43. Souza, T. G., Ciminelli, V. S., y Mohallem, N. D. S. (2016, July). *A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles*. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 733, No. 1, p. 012039). IOP Publishing.
44. Rakap, M., y Özkar, S. (2012). *Hydroxyapatite-supported cobalt (0) nanoclusters as efficient and cost-effective catalyst for hydrogen generation from the hydrolysis of both sodium borohydride and ammonia-borane*. Catalysis today, 183(1), 17-25.
45. Fu, X., Wang, Y., Wu, N., Gui, L., y Tang, Y. (2001). *Surface modification of small platinum nanoclusters with alkylamine and alkylthiol: an XPS study on the influence of organic ligands on the Pt 4f binding energies of small platinum nanoclusters*. Journal of colloid and interface science, 243(2), 326-330.
46. Zhu, M., Qian, H., y Jin, R. (2010). *Thiolate-protected Au₂₄ (SC₂H₄Ph)₂₀ nanoclusters: superatoms or not?*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 1(6), 1003-1007.
47. Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental (6ª edición)*. México D.F. Cengage Learning.
48. Khlebtsov, B. N., y Khlebtsov, N. G. (2011). *On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method*. Colloid Journal, 73(1), 118-127.
49. https://macro.lsu.edu/howto/DLS_Minicourse/DLS_Minicourse.pdf (fecha de consulta: 26/06/2020)
50. Ammann, A. A. (2007). *Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool*. Journal of mass spectrometry, 42(4), 419-427.
51. Álvarez Toral, A. (2017). *Desarrollo de métodos de cuantificación empleando técnicas de análisis directo de sólidos con detección por espectrometría de masas*. Oviedo: Universidad de Oviedo. (TESIS DOCTORAL)
52. Cui, M., Song, G., Wang, C., y Song, Q. (2015). *Synthesis of cysteine-functionalized water-soluble luminescent copper nanoclusters and their application to the determination of chromium (VI)*. Microchimica Acta, 182(7-8), 1371-1377.
53. Lan, G. Y., Huang, C. C., y Chang, H. T. (2010). *Silver nanoclusters as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions*. Chemical Communications, 46(8), 1257-1259.
54. Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Álvarez, L., González-Iglesias, H., Traub, H., Jakubowski, N., y Pereiro, R. (2018). *Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by laser ablation-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags*. Microchimica Acta, 185(1), 64.
55. Elías Milla, F. (2019). *Síntesis de nanoclústeres metálicos como marcar específicas para el análisis de proteínas*. Oviedo: Universidad de Oviedo (Trabajo Fin de Máster)
56. Mishra, D., Wang, S., Michel, S., Palui, G., Zhan, N., Perng, W., Jin, Z. y Mattoussi, H. (2018). *Photochemical transformation of lipoic acid-based ligands: probing the effects of solvent, ligand structure, oxygen and pH*. Physical Chemistry Chemical Physics, 20(6), 3895-3902.
57. Kettemann, F., Wuithschick, M., Caputo, G., Kraehnert, R., Pinna, N., Rademann, K., y Polte, J. (2015). *Reliable palladium nanoparticle syntheses in aqueous solution: the importance of understanding precursor chemistry and growth mechanism*. CrystEngComm, 17(8), 1865-1870.