

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
Y
TERMODINÁMICA APLICADA**



**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOBIOCONJUGADOS. NUEVOS ELEMENTOS
EN LA CONSTRUCCIÓN DE INTERFASES
BIOLÓGICAS**

**Tesis Doctoral
Rafael Del Caño Ochoa
Córdoba, 2019**

TITULO: *DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOCONJUGADOS.
NUEVOS ELEMENTOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE INTERFASES
BIOLÓGICAS*

AUTOR: *Rafael del Caño Ochoa*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Química



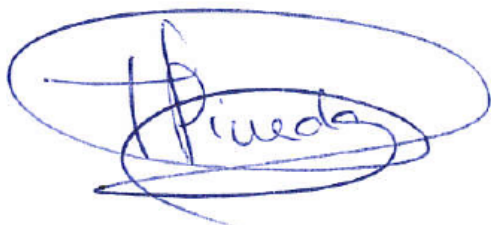
Fdo.: Rafael Del Caño Ochoa

Graduado en Química

Título de Tesis:

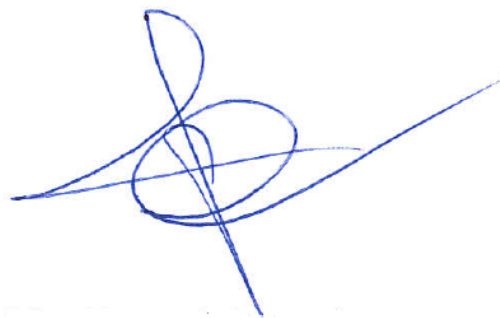
**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOCONJUGADOS.
NUEVOS ELEMENTOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE
INTERFASES BIOLÓGICAS**

Los directores del trabajo:



Fdo.: María Teresa Pineda Rodríguez

Catedrática de Universidad del
Departamento de Química Física y
Termodinámica Aplicada. Universidad
de Córdoba



Fdo.: Manuel Blázquez Ruíz

Catedrático de Universidad del
Departamento de Química Física y
Termodinámica Aplicada. Universidad
de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOCONJUGADOS. NUEVOS ELEMENTOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE INTERFASES BIOLÓGICAS.

DOCTORANDO: Rafael Del Caño Ochoa

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

D. Manuel Blázquez Ruiz, Catedrático de Universidad, y D^a María Teresa Pineda Rodríguez, Catedrática de Universidad, miembros del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada (Área de Química Física) de la Universidad de Córdoba, informan que la Tesis Doctoral presentada por D. Rafael del Caño Ochoa, titulada:

“DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOBIOCONJUGADOS. NUEVOS ELEMENTOS EN LA CONSTRUCCIÓN DE INTERFASES BIOLÓGICAS”

Se ha realizado dentro del Programa de Doctorado de Química Fina, en el Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada (Área de Química Física) de la Universidad de Córdoba, durante el desarrollo del proyecto CTQ2014-60227-R (Ministerio de Economía y Competitividad) y el contrato predoctoral asociado a este proyecto.

La presente memoria reúne, a juicio de los directores, los requisitos exigidos, y ha dado lugar a dos artículos publicados en revistas científicas incluidas en el primer cuartil del ámbito de la especialidad, con índice de calidad relativo y en los cuales, el doctorando es primer autor. Los directores de la Tesis informan, además, de la adecuada dedicación del doctorando, los conocimientos que ha adquirido en el campo objeto de su trabajo y su capacidad investigadora., incluyendo diseño y realización de experimentos, discusión de resultados y extracción de conclusiones. Asimismo, informan de la realización de una estancia de tres meses del doctorando en los laboratorios de la School of Chemistry de la Universidad de Lincoln (Reino Unido) y de la existencia de dos informes favorables de doctores extranjeros.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 9 de Mayo de 2019

Firma de los directores

Fdo.: María Teresa Pineda Rodríguez

Fdo.: Manuel Blázquez Ruiz

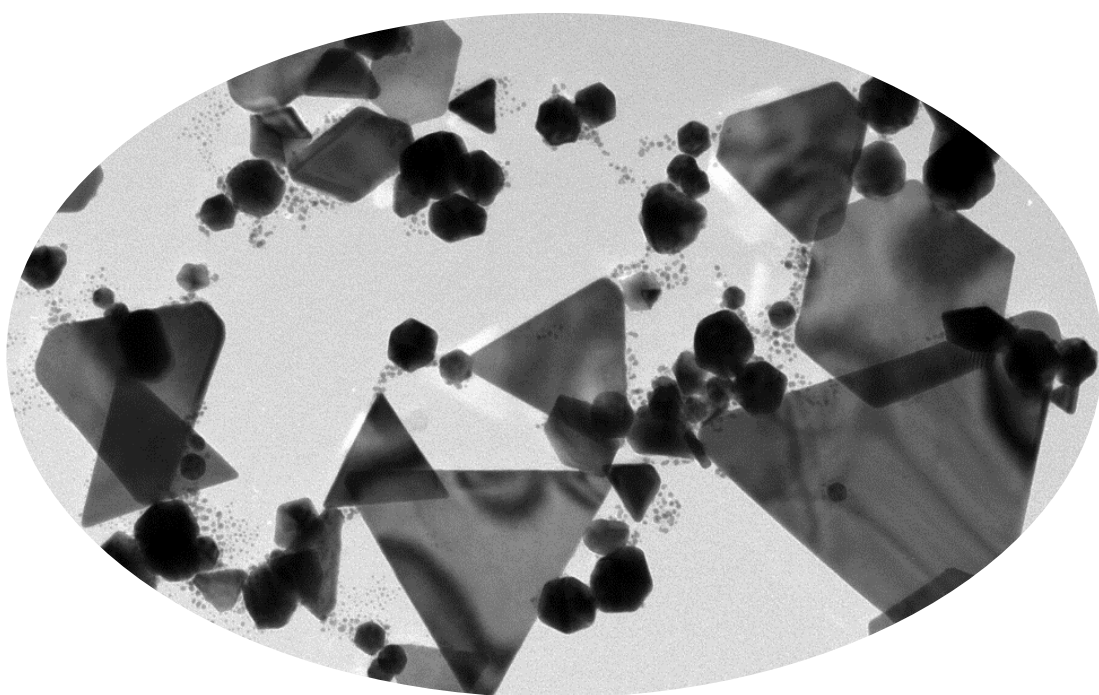
Mediante la defensa de esta memoria se pretende optar a la mención de “Doctorado Internacional”, habida cuenta que el doctorando reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con informes favorables de dos doctores expertos, con experiencia investigadora acreditada, pertenecientes a alguna institución de educación superior o instituto de investigación fuera de España.
2. En el Tribunal, que ha de evaluar la Tesis, existe un miembro de una institución de educación superior o centro de investigación de un país distinto al nuestro.
3. Parte de la redacción y defensa de esta Memoria se realizará en una de las lenguas habituales para la comunicación científica y distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España.
4. El doctorando ha realizado una estancia de investigación en la School of Chemistry de la Universidad de Lincoln (Lincoln, Reino Unido), gracias a la concesión de una ayuda para la movilidad con objeto de obtener el Doctorado con Mención Internacional, concedida por la Universidad de Córdoba.

La investigación realizada en la presente Memoria forma parte de la programación plurianual de actividades del Grupo de Investigación FQM-111 de la Universidad de Córdoba, para la cual ha recibido financiación a través de:

- El apoyo financiero de la Junta de Andalucía a los Grupos de Investigación.
- El apoyo financiero del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO), proyecto CTQ 2014-60227-R.
- El apoyo financiero de la Universidad de Córdoba en el marco de las ayudas “Plan Propio de Investigación de la Universidad de Córdoba”.

Al mismo tiempo, el trabajo ha sido realizado durante el periodo de disfrute de un Contrato con Cargo a Proyecto, concedido a través del Proyecto CTQ 2014-60227-R comentado anteriormente.

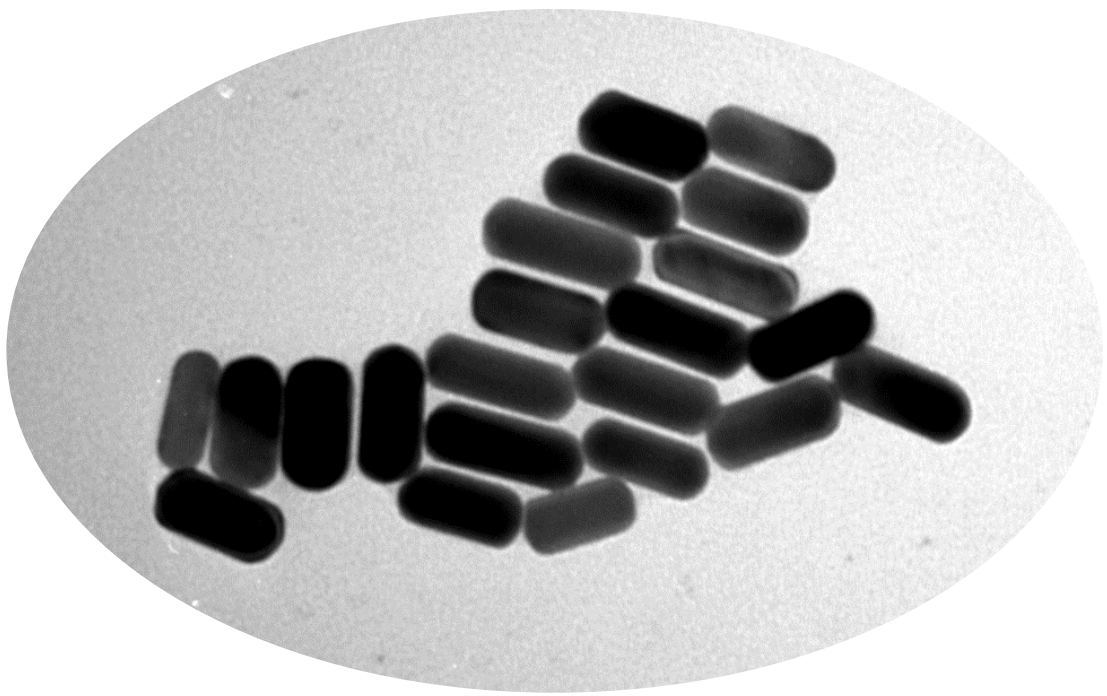


Índice

Resumen/Summary	1
Capítulo 1. Introducción	7
1. Introducción	9
1.1. Interfase nano-bio.....	9
1.2. Corona de proteínas.....	9
1.3. Síntesis de NPs de oro.....	14
1.4. Propiedades ópticas de las nanopartículas de oro.	20
1.4.1. Absorción de luz por los coloides.....	20
1.4.2. Efectos del tamaño.	24
1.4.3. Efecto del índice de refracción del disolvente.	26
1.5. Plasmónica.	26
1.6. Surface Enhancement Raman Scattering (SERS).....	29
1.7. Estabilidad coloidal.	33
1.7.1 Teoría DLVO	41
1.8. Estabilización estérica o entrópica.....	45
1.9. Floculación por depleción.	47
1.10. Bibliografía	48
Capítulo 2. Experimental.....	55
2. Experimental	57
2.1. Técnicas microscópicas. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	57
2.2. Técnicas espectroscópicas	60
2.2.1. Espectroscopía UV-Visible.....	61
2.2.2. Espectroscopía FT-IR	62
2.2.3. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X.....	67
2.2.4. Espectroscopía Raman	69
2.3. Técnicas electroquímicas	70
2.3.1. Celdas y electrodos	71
2.3.2. Medidas electroquímicas	72
2.4. Técnicas de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) y medidas de potencial Z.....	73
2.5. Medidas y tratamientos de datos	77
2.6. Bibliografía	77

Capítulo 3. Nanopartículas de oro esféricas (AuNPs).....	79
3. Nanopartículas de oro esféricas (AuNPs).....	81
3.1. Introducción.	81
3.2. Experimental.	84
3.2.1. Reactivos.	84
3.2.2. Síntesis de cAuNPs.....	84
3.2.3. Modificación de AuNPs con monocapas autoensambladas.....	85
3.2.4. Formación de los Bioconjugados.....	86
3.3. Resultados y discusión.....	87
3.3.1. Caracterización mediante espectroscopia UV-visible de los sistemas derivados de c-AuNPs con diferentes capas protectoras y de los bioconjugados Hb-AuNPs.	87
3.3.2. Caracterización mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y medidas de potencial Z.	94
3.3.3. Caracterización mediante espectroscopia Infrarroja (Attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR)).....	97
3.3.4. Caracterización mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	102
3.3.5. Caracterización mediante técnicas electroquímicas.	102
3.3.6. Bioelectrocatalisis.....	115
3.4. Bibliografía.....	119
 Capítulo 4. Nanocilindros de oro (AuNRs).....	 127
4. Nanocilindros de oro (AuNRs).....	129
4.1. Introducción.	129
4.2. Experimental.	133
4.2.1. Síntesis de AuNRs.	133
4.2.2. Modificación superficial de CTAB-AuNRs con ácidos mercapto-undecanoico (MUA) y mercapto-hexadecanoico (HMDA).	134
4.3. Resultados y discusión.....	135
4.3.1. Caracterización de AuNRs mediante espectroscopia UV-Visible.	135
4.3.2. Modificación de CTAB-AuNRs mediante intercambio de ligandos.	136
4.3.3. Caracterización de AuNRs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).	138
4.3.4. Caracterización por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	139
4.3.5. Caracterización de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs mediante espectroscopia Infrarroja.....	146
4.3.6. Caracterización de CTAB- y MUA-AuNRs mediante espectroscopia Raman.....	148
4.3.7. Caracterización de CTAB- y MUA-AuNRs mediante técnicas Electroquímicas .	151
4.3.8. Estabilidad de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs en disoluciones acuosas.	155

4.3.9.	Interacción de AuNRs con la proteína Hemoglobina. Caracterización mediante espectroscopia UV-visible-NIR.	164
4.3.10.	Caracterización de los bioconjugados mediante espectroscopia Raman.	171
4.3.11.	Estudio de la transferencia electrónica de los bioconjugados CTAB- y MUA-AuNR-Hb	174
4.4.	Bibliografía	184
Capítulo 5. Nanoprismas triangulares de oro (AuNTs)		191
5.	Nanoprismas triangulares de oro (AuNTs).....	193
5.1.	Introducción.....	193
5.2.	Experimental.....	195
5.2.1.	Síntesis de nanoprismas triangulares de oro (AuNT).....	195
5.2.2.	Separación de los AuNTs.....	196
5.3.	Resultados y discusión.....	199
5.3.1.	Caracterización de AuNTs mediante espectroscopia Raman.....	199
5.3.2.	Caracterización de AuNTs mediante técnicas electroquímicas.....	200
5.3.3.	Estudio de la estabilidad de AuNTs en función del pH.....	201
5.3.4.	Formación y caracterización del bioconjugado AuNT-Hb.....	203
5.3.5.	Caracterización de AuNT-Hb mediante espectroscopia Raman.....	208
5.3.6.	Caracterización de AuNTs mediante DLS.....	209
5.3.7.	Estabilidad del bioconjugado AuNT-Hb en función de la temperatura.....	212
5.3.8.	Estudio de la transferencia electrónica de los bioconjugados.....	216
5.4.	Bibliografía	222
Capítulo/Chapter 6. Conclusiones/Conclusions.....		225
Glosario de abreviaturas.....		239
Publicaciones y Comunicaciones Científicas		247



Resumen / Summary

Los grandes avances científicos en las dos últimas décadas en el campo de la Nanociencia han propiciado el interés por la utilización de los nanomateriales (NMs) en diversas áreas. Uno de los campos en el que se presume que estos NMs van a tener una gran aplicación es el de la Biomedicina. Las propiedades fisicoquímicas únicas que presentan estos sistemas los hace prometedores no solo en terapias, donde se tratan de aplicar como sistemas de distribución controlada de fármacos o agentes fototérmicos, sino también en diagnóstico, debido a sus propiedades como agentes de contraste en imagen. Todo ello ha dado lugar a una nueva disciplina, la Teragnóstica.

Sin embargo, antes de que esto sea posible será necesario superar algunas barreras, siendo una de las más importantes, el conocimiento y control de la interfase entre los NMs y los sistemas biológicos, lo que ha venido en llamarse, interfase *nano-bio*. Es, precisamente, en este aspecto, donde se centra la presente Tesis Doctoral.

A la vista de las evidencias recientes sobre la existencia de la *corona* de proteínas, la película de material biológico, fundamentalmente proteínas, que rodean a los NMs, cuando se ponen en contacto con los sistemas biológicos, parece interesante abordar el estudio de la formación, estructura, función e interacciones que muestran estas entidades.

Los estudios que se presentan en esta memoria están basados en nanopartículas de oro de diferente tamaño y forma. La elección de oro como material de base se hace por su biocompatibilidad contrastada y su capacidad para generar NMs de diversa morfología. Una primera cuestión a tener en cuenta antes de buscar aplicaciones es conocer el comportamiento de los NMs sintetizados en medios acuosos, enfocando principalmente en la estabilidad de las dispersiones que forman. El material prístino que se obtiene se encuentra protegido por una capa molecular o película cuya naturaleza depende de la metodología de síntesis empleada. Este punto marca la necesidad de dotar a estos NMs de la capa molecular funcional apropiada que, en la mayoría de los casos y por diversas razones, no es la que poseen en tal estado prístino.

Así, la segunda cuestión que se aborda en el presente trabajo es la funcionalización superficial de los NMs con las películas moleculares adecuadas y la caracterización de las mismas tanto estructuralmente como desde el punto de vista de la estabilidad que confiere a los NMs en disolución.

La tercera cuestión que se plantea es el estudio de la formación y caracterización de la *corona* de proteínas que se puede establecer con los NMs obtenidos. Para ello, se ha utilizado la proteína hemoglobina, tanto por su presencia en el fluido sanguíneo, como por sus propias características fisicoquímicas.

El enfoque de este estudio se hace desde un punto de vista fisicoquímico, contando para ello con un abanico de metodologías de síntesis y funcionalización y de técnicas instrumentales que van desde la microscopia a las espectroscópicas, así como las técnicas electroquímicas.

The great scientific advances in the last two decades in the field of Nanoscience have led to the interest in the use of nanomaterials (NMs) in various areas. One of the fields in which these NMs are going to have a great application is that of biomedicine. The unique physicochemical properties presented by these systems make them promising not only in therapies, where they try to apply as controlled distribution systems of drugs or photothermic agents, but also in diagnosis, due to their properties as contrast agents in image. All this has given rise to a new discipline, the Theragnosis.

However, before this is possible, it will be necessary to overcome some barriers, being one of the most important, the knowledge and control of the interface between the NMs and the biological systems, what has come to be called, *nano-bio* interface. It is precisely in this aspect, where the present Doctoral thesis is focused.

In view of the recent evidence about the existence of the protein *corona*, the film of biological material, mainly proteins, that surround the NMs, when they come into contact with biological systems, it seems interesting to study the formation, structure, function and interactions that these entities can show.

The studies presented in this Thesis are based on gold nanoparticles of different size and shape. The choice of gold as base material is made by its proven biocompatibility and its ability to generate NMs of diverse morphology. A first issue to consider before looking for applications is to know the behavior of the NMs synthesized in aqueous media, focusing mainly on the stability of the dispersions they form. The pristine material, that is obtained, is protected by a molecular layer or film whose nature depends on the synthesis methodology used. This point marks the need to endow these NMs with the appropriate functional molecular layer, which, in most cases and for various reasons, is not what they possess in such a pristine state.

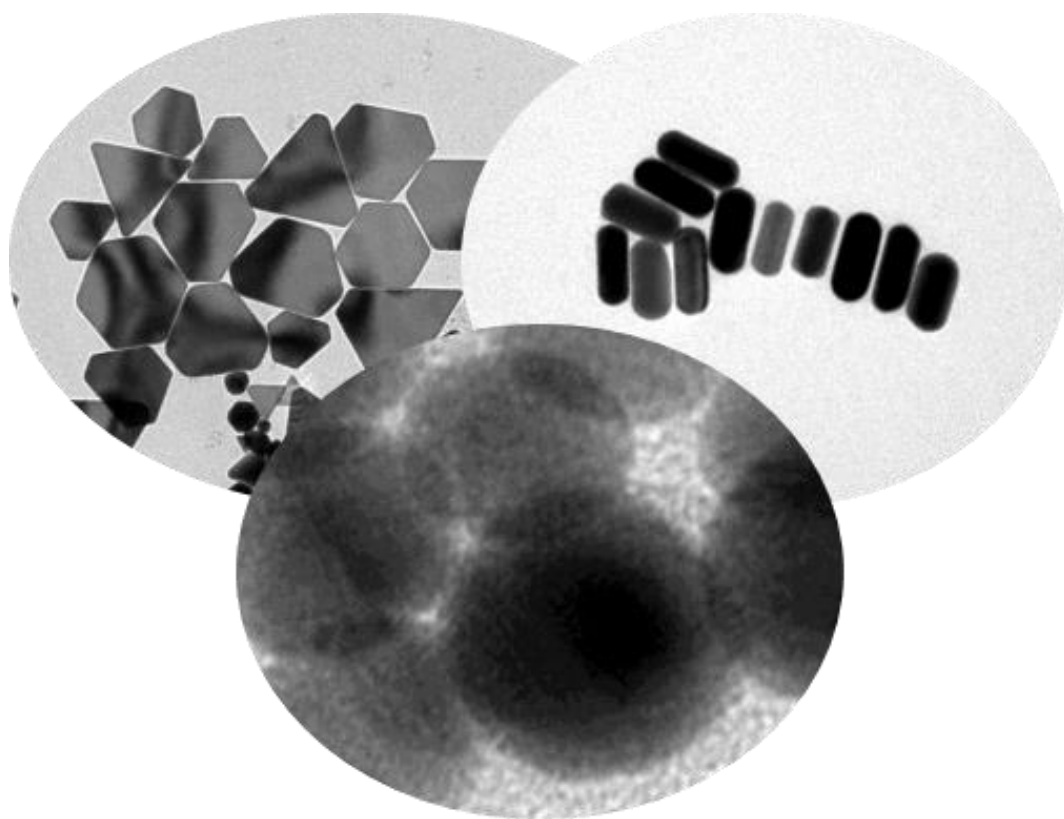
Thus, the second issue addressed in the present work is the surface functionalization of the NMs with the appropriate molecular films and the characterization of them, both structurally and from the point of view of the stability that confers NMs in solution.

The third question that arises is the study of the formation and characterization of the protein *corona* that can be established with the NMs obtained. For this purpose,

hemoglobin protein has been used, both for its presence in the bloodstream and for its own physicochemical characteristics.

The focus of this study is from a physicochemical point of view, counting with a range of methodologies of synthesis and functionality and instrumental techniques ranging from microscopy to spectroscopy, as well as electrochemical techniques.

Capítulo 1



Introducción

1. Introducción

1.1. Interfase nano-bio

Desde sus comienzos, la Nanociencia y la Nanotecnología han generado resultados prometedores que involucran la aplicación de los nanomateriales (NMs) en diversos campos como son la medicina, terapias y el biosensado, lo que ha dado lugar al campo emergente de la Nanomedicina.¹

La mayor barrera en el progreso de este campo ha sido el desconocimiento de las propiedades de la interfase entre los NMs y el medio biológico. Aunque la conjugación biomolecular a nanopartículas presenta gran dificultad,^{2,3} un reto mucho más complejo es conocer lo que ocurre cuando los NMs se introducen en el medio biológico. Así, la interacción entre NMs y fluidos o membranas biológicas tiene lugar tan pronto como estos se ponen en contacto. De esta manera se produce lo que se conoce en la literatura como interfase *nano-bio*.⁴

Esta interfase comprende tres componentes dinámicos que interaccionan entre sí:

- i) la superficie del NM, cuyas características están determinadas por su composición.
- ii) la interfase sólido/líquido y los cambios que tienen lugar cuando la nanopartícula interacciona con los componentes del medio que la rodea.
- iii) la zona de contacto de la interfase sólido/líquido con los sustratos biológicos.²

Estas interacciones están presentes en todos los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* en los que intervienen NMs.^{5,6}

1.2. Corona de proteínas

La exposición de NMs a fluidos que contienen proteínas y otras biomoléculas provoca la adsorción inmediata de parte de éstas formando una nube de proteínas agregadas conocida como *corona* de proteínas.⁷ La *corona* de proteínas y la adsorción no específica se han identificado como efectos colaterales negativos. Aunque este efecto se ha observado en la escala macroscópica, manifestándose como un deterioro superficial de implantes, catéteres y otros dispositivos médicos, el problema alcanza una dimensión superior cuando se trata de sistemas en la escala nanométrica. El aspecto fundamental a tener en cuenta es que cuando el tamaño del sistema disminuye a esta

escala, el fenómeno de adsorción cambia drásticamente a causa del aumento de la relación superficie/volumen. Todo ello puede alterar las propiedades superficiales de los NMs y, por tanto, las funciones para las que han sido diseñados inicialmente. El control de las interacciones que permiten el reconocimiento específico de NMs es sofisticado y solo es alcanzable en entornos de menor complejidad que los biológicos. Además, las propiedades de una *corona* de proteínas son imposibles de predecir, ya que su estructura es compleja y mantiene su integridad por un balance entre numerosas interacciones débiles. Por ejemplo, NMs cargados negativamente pueden unir proteínas cargadas negativamente porque las distribuciones de carga en proteínas no son uniformes, de manera que este problema no se puede simplificar y reducirlo a la atracción o repulsión entre cargas netas. Además, los tipos de interacciones responsables de la formación de la *corona* son variadas incluyendo, no solo las electrostáticas, sino también las Van der Waals, hidrofóbicas y enlaces de H, entre otras.

La composición de esta *corona* se cree que depende de los diferentes entornos biológicos que atraviesa el NM, así como de aquel en el que finalmente permanece.^{8,9} Por tanto, las capas de proteína adsorbida que se forman mientras los NMs se mueven de un medio biológico a otro evolucionan cuando la concentración de proteína y la composición del medio cambian (Figura 1). Se acepta que, parte de las proteínas que forman la *corona* pueden permanecer por un tiempo relevante en la superficie (*corona hard*),¹⁰ posiblemente evitando la adsorción de otras moléculas. Otras proteínas en cambio, se intercambian dinámicamente con las que se encuentran en disolución (*corona soft*).¹¹ Sin duda, el conocimiento actual sobre el intercambio dinámico en respuesta a los cambios en la composición del medio es aún muy limitado.¹²

Investigaciones recientes han mostrado que las proteínas del mismo tipo no se unen con la misma afinidad en la *corona*, sino que muestran un gradiente en la fuerza de unión^{9,13-15} y que, al cambiar propiedades del NM, tales como su química superficial, tamaño, forma y naturaleza, se altera la composición de la *corona*.^{10,13,15,16}

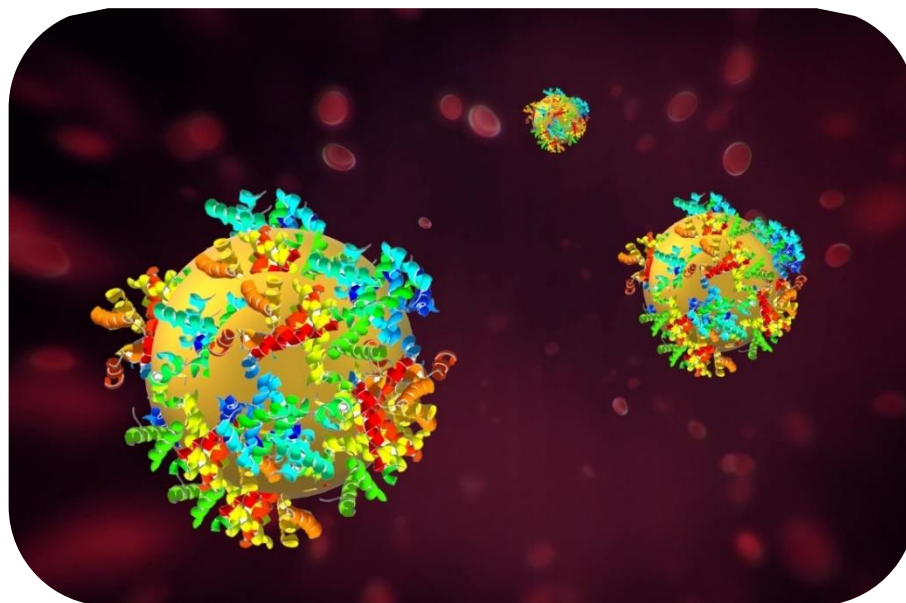


Figura 1. AuNP-corona de proteínas en un fluido biológico.

Debido al papel relevante que la evolución de la *corona* juega en la forma en que el NM interacciona con los sistemas biológicos es crucial, para cualquier aplicación biológica, entender cómo ocurren los procesos de adsorción e intercambio de proteínas en la *corona*.¹⁷ Así, mientras que la comunidad científica dedicada al estudio de la *corona* de proteínas ha empezado la transición desde la mera identificación de las proteínas adsorbidas al entendimiento de las respuestas fisiológicas que se originan debido a la presencia de esta, aún no se conoce completamente cómo pueden conjugarse las afinidades de adsorción de proteínas, las concentraciones relativas y la química superficial a la propia composición de la *corona* y a los posibles cambios estructurales de las proteínas que la componen.¹⁸

El campo de la nano-biotecnología ignoró durante años la existencia de la *corona* de proteínas, enfocándose primariamente en el material, las propiedades de su superficie y la biomolécula diana a la que se dirigiría el bioconjugado. Inicialmente, se pensó que las interacciones débiles serían compensadas por las fuertes interacciones de la biomolécula con la superficie del NM. Sin embargo, ahora queda bien establecido que las *coronas* de proteínas existen y son imposibles de evitar, de manera que estarán presentes siempre que un NM se encuentre en contacto con un fluido biológico.¹⁹ Aunque las investigaciones están solo en su infancia, se han hecho descubrimientos

clave, incluyendo el establecimiento de diferentes metodologías de estudio.^{20, 21} Estos estudios ponen de manifiesto el sorprendente resultado de que las proteínas más abundantes en el suero no son las más abundantes en la *corona* alrededor del NM.

La *corona* puede contener muchos tipos de proteínas y en diferentes cantidades. Algunas de éstas, las conocidas como opsoninas, pueden ser reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear y, por tanto, son rápidamente eliminadas de la sangre y acumuladas en el hígado y el bazo. Este hecho se ha considerado beneficioso para dirigir su distribución a estos órganos.²² Otras proteínas, sin embargo, pueden aumentar el tiempo de circulación de los NMs en la sangre y ser reconocidos por receptores específicos, de manera que no se produzca su rápida eliminación.²³ Para prevenir la eliminación rápida, la superficie de los NMs se recubren a menudo con polímeros, siendo uno de los más utilizados el polietilenglicol (PEG).²⁴ Esta modificación puede disminuir la adsorción de proteínas de la sangre, resultando en un tiempo de circulación relativamente largo y una baja acumulación. En contraste, para mejorar la especificidad en células y tejidos, la superficie de los NMs deben funcionalizarse con ligandos que puedan dirigirlos a células o tejidos bajo la influencia de las interacciones entre ligandos y receptores *diana*.²⁵ Aunque se han publicado muchos trabajos con resultados prometedores sobre el uso de diferentes ligandos para mejorar la direccionalidad de los NMs, esto puede alterar las interacciones *in vivo* y tiene un efecto importante en su tiempo de circulación por la sangre, conduciendo a una acumulación menor en el sitio específico. El dilema en la modificación de los NMs con ligandos es una preocupación actual y necesita estudiarse en profundidad.⁴

Un hecho a destacar es que las proteínas en la *corona* podrían no mantener su conformación nativa.²⁶ Se ha demostrado que estos cambios conformacionales, que a veces se limitan a la exposición de epítetos que estarían escondidos en la conformación nativa, pueden usarse como señal para la absorción específica de estos NMs por las células que, de otra manera, no tendrían acceso.²⁷ Todo esto posibilitaría hacer ingeniería de la *corona* para optimizarla y, en definitiva, ayudar a la innovación de nuevas terapias y aplicaciones biotecnológicas. Por tanto, la aplicación de la Nanotecnología en Biología y Medicina acentúa la importancia de conocer las interacciones de los NMs con las células y fluidos biológicos. Así, el uso de NMs como

plataformas de distribución controlada de fármacos requiere seguridad y precisión en su construcción ya que de ello depende su localización y eliminación en el cuerpo. Esto está determinado por las propiedades fisicoquímicas de la nanopartícula (NP) tales como tamaño, carga, hidrofobicidad y forma.²⁸

Se ha encontrado que la *corona* de proteínas de una partícula que migra desde un fluido biológico a otro lleva la huella del entorno previo.⁹ Este resultado sugiere que la ruta de entrada del NM, es decir, inhalación, inyección intravenosa o ingestión oral, puede influir en la composición de la *corona* en su circulación a lo largo de su recorrido. Además, las velocidades de flujo varían desde los capilares a las arterias, dando lugar a tensiones y enlaces de captura y pérdida asociadas con la marginación, interacción endotelial y extravasación de los NMs en los vasos sanguíneos. De hecho, se ha demostrado que las *coronas* de proteínas formadas *in vitro* o *in vivo* difieren en el tipo y la abundancia de proteínas.²⁹ Sin embargo, debido al reto técnico de extraer las *coronas* de proteínas, no se conoce como se desarrollan estas entidades y cómo evolucionan *in vivo*. En definitiva, la identidad biológica del NM será afectada de manera importante por la composición de la *corona* de proteínas que, por tanto, depende de la identidad sintética del NM¹³ como del entorno fisiológico.³⁰ En un escenario *in vivo*, un NM puede encontrar miles de proteínas de diferentes tipos. Sin embargo, ya que posee un área superficial finita, solo algunos cientos de diferentes tipos de proteínas estarán disponibles para unirse. Así, es de esperar que NMs individuales tengan *coronas* de proteínas diferentes y cabría preguntarse si estas subpoblaciones se comportarían también de forma diferente *in vivo*.³¹

El avance en este campo, por tanto, requiere progresar en dos frentes. En primer lugar, ya que se acepta que la formación de la *corona* *in vivo* es inevitable, hay que reconocer su existencia y considerarla estratégicamente con el fin de encontrar aplicaciones. En segundo lugar, hay que abordar su caracterización con objeto de generar conocimiento que pueda repercutir en una mejora en el ámbito de la salud y el bienestar social.

Entre los diferentes NMs que presentan propiedades físicas de interés por su tamaño y alta relación superficie/volumen están las nanopartículas de oro (AuNPs), cuyas propiedades ópticas y fototérmicas han hecho que se consideren como nuevos

agentes para su uso en biosensores, distribución controlada de fármacos y tratamiento del cáncer.³² El control y diseño de su química superficial es un aspecto crucial para conferirles la especificidad y bio-compatibilidad deseadas.

1.3. Síntesis de NPs de oro.

La naturaleza metálica del oro le proporciona interesantes propiedades ópticas y electrónicas que han hecho que sea estudiado desde muy antiguo. Según puede verse en el Museo Británico, los romanos ya fabricaban vidrios coloreados por incorporación de partículas metálicas (*copa de Licurgus*). La tecnología del vidrio tintado continuó desarrollándose en la Edad Media como fue descrito por Johann Knuckel en el siglo XVII.³³ Tanto el púrpura de Cassius como el rubí rojo se citan en tratados como hitos en esta tecnología.³⁴ Sin embargo, la primera descripción científica de la preparación de coloides de oro y la discusión de su “*action on light*” se debe a Michael Faraday³⁵ y el método para la síntesis de AuNPs cuasi-monodispersas a partir de la reducción de ácido cloroáurico con citrato fue descrito por primera vez en 1940 por Hauser y Lynn.³⁶ Ya en la mitad del siglo XX aparecen los trabajos pioneros de Turkevich y col.^{37, 38} en los que se describe la síntesis de coloides de oro monodispersos preparados en disolución acuosa mediante la reducción del ácido tetracloroáurico con citrato sódico. De esta forma, Turkevich fue el primero en proponer el mecanismo de reducción de la sal de oro, investigando también la influencia de la temperatura y la concentración de reactivos. En los años siguientes, los estudios se enfocaron en los efectos que los diferentes parámetros de la reacción tienen en el tamaño de partícula y en sus propiedades ópticas.³⁹ En las dos últimas décadas, el método de Turkevich ha recibido de nuevo una atención significativa, investigándose los efectos de los diferentes parámetros de la reacción ya descritos en el método clásico en relación con el tamaño, polidispersidad, morfología, estabilidad y concentración de las AuNPs. Se ha encontrado que estos parámetros afectan de forma importante a la distribución de especies reactivas en disolución, y que alteran las velocidades de reducción, nucleación y crecimiento, influyendo en el tamaño final de la partícula y su distribución de tamaños.⁴⁰⁻⁴⁷ Contrariamente al modelo clásico de nucleación descrito por Lamer,⁴⁸ Chou y Zukowski⁴⁹ demostraron que el periodo inicial de nucleación favorecería la formación de grandes agregados a partir de la reducción de Au(III) por citrato que se desagregarían durante el

curso de la reacción para producir NPs pequeñas y monodispersas. Estudios de Liz-Marzan y col.⁵⁰ muestran mediante métodos electroquímicos que ocurren cambios drásticos en la carga de la partícula y en el potencial redox durante la formación y concluyen que la reducción de Au(III) a Au(I) es la etapa determinante de la velocidad en ambas fases de nucleación y crecimiento. Además, como se había postulado por Turkevich y col.³⁸ y a su vez demostrado por Puentes y col.,⁵¹ el periodo de inducción previo a la nucleación del coloide se asocia con la necesidad de formar productos de oxidación de citrato, tales como la dicarboxi-acetona, que actúa como agente quelatante multidentado que produce los clústeres de Au(I). Durante esta etapa, la concentración de especies de Au(I) aumenta hasta un nivel suficiente como para promover la desproporción y la consiguiente sobresaturación de átomos Au(0) en disolución.⁵² La velocidad de reducción observada en la formación de AuNPs refleja las tendencias en conflicto entre la reactividad dependiente del pH de las especies citrato y áuricas. Goia y Matijevic⁵³ estimaron la variación probable del potencial redox estándar de los diferentes complejos de Au(III) y el agente reductor dirigidos por las variaciones en el pH de la mezcla de reacción inicial. En base a estos estudios, Peng y col.⁴⁴ encontraron que un cambio en el pH de la mezcla era la causa de la variación en el tamaño de las partículas y de la velocidad de reacción global e identificaron dos caminos diferentes al aumentar el pH.

Por otra parte, los métodos basados en citrato se han usado para preparar semillas para su posterior utilización en el crecimiento de partículas con diferente tamaño y forma mediado por éstas. La discusión en la mayoría de los estudios mencionados, además de la investigación de la influencia de los parámetros de reacción en los productos finales, se ha dedicado a encontrar una explicación de cómo transcurre el mecanismo de nucleación y crecimiento de las NPs de oro.^{54, 55 37, 40, 43-45, 47, 49, 56, 57} Así, se ha encontrado que un método de síntesis basado en citrato está gobernado por un mecanismo de crecimiento mediado por semillas, lo que se supone que es una coincidencia afortunada creada por un favorable juego entre los diferentes procesos químicos y fisicoquímicos. Además, una investigación detallada del mecanismo proporciona un protocolo para la síntesis de AuNPs de pequeño tamaño y altamente monodispersas.⁵⁸ En este protocolo los aniones citrato deben usarse en su forma

parcialmente protonada (HCit^{2-}), de manera que la mezcla final de reacción se encuentre en el intervalo de pH 5.5 a 6. La contribución más importante a una explicación de los procesos químicos que gobiernan la formación de las AuNPs ha puesto de manifiesto que hay al menos dos factores que hacen del citrato un reactivo apropiado para la síntesis.^{52,56} Primero, el grupo hidroxilo en la posición α con respecto al grupo carboxilo del citrato, permite la formación de un intermedio que es la etapa determinante de la velocidad, formando un complejo cíclico de cinco miembros. Además, la descomposición del intermedio conduce a un solo producto asociado con citrato, la dicarboxi-acetona, que asiste a la reducción de los iones Au a través de un mecanismo diferente al de la etapa inicial. Se ha demostrado que el pH del medio determina la velocidad de reducción que, en definitiva, es la etapa determinante de la velocidad en la formación de las AuNPs e involucra la descarboxilación del citrato. Así, el pH condiciona la especie dominante de reactivo y, como consecuencia, el camino de reacción es diferente a cada pH. Recientemente, se ha propuesto que no solo el citrato, sino también otros α -hidroxicarboxilatos son capaces de reducir iones oro a oro atómico. Sin embargo, solo los que tienen estructuras similares al citrato y proporcionan similares productos de oxidación en la primera etapa de la reducción dan lugar a AuNPs cuasi-esféricas y monodispersas.

La síntesis de NPs metálicas con tamaño y forma controladas ha adquirido una gran importancia en las últimas décadas debido a que prácticamente todas las propiedades que se definen dentro del régimen nanométrico dependen del tamaño y la forma de estas. Los métodos más comunes para controlar el tamaño emplean agentes decapantes que ayudan a controlar el crecimiento. En general, estos métodos conducen a la generación de partículas esféricas debido a la baja energía superficial asociada a esta forma. Los mecanismos de control de esta forma fueron estudiados por los grupos de El-Sayed y Reetz, encontrando que la formación de nanoestructuras con formas diferentes a la esférica es el resultado de la interacción específica de los agentes decapantes con las diferentes facetas en crecimiento de las NPs.⁵⁹⁻⁶¹ En algunos procedimientos, el control en las etapas de nucleación y crecimiento se lleva a cabo cambiando el agente reductor o la concentración de estabilizador, permitiendo así controlar el tamaño y la forma de las NPs.^{39, 59-63}

En síntesis de AuNPs en disolución se ha observado una nucleación inicial lenta seguida por una nucleación rápida asociada con un crecimiento superficial autocatalítico.⁶⁴ De esta forma, se han obtenido NPs esféricas de diferente tamaño a través de una aproximación de un crecimiento mediado por semillas. Se puede usar esta misma estrategia de crecimiento en presencia de micelas con forma cilíndrica, para un control de la forma mediado por un molde. Los primeros intentos que usaron la reducción fotoquímica de una sal de oro en presencia de un molde micelar produjeron una mezcla de nanocilindros y nanohilos, además de una fracción importante de esferas.⁶⁵ La razón posible para esta polidispersidad en forma es la dificultad de controlar la nucleación y el crecimiento, además del hecho de que la nucleación continúa produciéndose durante todo el proceso.

La relación de aspecto (AR) de una forma se define como la longitud del eje mayor dividida por la del eje menor ($AR = 1$). Murphy et al. definen como nanocilindros (*nanorods*, NRs) los materiales que tienen una anchura de aproximadamente 1 – 100 nm, mientras que su AR se encuentre entre 1 y 20; por otra parte, los nanohilos (NWs) serían materiales análogos con $AR > 20$.^{66, 67}

Los métodos de síntesis de NRs y NWs pueden clasificarse como sigue:

- a) *Síntesis con moldes duros*: se utiliza un molde nanoporoso (por ejemplo, una membrana de alúmina) como vaso de reacción para la deposición electroquímica del metal.⁶⁸ La membrana debe unirse a un electrodo para la síntesis. La AR se controla por la cantidad de metal presente. Para producir nanocilindros libres, el molde debe disolverse.
- b) *Síntesis con moldes blandos*: las micelas, microemulsiones y surfactantes pueden también dirigir el crecimiento de los NMs anisotrópicos.⁶⁹⁻⁷² En el caso del oro, se ha hecho muy popular la reducción electroquímica de la sal de oro en una celda.⁶⁹ La forma cilíndrica de la micela promueve la formación de los materiales cilíndricos a partir de precursores iónicos. En el caso de surfactantes, la unión del surfactante a la cara del cristal en crecimiento ayuda al crecimiento directo de NR. La AR del NR resultante se puede controlar por la forma y el tamaño del molde micela/microemulsión y las concentraciones relativas de los precursores, sales y surfactantes.

c) *Crecimiento mediado por semillas en disolución*: el método para preparar NRs y NWs metálicos usando el crecimiento mediado por semillas fue desarrollado por el grupo de C.M. Murphy en 2001.⁷³⁻⁷⁵ El procedimiento comienza con la síntesis de AuNPs esféricas por reducción química de una sal metálica con un agente reductor fuerte como el borohidruro sódico. El citrato está presente como agente decapante para evitar el crecimiento de la partícula. Así, las esferas de Au que se generan tienen un diámetro de entre 3-5 nm y sirven como semillas en las que crecen las nanoestructuras anisotrópicas. Las semillas se añaden a una disolución que contiene más sal metálica, un agente reductor débil (por ejemplo, ácido ascórbico) y un molde micelar con forma cilíndrica (bromuro de cetil-trimetilamonio, CTAB). Las semillas sirven como soportes de nucleación para el crecimiento de los NRs o NWs. Bajo estas condiciones experimentales, la sal no se reduce a metal si las semillas no están presentes. En estos casos descritos, es preciso algún tipo de centrifugación o extracción para separar los cilindros de las esferas que permanezcan.

En el método mediado por semillas, la nucleación y el crecimiento se separan temporalmente, conduciendo a uniformidad y un preciso control sobre el tamaño de la partícula y su AR. En 2001, Murphy y col.⁷³ prepararon AgNRs y AgNWs reduciendo AgNO_3 con ácido ascórbico en presencia de semillas de Ag. El uso de CTAB como surfactante y distintas cantidades de NaOH promueve la formación de AgNRs, a altas concentraciones de NaOH, o de NWs, a bajas concentraciones de NaOH. En el caso del oro, en 2003, El-Sayed introdujo una síntesis coloidal de alto rendimiento (>90%) de AuNRs monocristalinos y monodispersos.⁷⁶ Desde entonces se han descrito varias aproximaciones que han mejorado la calidad, alcanzando valores de hasta el 99% en el rendimiento de la forma.⁷⁷

La AR de los NRs se puede controlar variando la relación de semillas/sal metálica así como con el tiempo de espera entre las etapas de síntesis.⁷⁴ Una mejora del método, con objeto de aumentar el rendimiento, es la adición de una cantidad de NaOH equimolecular con ácido ascórbico, de manera que el pH cambia de 2.8 a 3.5.⁷⁸ En el oro, el mecanismo de crecimiento del NR involucra la adsorción preferencial de CTAB en las caras del cristal del eje longitudinal del NR en crecimiento.^{66, 79}

Estudios previos de TEM habían puesto de manifiesto que las semillas se transforman inicialmente por crecimiento y agregación en cristales decaedros, el 4% de los cuales se alargan cuando se añade una disolución fresca de reacción, mientras que el resto crecen isométricamente.⁷⁹ CTAB forma una bicapa en los AuNRs,⁸⁰ cuya formación durante el crecimiento del NR es una posible fuente de “*cremallera*” que, una vez formada, asiste a la formación del NR.⁷⁹ Si el crecimiento del NR se hace a pH 5.6 se obtiene una AR > 20, aunque en este caso aumenta la polidispersidad. La causa de estos efectos puede encontrarse si se tiene en cuenta que el pK_1 del ácido ascórbico es 4.1. Así, un aumento de 2.8 a 3.1 representa un aumento significativo en la fracción de ascorbato presente como monoanión. Se ha encontrado que el ascorbato es, en realidad, el reductor en presencia de CTAB y además, que los pKs del ácido ascórbico se reducen por complejación con CTAB.⁸¹ Por tanto, puede postularse que el monoanión ascorbato se adsorbe mejor en los terminales de las facetas {111} de simetría-5 que en las otras facetas del NR de oro en crecimiento y es más efectivo para reducir Au(III) a los intermedios de Au(I). De hecho, al usar ascorbato sódico en lugar de una combinación de ácido ascórbico y NaOH, promueve la formación de NRs más largos. Sin embargo, el balance de los complejos intermedios de CTAB/ascorbato/Au(I) es muy delicado, ya que un aumento de pH a 5.6 no sólo conduce a mayores proporciones de NR sino también a un más alto grado de polidispersidad.

Existen dos posibles mecanismos de crecimiento y, en uno de ellos, los surfactantes forman un molde blando que tendrá un tamaño que dependerá de la concentración de surfactante y de la fuerza iónica de la disolución. Al introducir las semillas en la disolución de crecimiento, las semillas rodeadas de surfactante se vuelven parte del molde blando y el crecimiento empieza al difundirse los átomos de Au a través del molde. El otro posible mecanismo consiste en que las semillas rodeadas de surfactante empiezan a crecer y los átomos que se van uniendo a la red del nanocrystal se van protegiendo por los monómeros de surfactante que provienen de la disolución. Mediante TEM se observa que los NRs tienen 4 facetas {110} y que estas facetas están ausentes en nanoesferas.⁸² El surfactante se une más fuertemente en las facetas {110} que en las otras.⁸³ Una semilla dada necesita crecer en las direcciones X e Y para alcanzar la anchura y longitud del NR (asumiendo el eje largo en la dirección Z). Parece que el

crecimiento del NR tiene lugar en todas direcciones. El crecimiento longitudinal se produce paralelo a los planos {001}, acompañado por la formación de 4 facetas {110} relativamente inestables y 4 facetas {111}. Una vez que la semilla crece a un tamaño crítico, las facetas se hacen suficientemente grandes como para que se produzca una unión significativa de surfactante. La velocidad de crecimiento de las diferentes facetas en presencia del surfactante determina la forma final de la NP. El crecimiento más lento en la anchura del NR es un ejemplo de la mejor protección de las facetas {110} por CTAB. El tamaño final depende, por tanto, del suministro de Au y de la concentración de surfactante. Ya que el surfactante está a muy alta concentración, el proceso continúa hasta que se agota el Au.

1.4. *Propiedades ópticas de las nanopartículas de oro.*

Un gran hito en el desarrollo de la ciencia de las NPs metálicas ha sido las consideraciones teóricas de Mie sobre el color de los coloides metálicos y, en particular, de los coloides de oro.⁸⁴ De esta forma, Mie explicó los colores cuantitativamente, resolviendo el problema fundamental de la absorción y dispersión de la luz por pequeñas esferas. Uno de los resultados claves del trabajo de Mie fue que los materiales, con valores negativos en la parte real de la función dieléctrica, mostrarán un pico anómalo en el espectro de absorción cuando se encuentran en forma de pequeñas partículas. A partir de este trabajo, numerosas investigaciones han abordado el estudio de las propiedades de las partículas metálicas a causa de sus inusuales propiedades ópticas. Mientras que el Au, Ag y Cu son muy atractivos, los metales con bandas *d* como Pt, Ir y Rh son menos interesantes desde el punto de vista óptico, aunque muestran propiedades catalíticas superiores.

1.4.1. *Absorción de luz por los coloides.*

En presencia de una disolución coloidal diluida que contiene *N* partículas por unidad de volumen, la atenuación, medida de la luz de intensidad *I*₀, a través de un paso óptico de *x* cm, viene dado por:⁸⁵

$$\frac{dI(x)}{dx} = -N \cdot C_{ext} \cdot I(x) \quad (1)$$

que muestra que la velocidad de pérdida de fotones es proporcional a la intensidad de la luz a una distancia x en el medio y , también, a la densidad numérica de partículas capaces de extinguir la luz. La integración de la ecuación (1) da la absorbancia de la disolución:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I(x)} = \frac{N \cdot C_{ext} \cdot x}{2.303} \quad (2)$$

donde C_{ext} es la extinción transversal de una partícula. Para partículas esféricas con una función dieléctrica compleja dependiente de la frecuencia, $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$, embebidas en un medio de función dieléctrica ϵ_m , C_{ext} viene dada por:

$$C_{ext} = \frac{2\pi}{\kappa^2} \sum_{n=1}^{n=\infty} (2n+1) \text{Re}(a_n + b_n) \quad (3)$$

donde,

$$\kappa = \frac{2\pi\sqrt{\epsilon_m}}{\lambda} \quad (4)$$

Y a_n y b_n son los coeficientes de dispersión, que son funciones de a y λ en términos de las funciones de Ricatti-Bessel. La extinción transversal de una partícula se normaliza para dar la extinción transversal por unidad de área:

$$Q_{ext} = \frac{C_{ext}}{\pi R^2} \quad (5)$$

Convencionalmente, en química se mide el coeficiente de extinción de una disolución en unidades $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, donde la concentración del coloide es la concentración molar de átomo metálico. Para partículas de radio R (cm), esta cantidad está relacionada con Q_{ext} por:

$$\epsilon(M^{-1} \text{cm}^{-1}) = 3 \cdot 10^{-3} \frac{V_m \cdot Q_{ext}}{4(2.303R)} \quad (6)$$

donde V_m ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) es el volumen molar del metal. Bohren y Huffman han proporcionado aproximaciones que pueden usarse en lugar de la expansión en serie completa. En particular, para partículas muy pequeñas donde $\kappa \cdot R \ll 1$, solo el primer término (dipolo eléctrico) es significativo y la ecuación (3) se reduce a:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 \cdot R^3 \cdot \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \cdot \frac{\epsilon''}{(\epsilon' + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon''^2} \quad (7)$$

Esta ecuación puede obtenerse también a partir de argumentos puramente electrostáticos.⁸⁶ Nótese que C_{ext} es proporcional a R^3 , mientras que la densidad numérica disminuye con R^3 para una cantidad dada de material coloidal. De aquí que el coeficiente de absorción sea independiente del tamaño de partícula. Esto es así para partículas de tamaño de hasta 30 nm, donde la dispersión empieza a ser ya significativa. En el otro extremo de la escala, partículas pequeñas menores de 5-10 nm en diámetro, las propias propiedades del material cambian, lo que resulta en cambios en la función dieléctrica, $\epsilon(\omega)$ y, por tanto, en las propiedades ópticas del material. Un detalle curioso de la ecuación (7) es que no hay absorción si $\epsilon''=0$, pero tampoco si $\epsilon''=\infty$.

Las ecuaciones anteriores relacionan la cantidad de luz dispersada o absorbida por una partícula esférica en una cierta disolución con las propiedades dieléctricas de la partícula y del disolvente. Las funciones dieléctricas son difíciles de calcular a partir de primeros principios y, normalmente, se usan datos experimentales en los cálculos. Sin embargo, en el caso de muchos metales, la absorción en la región visible y hasta la frecuencia del plasma masivo (en el UV cercano) está dominada por el comportamiento del electrón libre, y la respuesta dieléctrica se describe bien mediante el modelo clásico de Drude. De acuerdo con esta teoría,⁸⁷ se asigna una masa libre m_e y una velocidad v al electrón dentro del metal. El electrón es acelerado por el vector campo eléctrico de la radiación incidente de frecuencia ω ,

$$E = E_0 \cdot \exp(-i\omega t) \quad (8)$$

Mientras es acelerado el electrón en el metal, experimenta colisiones con la red, con otros electrones y con impurezas a una velocidad proporcional a su velocidad. Estas colisiones reducen inmediatamente su velocidad a cero. Entonces, la velocidad promedio del electrón puede calcularse de manera aproximada como $e \cdot E \cdot \tau / m$, donde τ es el tiempo entre colisiones. La ecuación del movimiento es, entonces:

$$m \cdot x'' + \gamma \cdot x' = e \cdot E \quad (9)$$

El término γ ($=\tau^{-1}$) representa la pérdida viscosa debida a colisiones. Esto es similar a la ecuación del movimiento para un oscilador armónico simple, pero con la fuerza restauradora llevada a cero. En un enlace químico, el desplazamiento del electrón

provoca una fuerza restauradora debido a la carga nuclear positiva en el ion, que “empuja” al electrón de vuelta hasta su longitud de enlace de equilibrio.

En un metal, la carga nuclear esta apantallada por otros electrones de conducción vecinos, de manera que los electrones no experimentan fuerza restauradora. La única perdida es el arrastre “viscoso” del electrón cuando pierde energía a través de colisiones en la red, lo que da lugar a que la energía se convierta en fonones. Si se retiene la fuerza restauradora en las ecuaciones se ve el efecto en las conclusiones globales. Entonces,

$$m \cdot x'' + \gamma \cdot x' = e \cdot E_o \cdot \exp(-\omega t) \quad (10)$$

La solución de estado estacionario para esta ecuación es:

$$x = \frac{eE/m}{\omega_o^2 - \omega^2 - i\omega_d\omega} \quad (11)$$

Aquí se ha usado $\omega_o^2 = k/m$ y $\omega_d = \gamma/m$ y, ω_o es la frecuencia de resonancia del oscilador. Así, para una $\omega_o \neq 0$, habrá cierta frecuencia para la que x sea mínima, cerca de ω_o . También es importante el hecho de que por debajo de ω_o , los electrones tienen un desplazamiento x en la misma dirección que el campo aplicado, E . Por encima de ω_o , el desplazamiento es en dirección opuesta al campo. Si tenemos N , de tales electrones libres por unidad de volumen, entonces crearán un dipolo $P = N \cdot e \cdot x$ cuando los electrones oscilen a la frecuencia directora de la radiación. Para un material masivo mantenido entre dos placas paralelas, la función dieléctrica lineal se define como:

$$P = \chi \cdot \epsilon_o \cdot E = \epsilon_o(\epsilon - 1)E \quad (12)$$

Insertando la ecuación (12) en la (11), se obtiene:

$$\epsilon(\omega) = 1 + \frac{N \cdot e^2 / m \cdot \epsilon_o}{\omega_o^2 - \omega^2 - i\omega_d\omega} \quad (13)$$

Las partes real e imaginaria de la función dieléctrica pueden escribirse:

$$\epsilon'(\omega) = 1 + \frac{(\omega_o^2 - \omega^2)\omega_p^2}{(\omega_o^2 - \omega^2)^2 + \omega_d^2\omega^2} \quad (14)$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{\omega_d \cdot \omega_p^2 \cdot \omega}{(\omega_o^2 - \omega^2)^2 + \omega_d^2\omega^2} \quad (15)$$

Sin embargo, para los electrones libres, ω_o es cero y, para este caso especial, se obtiene:

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon^\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \omega_d^2} \quad (16)$$

$$\varepsilon''(\omega) = \frac{\omega_p^2 \cdot \omega_d}{\omega \cdot (\omega^2 + \omega_d^2)} \quad (17)$$

ε^∞ es la constante dieléctrica a alta frecuencia debido a transiciones interbanda y de núcleo y ω_p es la frecuencia del plasma masivo,

$$\omega_p^2 = \frac{N \cdot e^2}{m \cdot \varepsilon_0} \quad (18)$$

en términos de N, la concentración de electrones libres en el metal y m, la masa efectiva del electrón. Nótese el hecho peculiar de que el electrón libre en el metal puede considerarse como un oscilador donde $\omega_0=0$. Esto significa que, para todas las frecuencias, los electrones oscilantes están fuera de fase con el campo aplicado. Esto resulta en que ε' será negativa en un amplio intervalo, no sólo en torno a una cierta frecuencia de absorción ω_0 .

A partir de la ecuación (16) puede verse que, sobre el régimen completo de frecuencias situadas por debajo de la frecuencia del plasma masivo de un metal, ε' es negativo, lo que se debe al hecho de que el campo de polarización es mayor y de signo opuesto al campo aplicado. En una partícula metálica pequeña, el dipolo creado por el campo eléctrico de la onda de luz proporciona una carga de polarización superficial que actúa efectivamente como una fuerza restauradora para los “electrones libres”. El resultado neto es que la absorción de larga longitud de onda en el metal masivo se condensa en una única banda de plasmón superficial.

1.4.2. Efectos del tamaño.

Resulta que, para metales, la superficie empieza a afectar las propiedades del metal cuando las partículas se encuentran en el intervalo de tamaños entre 10-50 nm, y para un trabajo preciso de las propiedades ópticas de las NPs se debe introducir una corrección de la función dieléctrica para las partículas de metal pequeñas. Para un metal masivo, ω_d es la frecuencia de relajación o amortiguamiento que se relaciona con la trayectoria libre media de los electrones de conducción, R_{bulk} , y la velocidad de los electrones a la energía de Fermi, v_F , viene dada por:

$$\omega_d = \frac{v_F}{R_{bulk}} \quad (19)$$

Ajustando este valor a los datos experimentales se obtienen valores de R entre 10.8 y 37 nm para Au y, de aproximadamente 52 nm para Ag. En el modelo de Drude, esta longitud representa colisiones del electrón con la red (acoplamiento de fonón) y defectos. Cuando el radio de la partícula, R, es menor que el recorrido libre medio en el metal masivo, los electrones de conducción son dispersados adicionalmente por la superficie y el recorrido libre medio, R_{eff} , se hace dependiente del tamaño con:

$$\frac{1}{R_{eff}} = \frac{1}{R} + \frac{1}{R_{bulk}} \quad (20)$$

La ecuación (20) se ha verificado experimentalmente por el trabajo de Kreibig para partículas de Ag y Au de hasta 2 nm.⁸⁸ La ventaja del modelo de Drude es que permite cambios en el espectro de absorción que se interpretan directamente en términos de propiedades materiales del metal. De las ecuaciones (16) y (19) puede verse que disminuciones en el tamaño de partícula conducen a un aumento en ω_d causando un ensanchamiento de la banda y una disminución de la intensidad máxima.

La posición del pico no se afecta virtualmente por cambios pequeños en ω_d pero, para grandes amortiguamientos se produce un lento desplazamiento hacia energías más bajas. Para partículas muy pequeñas (< 1-2 nm), la cuantización de los niveles de energía dentro de la banda de conducción tiene lugar cuando el carácter metálico de la banda empieza a desaparecer y la banda de plasmón característica de los electrones deslocalizados se descompone en bandas discretas debidas a transiciones ópticas de un solo electrón. En el caso de la plata, la cuantización resulta en un desplazamiento hacia el azul y una descomposición en bandas de excitación discretas en el intervalo de 260 a 395 nm.⁸⁹ En definitiva, el origen de los fuertes cambios de color mostrados por las pequeñas partículas recae en el denominador de la ecuación (7), que predice la existencia de un pico de absorción cuando:

$$\varepsilon' = -2\varepsilon_m \quad \text{si } \varepsilon'' \text{ es pequeña} \quad (21)$$

Para metales esto da lugar a una nueva banda de absorción que altera el color dramáticamente cuando disminuye el tamaño.

1.4.3. Efecto del índice de refracción del disolvente.

Una de las consecuencias más obvias de la ecuación (21) para la banda de plasmón superficial es que la posición del pico se afectará por las propiedades dieléctricas del disolvente, $\epsilon_m = n^2$, donde n es el índice de refracción del medio (no absorbente). Usando las ecuaciones (16) y (18) se encuentra que para pequeño ϵ'' , la posición de la banda obedecerá la siguiente ecuación:

$$\lambda^2 = \lambda_p^2 (\epsilon_\infty + 2\epsilon_m) \quad (22)$$

donde $\lambda_p^2 = \frac{(2\pi c)^2}{\omega_p^2}$

siendo λ_p la longitud de onda del plasma masivo del metal. A partir de una representación de la posición de la banda observada en diferentes disolventes vs. $2\epsilon_m$, pueden extraerse tanto la constante dieléctrica a alta frecuencia como la frecuencia del plasma masivo. La adherencia de los datos experimentales a la ecuación (22) demuestra que la absorción de luz por las partículas sobre la región espectral se debe a la absorción de los electrones de conducción, más bien que a las transiciones interbanda. Esta ecuación es solo una aproximación, pero trabaja bien para metales donde la transición interbanda no influye mucho. En el caso del oro, es necesario usar las ecuaciones de Mie completas y los efectos de tamaño para obtener una buena concordancia con los datos experimentales. Además, deberían usarse los datos dieléctricos para el material policristalino.

1.5. Plasmónica.

Las resonancias plasmónicas en esferas pueden abarcar un intervalo de longitudes de onda relativamente estrecho (unas pocas decenas de nm) variando el diámetro de la NP, mientras que las formas anisotrópicas proporcionan un grado de libertad adicional que permite controlar las longitudes de onda de resonancia del plasmón yendo desde la zona visible hasta el IR cercano, variando la AR de las NPs.

Las propiedades inusuales de las NPs metálicas están relacionadas con la presencia de plasmones fuertes en las regiones visible y NIR del espectro electromagnético. Las resonancias de plasmón existen en todos los metales y se refieren a la excitación coherente y colectiva de los electrones deslocalizados en la banda de conducción por un

campo electromagnético externo (EM) que actúa como fuerza directora. De forma similar al dibujo ilustrativo de un oscilador dirigido en mecánica clásica, aquí la frecuencia de la onda de luz incidente entra en resonancia con la frecuencia característica de los electrones libres en el metal (la frecuencia del plasma) dirigiendo el movimiento del electrón con la amplitud del campo de la luz. En NPs metálicas, las resonancias de plasmón existen en la interfase entre el metal y un dieléctrico, y son confinadas lateralmente debido a las dimensiones en la nanoescala de las NPs. Por ello son llamadas resonancias de plasmón superficial (LSPR). La longitud de onda de LSPR depende de la función dieléctrica tanto del metal, ϵ , como del medio que lo rodea, ϵ_m , así como de la morfología de la NP y el número de electrones deslocalizados.

Cuando la longitud de onda de excitación es típicamente mucho mayor que las dimensiones de la NP ($\lambda \gg r$), los modos LSPR poseen de forma dominante un carácter dipolar. En el caso de una esfera (isotrópica), se induce un dipolo a lo largo del vector campo eléctrico de la onda de luz. El momento correspondiente, μ_{ind} , está determinado por el campo electromagnético incidente $E_o(\omega_o)$ y la polarizabilidad α (el grado de facilidad con que la nube electrónica puede ser desplazada) de la NP ($\mu_{ind} = \alpha \cdot E_o(\omega_o)$).

La situación de las NPs anisotrópicas es más compleja. Como α es un tensor, sus componentes pueden diferir a lo largo de los tres ejes y pueden existir varios modos de dipolo, dependiendo de la simetría y orientación de la NP. Esto se muestra para los NRs (Figura 2) que pueden acomodar dos LSPRs dipolares diferentes, llamados modo transversal (oscilación electrónica perpendicular al eje principal del NR) y modo longitudinal (oscilación electrónica paralela al eje principal). La longitud de onda del modo longitudinal está aquí desplazada significativamente con respecto a la del modo transversal, debido a su valor más alto de α (Figura2).

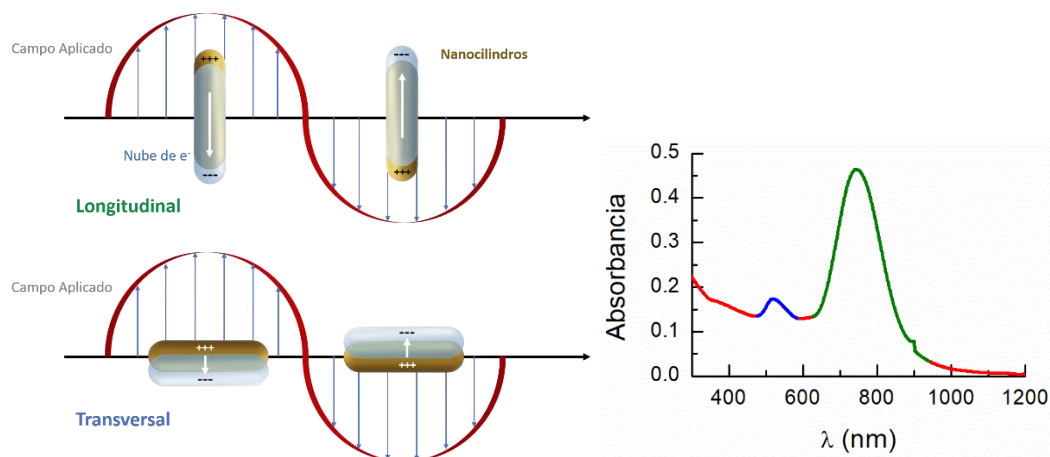


Figura 2. Modos LSPR longitudinal y transversal en un NR. Espectro UV-visible-NIR.

Las longitudes de onda de LSPR en NRs pueden sintonizarse simplemente variando la AR. Los espectros típicos muestran dos bandas que corresponden a los modos longitudinal y transversal. Mientras que la intensidad de la banda transversal es relativamente baja y prácticamente independiente de la AR, la LSPR longitudinal es mucho más intensa y fuertemente dependiente de la AR. Los modos de plasmón en NRs dan lugar a regiones con campos EM intensos, en la proximidad de la NP.

Después de la excitación resonante de LSPRs fuertes, se genera en la superficie de la NP un campo electromagnético local aumentado (*near field*), $E_{loc}(\omega_0)$. Este campo cercano se acopla con el campo incidente y reemite radiación con la misma longitud de onda (*scattering* resonante). Ya que la sección transversal de *scattering* es proporcional a α^2 , también el campo cercano aumenta fuertemente para NPs anisotrópicas debido a su α más alto, comparado con las esferas. Las NPs elongadas o aquellas con ejes y esquinas, tales como NRs, nano-cubos y nano-triángulos (NTs), generan fuertes campos cercanos concentrados en los vértices. Atrapando las cargas metálicas oscilantes en espacios altamente confinados, se inducen campos cercanos más fuertes. Estas áreas de campo cercano altamente localizadas se conocen como puntos calientes (*hot-spots*) intrínsecos. Por otra parte, los *hot-spots* extrínsecos, se generan cuando las NPs se posicionan a muy cortas distancias (1-10 nm) o en un soporte sólido. El acoplamiento de modos de plasmón entre NPs individuales o entre una partícula y una superficie metálica plana conduce a nuevos modos con campos EM altamente localizados e intensos en los estrechos *gaps* dentro de las uniones.

Cuando la NP se irradia bajo condiciones fuera de resonancia, el campo cercano resultante es significativamente más bajo y menos confinado que bajo condiciones de resonancia. El *scattering* de resonancia se hace generalmente más dominante sobre la absorción cuando el tamaño de la NP aumenta. Así, tanto la absorción como el *scattering* de resonancia generado por las NPs aumentan fuertemente a las longitudes de onda LSPR. Por tanto, la medida de extinción (la suma de absorción más *scattering*) en el campo cercano refleja la excitación LSPR y el espectro del campo cercano resultante. En NPs grandes o aquellas con altas AR, las LSPRs con alto carácter multipolar (modos longitudinales cuadripolar y hexapolar) también pueden ser excitadas.

La eficiencia de la excitación LSPR (y de aquí la intensidad del campo cercano) se influye en gran medida por la constante dieléctrica del metal, $\epsilon(\omega)$, definida como una función de la frecuencia angular del campo aplicado: $\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega)$. La parte real $\epsilon'(\omega)$ refleja cómo se polariza el material al exponerse a un campo EM externo, mientras que la parte imaginaria $\epsilon''(\omega)$ representa cómo se amortiguan el LSPR y el campo cercano debido a las transiciones interbanda e intrabanda, colisiones electrón-fonón y *scattering* electrónico con la superficie. La Ag exhibe pérdidas más bajas en el visible y en el NIR, mientras que el Au muestra significativo amortiguamiento del plasmón a longitudes de onda por debajo de 600 nm. Estas propiedades dieléctricas hacen de la Ag el material de elección para aplicaciones en el visible (350-650 nm). En la práctica, sin embargo, el uso de NPs de Ag es limitado debido a su mayor reactividad y susceptibilidad a la oxidación. Por otra parte, Au es un material eminentemente inerte, de manera que la elección del material depende del tipo de requerimiento para cada aplicación específica.

1.6. *Surface Enhancement Raman Scattering (SERS)*

En *scattering* Raman, las moléculas interactúan con un campo EM incidente, $E_0(\omega_0)$, es decir, con un rayo láser intenso. Similar a los plasmones en NPs, dependiendo de la polarizabilidad de la molécula, se induce un dipolo oscilante que excita a la molécula a un estado virtual. En el dibujo clásico, el *scattering* puede describirse por la modulación del campo incidente a través de una molécula vibrando con una frecuencia

ω_{vib} por irradiación con un campo EM con frecuencia desplazada, $E_o(\omega_o)$, como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.

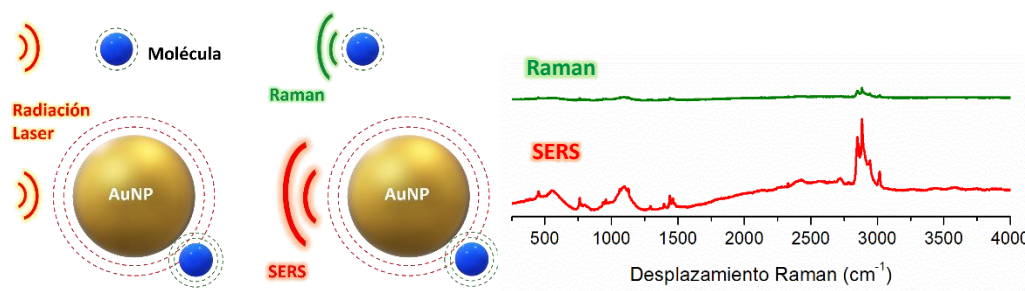


Figura 3. Mecanismo básico de SERS electromagnético. La AuNP aumenta el campo del láser y el de dispersión, aumentando la señal Raman de dispersión en la molécula.

El scattering Raman puede mejorarse dramáticamente cuando la molécula de interés esté cerca de una superficie metálica o, preferentemente, en contacto con la misma. Cuando la fuerza del campo EM atenúa como $1/r^2$, un típico valor de r para la distancia entre la molécula y la superficie de la NP es de 0-10 nm. La presencia de un campo plasmónico cercano en la superficie de la NP bajo excitación LSPR, $E_{\text{loc}}(\omega_o)$, aumenta α de la molécula (o más correctamente del conjunto molécula-NP) en 1 o 3 órdenes de magnitud comparado con las moléculas libres, debido a la excitación mutua entre el dipolo inducido en la molécula y el dipolo inducido en la NP. En otras palabras, la NP y la molécula dispersan el campo impactante, después de lo cual la NP irradia un campo EM aumentado localmente, que puede ser redispersado por la molécula conduciendo a una dispersión Raman aumentada.

En definitiva, la molécula irradia el campo dispersado Raman, que es entonces redispersado por la NP bajo excitación LSPR y se produce la reemisión de un campo cercano aumentado $E_{\text{loc}}(\omega_R)$ (con frecuencia desplazada). Esta situación se muestra en la Figura 3. La intensidad SERS, I_{SERS} , depende así de ambos campos incidente, $E_o(\omega_o)$, y dispersado, $E_{\text{loc}}(\omega_R)$, y el aumento SERS se alcanza cuando los campos entrante y saliente están en resonancia con el LSPR de la NP. Cuando las frecuencias de vibración molecular, ω_{vib} , son pequeñas comparadas con la frecuencia de excitación, ω_o , el desplazamiento del campo saliente ($\omega_o - \omega_{\text{vib}} = \omega_R \approx \omega_o$) es también pequeño y el factor de aumento (EF) puede aproximarse a la cuarta potencia del aumento del campo EM local en la superficie de la partícula:

$$EF = \frac{I_{SERS}}{I_{Raman}} = \frac{(E_{loc}(\omega_o))^2 \cdot (E_{loc}(\omega_R))^2}{(E_o(\omega_o))^2 \cdot (E_o(\omega_R))^2} \approx \frac{(E_{loc}(\omega_o))^4}{(E_o(\omega_o))^4} \quad (23)$$

En el contexto de las aplicaciones prácticas, esta conclusión tiene un impacto importante en cómo las NPs podrán diseñarse para maximizar el aumento del campo EM y, de aquí, la salida SERS. En este caso, la morfología de las NPs juega un papel clave. Este mecanismo se conoce como electromagnético. Es de destacar que requiere de la presencia de una molécula, pero no depende de su naturaleza.

Si la molécula se une a la superficie de la NP, la interacción electrónica entre el orbital molecular y la banda de conducción de la NP puede dar lugar a nuevas resonancias de transferencia de carga, que pueden acoplarse con estados vibracionales de la molécula (adsorbida). Esto puede dar lugar a una reasignación de la densidad electrónica en la molécula y a un cambio de α durante el movimiento vibracional, conduciendo a un adicional aumento SERS con EFs de 10^1 - 10^3 . Este efecto, conocido como mecanismo químico, es generalmente mucho menor que el efecto electromagnético, pero puede mejorar la sensibilidad SERS cuando las resonancias de transferencia de carga, LSPR y longitud de onda incidentes se emparejan.

Si las resonancias electrónicas de la molécula o más bien, el complejo adsorbato-NP están involucrados, la sección transversal Raman y de aquí, la intensidad de la señal, aumentan adicionalmente debido a una dispersión Raman resonante aumentada por superficie (SERRS).

Para evaluar la actuación de diferentes estructuras y morfologías de NPs, sus respuestas SERS deben compararse usando una referencia adecuada. El método establecido para ello es la determinación de EF. El EF se define como la relación entre las intensidades SERS y la ordinaria Raman (RS) para un modo molecular dado, ambos medidos bajo las mismas condiciones experimentales. Las intensidades I_{SERS} y I_{RS} deben normalizarse por el número de moléculas involucradas en RS (N_{RS}) y SERS (N_{SERS}). La estimación de EF entonces resulta en:

$$EF = \frac{I_{SERS} \cdot N_{RS}}{I_{RS} \cdot N_{SERS}} \quad (24)$$

La medida de EFs a partir de disoluciones coloidales conduce a la determinación del llamado EF analítico. En realidad, estos son mucho más pequeños comparados con los

de superficies secas, pero en su lugar, se recoge un número de moléculas estadísticamente más relevantes.

Los NRs son indudablemente las NPs anisotrópicas más utilizadas como sustratos SERS. Sintonizar la LSPR en relación con la λ_{exc} del láser para producir una medida en resonancia, es una de las claves más importantes para alcanzar un aumento Raman alto. Esto se ha confirmado en estudios de SERS en Ag- y AuNRs con AR desde 1.7 a 16 usando excitación a 633 nm.⁹⁰ Los autores demostraron varios aspectos: AgNRs generan EF más altos que AuNRs a 633 nm; los EFs de AgNRs aumentan con la AR mientras que los de AuNRs, disminuyen. Esto se explica por el desplazamiento al rojo de la LSPR al aumentar AR dirigiendo la resonancia hacia la excitación, en el caso de Ag, y fuera de la λ de excitación, en el caso de Au. Aunque los NRs con LSPRs que no coinciden con la λ de excitación (fuera de resonancia) pueden mostrar relativamente altos EFs (10^4 - 10^6), en el caso de resonancia se estiman aumentos de 1 o 2 órdenes de magnitud más grandes. El grupo de El-Sayed comparó SERS en AuNRs vs. AuNPs esféricas bajo condiciones fuera de resonancia⁹¹ y los EFs medidos (10^4 - 10^5) fueron 2 órdenes de magnitud más elevados que los esperados del mecanismo electromagnético, indicando una importante influencia del fenómeno químico. La actividad SERS fue más alta para AuNRs que para AuNPs, lo que se explica por la presencia de más facetas reactivas en AuNRs. El mismo grupo ha publicado un estudio comparando AuNRs y AgNRs con similar AR y posiciones de la banda LSPR,⁹² confirmándose que los AgNRs son más eficientes que los AuNRs. Esto lo atribuyen a la mayor intensidad de campo del plasmón en las puntas de las AgNRs y al mayor scattering Rayleigh en los AuNRs. Debe tenerse cuidado con las condiciones experimentales al comparar las eficiencias SERS de diferentes NRs.⁹³

Los nanoplatos son NMs en los que una de las dimensiones es mucho menor que las otras dos. A estos NMs se les han dado diversos nombres, por ejemplo, nanoprismas o nanodiscos, cuando tienen una base poligonal o circular respectivamente. En el caso específico de bases triangulares se habla de nanotriángulos (NT). Los NTs son de especial interés a causa de sus esquinas y ejes agudos, ya que pueden confinar los campos EM y, por tanto, dar lugar a fuertes aumentos. Los NTs presentan resonancias de plasmón sintonizables que pueden seleccionarse cambiando la AR (eje/espesor). Por ejemplo, un aumento en AR produce un desplazamiento hacia el rojo del LSPR dipolar. Además, los

NTs presentan diferentes grados de truncamiento dependiendo del método de síntesis y las condiciones de preparación. La truncación puede usarse para sintonizar la LSPR dipolar, conduciendo a un desplazamiento al azul en el espectro cuando el tamaño del recorte de la esquina perdida aumenta. Por tanto, los NTs son excelentes sustratos SERS, lo que no solo está relacionado con su capacidad de generar altos aumentos del campo EM, sino también con permitir la sintonización, que puede adaptarse convenientemente a la λ del láser para excitación.

Los NTs se han usado poco todavía debido a la dificultad de su síntesis, ya que normalmente se obtienen formando mezclas con otras formas. Los métodos de síntesis existentes incluyen los inducidos por luz y los químicos húmedos, en los que moléculas surfactantes tales como polivinil-pirrolidona (PVP), CTAC o CTAB, así como haluros, actúan como agentes químicos dirigiendo la forma y guiando a la NP a crecer en forma de platos. Recientes avances en métodos químicos húmedos coloidales y, especialmente, en las etapas de purificación post-síntesis han conseguido que se alcancen altos rendimientos, así como monodispersidad mejorada. En este sentido, Scarabelly y col.⁹⁴ han descrito recientemente la síntesis de AuNTs con tamaños entre 60 y 150 nm y rendimientos por encima del 50% que podrían aumentarse hasta el 95% por purificación.

Puede ser difícil comparar la actuación SERS de diferentes NTs, ya que pequeños cambios morfológicos pueden conducir a significativas variaciones LSPR y, en definitiva, a cambios fuera de las λ de excitación del láser. Sin embargo, hay un acuerdo común en que las esquinas agudas son extremadamente ventajosas para obtener altos aumentos SERS.

1.7. Estabilidad coloidal.

Las teorías sobre doble capa en coloides se han construido en base a los modelos desarrollados por Helmholtz en 1879 y Grahame en 1947 aplicados al electrodo de mercurio. El modelo de Grahame incluye, además de las ideas de Helmholtz, los trabajos de Stern, Gouy y Chapman. La idea básica de este modelo clásico es que la carga superficial adsorbida y la creación de un potencial eléctrico sobre la superficie de la partícula provocan la existencia de un exceso local de contraiones alrededor de la

misma. Estos contraiones forman una capa difusa alrededor de la partícula y hacen que el potencial eléctrico disminuya lentamente hasta cero, conforme nos alejamos desde la superficie hacia el seno de la disolución.

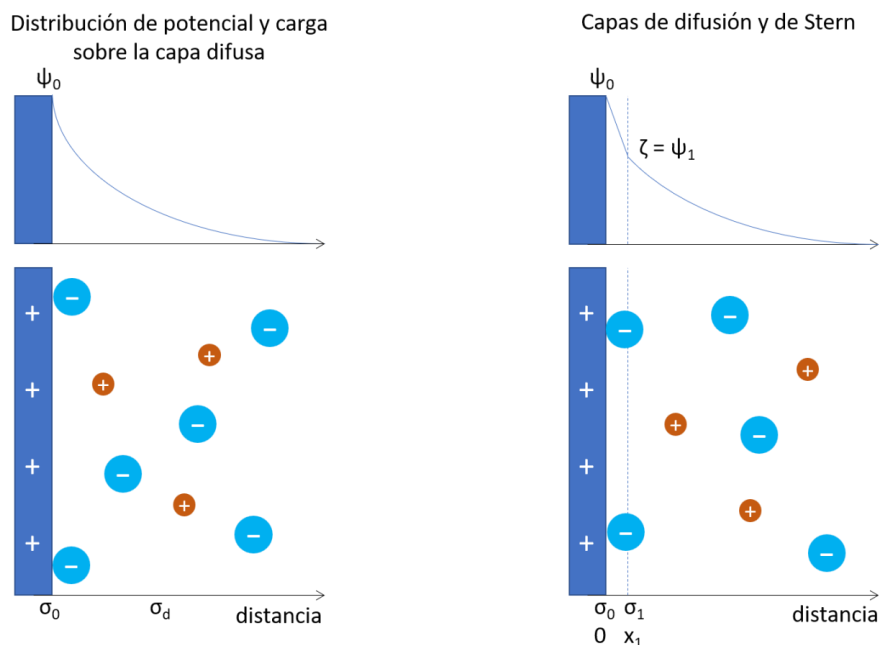


Figura 4. (Izqda) Modelo que ilustra la distribución de iones y la caída de potencial en la capa difusa alrededor de una partícula coloidal. (Dcha) Modelo que ilustra la idea del plano de Stern o capa de Helmholtz en el que algunos iones se encuentran a una distancia definida de la superficie. La capa difusa comienza en x_1 donde el potencial es Ψ_1 . Este plano se asume que está cerca del plano de deslizamiento, y el potencial en este plano es el potencial Z .

Sin embargo, alguno de estos iones puede adsorberse fuertemente a la superficie, formando un plano de cargas de signo opuesto que disminuirá el potencial eléctrico en la región inmediatamente adyacente a la superficie de la partícula. Esta región se conoce como capa de Helmholtz o Stern y se compone tanto de moléculas de agua fuertemente polarizadas como de iones solvatados.

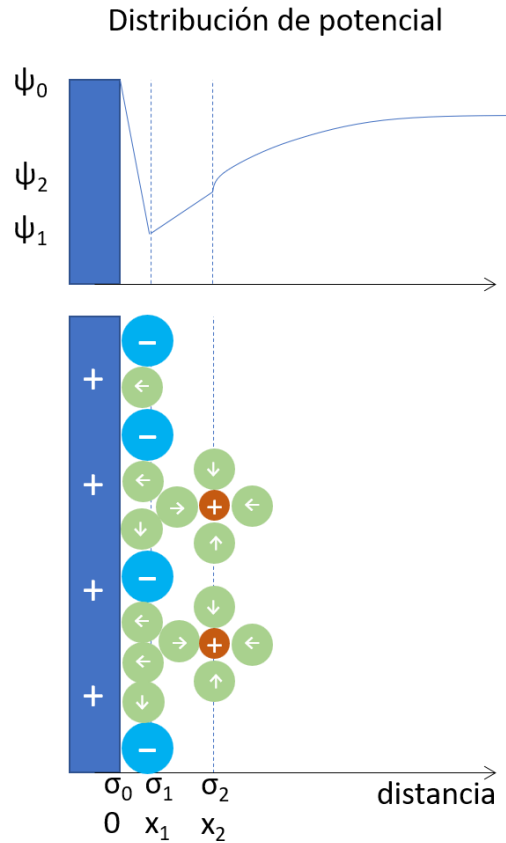


Figura 5. Modelo que muestra la idea de adsorción específica donde se genera una carga superficial entre la superficie y el plano de Stern. Un segundo plano que define la distancia de máxima aproximación de los iones hidratados se muestra a una distancia x_2 . Las esferas más pequeñas son moléculas de agua con dipolos orientados.

El plano de adsorción se localiza a una distancia x_1 de la superficie y la permitividad relativa en la región $0 < x < x_1$ es ϵ_1 . El valor de ϵ_1 es muy bajo (entre 2 y 6) comparado con el valor de ϵ del agua en el seno de la disolución (que es 78). La drástica disminución se debe a la pérdida de polarización rotacional de las moléculas de agua orientadas. Ya que la distancia de estos iones a la superficie es de solo 3 Å, la carga superficial y la carga opuesta pueden tratarse como un condensador de placas paralelas con una capacidad por unidad de área de:

$$K_1 = \frac{\sigma_o}{\psi_o - \psi_1} = \frac{\epsilon_1 \cdot \epsilon_o}{x_1} \quad (25)$$

donde $\epsilon_1 \cdot \epsilon_o$ es la permitividad de la capa y σ_o la densidad de carga superficial. Como consecuencia, el potencial en x_1 se reduce a:

$$\psi_1 = \psi_o - \frac{\sigma_o}{K_1} = \psi_o \frac{\sigma_o}{\epsilon_1 \epsilon_o} \quad (26)$$

Normalmente, los iones adsorbidos electrostáticamente en el plano de Helmholtz no neutralizan completamente la carga superficial, pero si hay una energía química de adsorción, la carga adsorbida de signo contrario excederá a la *verdadera* carga superficial y podrá invertirse la carga total de la partícula. Esto se muestra en la Figura 5, donde puede observarse que el potencial cambia de signo antes de caer a cero en el seno de la disolución. Los iones o moléculas situados en la capa de Helmholtz se encuentran tan fuertemente unidos que un campo eléctrico aplicado al coloide causará el movimiento de la partícula, de la carga adsorbida de signo contrario y la formación de la monocapa o submonocapa de moléculas de disolvente. De aquí que la carga efectiva en la unidad electroforética no se deba únicamente a la carga superficial, sino que, en general, es reducida por la presencia de un plano de contraiones adsorbidos.

En el modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame (Figura 5) se define también un segundo plano estructural a una distancia x_2 , que es la distancia de máxima aproximación de los iones solvatados al plano x_1 , si se tiene en cuenta el tamaño finito de los iones y sus esferas de hidratación. Este segundo plano se conoce como plano exterior de Helmholtz (OHP), siendo el plano en x_1 el plano interior de Helmholtz (IHP). En este caso, el potencial eléctrico disminuye adicionalmente entre el plano interno de los aniones adsorbidos y el OHP donde se encuentran los contraiones. Es el potencial en el plano x_2 el que orienta efectivamente a otros iones de la disolución e induce la construcción de una lámina espacial de carga de contraiones (capa difusa) alrededor de la partícula.

La electroneutralidad requiere que, en total, el exceso de densidad de carga alrededor de la partícula cargada en la capa difusa σ_d sea igual a la densidad de carga en la partícula, es decir:

$$\sigma_o + \sigma_1 + \sigma_d = 0 \quad (27)$$

El potencial eléctrico de cualquier punto en la capa difusa se calcula a partir de la ecuación de Poisson:

$$\nabla^2 \psi = \frac{-\rho}{\epsilon_r \epsilon_o} \quad (28)$$

Para un electrolito simétrico (z:z), la densidad de carga en un punto de la disolución es:

$$\rho = |z| \cdot e(|n_+| - |n_-|) \quad (29)$$

donde $|z|$ es la valencia del electrolito y $|n_+|$ y $|n_-|$ las respectivas concentraciones iónicas en ese punto de la disolución. Asumiendo que los iones están distribuidos en el campo eléctrico de acuerdo con la ecuación de Boltzmann, en cualquier punto se cumple:

$$|n_{\pm}| = |n_{\pm}^{\infty}| \cdot \exp\left(\frac{-z_{\pm} \cdot e \cdot \psi}{kT}\right) \quad (30)$$

donde n^{∞} es la concentración iónica en la disolución en unidades de moléculas por unidad de volumen y ψ es el potencial en ese punto en relación con el seno de la disolución donde se define $\psi(\infty)=0$. Combinando las ecuaciones (28) a (30) se obtiene la ecuación de Poisson-Boltzmann:

$$\nabla^2 \psi = 2 \frac{n^{\infty} \cdot z \cdot e}{\epsilon_r \epsilon_0} \cdot \sinh\left(\frac{z \cdot e \cdot \psi}{kT}\right) \quad (31)$$

Las condiciones de contorno para la integración son:

$$\psi \rightarrow 0 \text{ cuando } x \rightarrow \infty \quad (32)$$

$$d\psi/dx \rightarrow 0 \text{ cuando } x \rightarrow \infty \quad (33)$$

mientras que, al comienzo de la capa difusa el potencial debe ser ψ_1 :

$$\psi(x = x_1) = \psi_1 \quad (34)$$

La solución de la ecuación de Poisson-Boltzmann no es directa. Las soluciones simplificadas teniendo en cuenta una serie de condiciones (superficies planas y curvas, potenciales superficiales altos y bajos) se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Soluciones de la ecuación de Poisson-Boltzmann para micro- y nanopartículas.

	Bajo κa	Alto κa
Bajos potenciales	$\psi(r) = \psi_0 \frac{a}{r} \exp[-\kappa(r - a)]$	$\psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa x)$
Altos potenciales	$\nabla^2 \psi = \frac{2zn^\infty e}{\epsilon_r \epsilon_0} \sinh\left(\frac{e\psi}{kT}\right)$	$\tanh\left(\frac{ze\psi(x)}{4kT}\right)$ $= \tanh\left(\frac{ze\psi_0}{4kT}\right) \exp(-\kappa x)$
donde $\kappa^2 = \frac{2z^2 e^3 n^\infty}{\epsilon_r \epsilon_0 kT}$		

En el caso de NPs, la doble capa debe considerarse esférica ya que, para diámetros en torno a 10 nm no puede aplicarse la aproximación de capa plana.

La integración de la ecuación (31), por tanto, se debe hacer con coordenadas esféricas y, para el caso de pequeños potenciales, la linealización e integración da:

$$\psi(r) = \psi_1 \cdot \frac{a}{r} \cdot \exp(-\kappa(r - a)) \quad (35)$$

Sin embargo, un potencial superficial menor de 25 mV es normalmente insuficiente para evitar la coalescencia de las partículas. Así, aunque la simplificación da soluciones más tratables, no proporciona resultados apropiados para los coloides estables con potenciales superficiales superiores a este valor, por lo que el uso de esta forma linealizada es inadecuado.

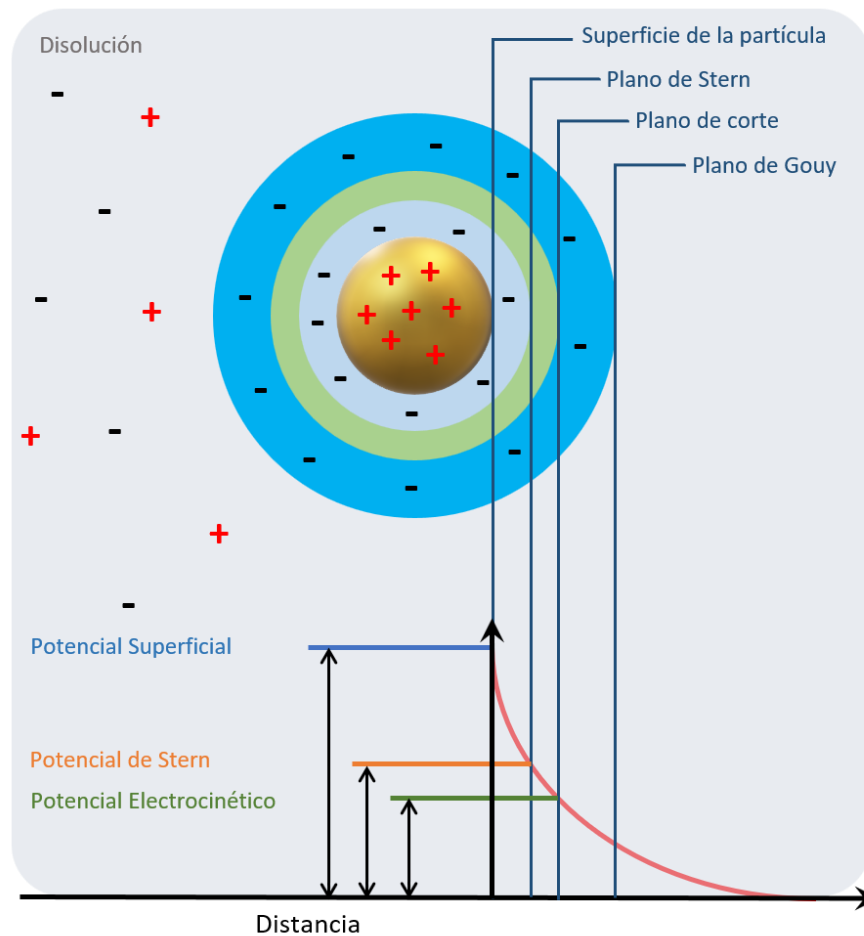


Figura 6. Modelo de Gouy-Chapman-Stern.

La presencia de la capa difusa alrededor de una partícula coloidal estabilizada electrostáticamente es esencial, ya que la repulsión experimentada por dos partículas coloidales cuando sus dobles capas solapan es lo que las estabiliza frente a la coagulación. Un potencial de capa difusa alto y una concentración de electrolito baja, la cual aumenta el rango de repulsión, son necesarias para una buena estabilidad coloidal. Es usual considerar el potencial en x_1 igual al potencial zeta medido mediante electroforesis, que es el potencial aparente en la partícula cuando migra en un campo eléctrico. Cuando se habla de estabilización electrostática se está ignorando la posibilidad de que las partículas puedan ser estabilizadas por polímeros o grandes surfactantes, los cuales pueden proporcionar una barrera estérica a la coalescencia.⁹⁵

Se puede ahora escribir la distribución de potencial total entre el metal o la superficie de la partícula aislada y la disolución para una partícula sumergida en una disolución acuosa. Para el modelo de la Figura 6:

$$\psi(x_1) = \psi_o - \sigma_o \frac{x}{x_1} K_1 \quad 0 < x < x_1 \quad (36)$$

$$\psi(x > x_1) = f(\kappa, a, \psi_1) \quad (37a)$$

$$\psi_o = E_{redox} - E_{pzc} \quad (37b)$$

Aquí, $f(\kappa, a, \psi_1)$ se refiere a una de las soluciones de la Tabla 1. Incluso para un modelo con una única región interna hay un número determinado de variables experimentales que necesitan ser medidas para cuantificar la distribución de potencial. Dado que ε_1 y x_1 no son accesibles directamente por verificación experimental, tales simplificaciones son a menudo aconsejables. Por ejemplo, asumiendo que no hay adsorción específica desde la disolución, se puede hacer $\sigma_1 = 0$ y, en este caso, $\sigma_o = -\sigma_d$. Sin embargo, esto es claramente una aproximación pobre si se ha usado polielectrolito o surfactante para estabilizar las partículas o un ligando fuerte quimisorbido, tal como un derivado tiol, para minimizar el crecimiento de la partícula durante la preparación.

Para el caso de bajos potenciales y pequeños solapamientos entre las dobles capas, la energía repulsiva electrostática para dos esferas de radio a con potencial zeta, ζ , que se aproximan una a la otra en un medio de longitud de Debye, κ^{-1} , siendo r la distancia centro a centro entre las dos partículas se define como:

$$V_{rep}(kT) = 4\pi\varepsilon_r\varepsilon_o\zeta^2\frac{a^2}{r}\exp\left[-\kappa a\left(\frac{r}{a}-2\right)\right] \quad r < 2 \quad (38)$$

Las fuerzas de Van der Waals que actúan entre las superficies causan la coalescencia de las partículas. La energía de interacción Van der Waals no retardada entre partículas de radio a viene dada aproximadamente por:

$$V_{att}(kT) = -\frac{A}{6}\left[\frac{2a^2}{r^2-4a^2} + \frac{2a^2}{r^2} + \ln\left(1 - \frac{2a^2}{r^2}\right)\right] \quad (39)$$

donde A es una constante conocida como constante de Hamaker para el sistema metal-agua-metal considerado. Los metales poseen constantes de Hamaker más altos que otros materiales, por lo que los coloides metálicos tienden a la coagulación más que otros coloides.

De acuerdo con la teoría Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), es la suma de estas dos energías (ec. 38 y 39) la que determina la estabilidad de la partícula. Se considera que una barrera de 15-20 kT es suficiente para asegurar la estabilidad coloidal.

1.7.1 Teoría DLVO

La estabilidad global de un coloide depende de la suma de los términos de energía atractiva y repulsiva en función de la distancia de separación de las partículas. Se considera que solo contribuyen dos factores: el término atractivo Van der Waals y el repulsivo de la doble capa, y se deja a un lado cualquier consideración de estabilización entrópica o estérica.

Para un electrolito 1:1 de valencia z y concentración c_o , el exceso de densidad de carga ρ_e en un punto de la doble capa eléctrica (EDL) de potencial ψ viene dado por:

$$[c^+ + c^-] \cdot z = \rho_e = z \cdot c_o \left[\exp\left(\frac{-ze\psi}{kT}\right) - \exp\left(\frac{+e\psi}{kT}\right) \right] \quad (40)$$

La ecuación electrostática de Poisson relaciona ρ_e con la variación de ψ y con la distancia a la superficie cargada x en la forma:

$$\frac{\delta^2\psi}{\delta x^2} = \frac{-\rho_e}{\varepsilon} \quad (41)$$

donde ε es la permitividad del medio. La ecuación de Poisson-Boltzmann se obtiene por combinación de las ecuaciones (40) y (41), y muestra que el potencial dentro de la EDL cae exponencialmente con la distancia en sistemas con potenciales superficiales relativamente altos y distancias bien alejadas de la superficie:

$$\psi = \left(\frac{4\pi T}{ze}\right) \exp(-\kappa x) \quad (42)$$

donde κ es el espesor de la EDL.

En términos de interacción de dos partículas que se aproximan, cuando la distancia de separación disminuye, las dos dobles capas eléctricas empiezan a solaparse. En una primera aproximación, los dos potenciales eléctricos que solapan son aditivos, resultando en una contribución eléctrica que se suma a la energía libre total del sistema y que, en este caso, constituye un término repulsivo, ya que el proceso aumenta la energía total. La forma del potencial de solapamiento de la EDL es también aproximadamente exponencial con la distancia de separación H . Para dos superficies

paralelas, la contribución de energía libre al término de repulsión electrostático viene dada por:

$$\Delta G_T = \left(\frac{64c_0kT}{\kappa} \right) \exp(-\kappa H) \quad (43)$$

donde κ es dependiente de la concentración de iones en el sistema y el efecto de la concentración primaria en la ecuación (43) procede del término exponencial.

Si se suman los términos atractivos de Van der Waals y el potencial repulsivo electrostático, la expresión para la energía potencial total será:

$$\Delta G_T = \left(\frac{64c_0kT}{\kappa} \right) \exp(-\kappa H) - \frac{A_H}{12\pi H^2} \quad (44)$$

donde A_H es la constante de Hamaker del material coloidal. Cuando esta ecuación se resuelve para diferentes concentraciones de electrolito se obtienen curvas como las de la Figura 7. El máximo en las curvas representa las barreras a la coagulación impuestas por la EDL. Obviamente, cuando la concentración de electrolito aumenta, la altura de la barrera disminuye. Como norma, las condiciones para la coagulación rápida se alcanzan cuando $\Delta G_T = 0$ y $d\Delta G_T/dH = 0$. Matemáticamente:

$$c_0 \propto \frac{1}{(A_H^2 z^6)} \quad (45)$$

que está de acuerdo con la regla de Schutze-Hardy, que predice relaciones de 1/0.016/0.0014 para iones de valencia 1, 2 y 3 respectivamente, y está de acuerdo con las observaciones experimentales apuntadas antes.

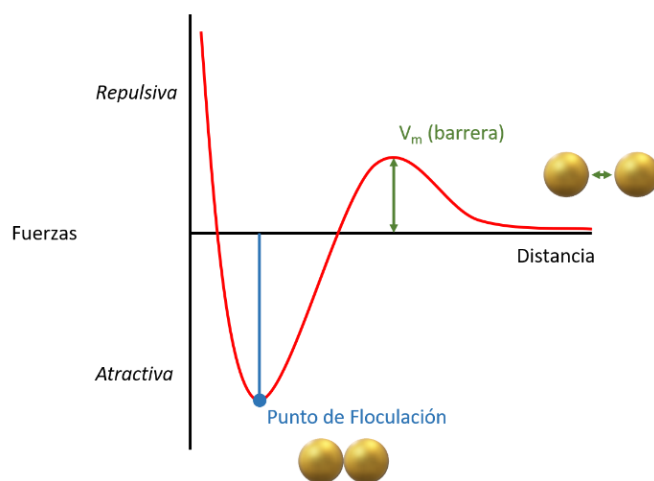


Figura 7. Fuerza resultante total atractiva-repulsiva en función de la distancia entre partículas.

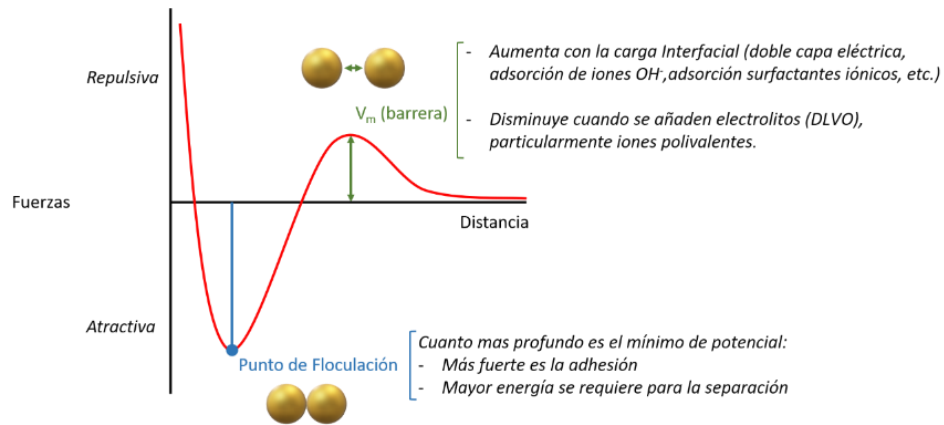


Figura 8. Significado físico de los diferentes conceptos de la teoría DLVO.

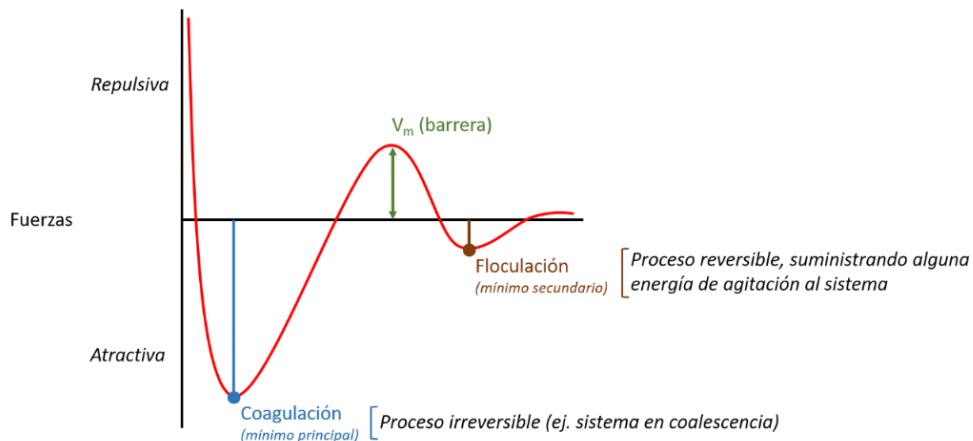


Figura 9. Caso en el que existe una barrera y un mínimo secundario.

Otra consecuencia de la ecuación (45) es que cuando la constante de Hamaker aumenta, los valores de condiciones para la coagulación rápida de dispersiones con las mismas características eléctricas disminuyen, esto es, las dispersiones coloidales se vuelven progresivamente menos estables. La constante de Hamaker en un medio viene dada por el promedio de las partículas dispersadas en el medio y en el vacío, de manera que, a medida que las características del medio y la fase dispersa se hagan más parecidas, A_H disminuirá, conduciendo a una estabilidad adicional para el sistema, de acuerdo con lo que se observa experimentalmente.

El hecho de que la teoría DLVO prediga la regla de Schultze-Hardy parecería confirmar la validez de la teoría. Sin embargo, se han incluido diferentes aproximaciones

y suposiciones en la derivación que la debilitan para asegurar éxito completo. Así, a bajos potenciales superficiales, la teoría predice que la condición para la coagulación rápida será proporcional a z^{-2} más bien que a z^{-6} . Una derivación más completa de la teoría (teniendo en consideración la adsorción específica de los iones y los efectos de hidratación) eliminaría alguna de las discrepancias encontradas en la teoría simple.

Una predicción importante de la teoría DLVO es que, bajo ciertas condiciones, un coloide puede sufrir una forma de floculación reversible debida a la existencia de lo que se conoce como mínimo secundario en la curva de energía potencial (Figura 9).

Una consecuencia importante y a veces útil de la interacción compleja entre los términos atractivo y repulsivo en la ecuación global para la estabilidad coloidal es la existencia del llamado mínimo secundario en la curva de energía total, normalmente a relativamente largas distancias interpartícula (Figura 9). El mínimo primario es, por supuesto, el pozo profundo de energía en el que cae el sistema en su búsqueda por la estabilidad "energética". Sin embargo, antes de alcanzar la barrera para entrar en ese pozo, un coloide puede encontrar un mínimo de energía más superficial del orden de unas pocas kT , donde pueden formarse pequeños agregados débiles.

La floculación débil en el mínimo secundario, a diferencia de la que ocurre en el mínimo primario, se encuentra a menudo sujeta a efectos entrópicos, conduciendo a fenómenos interesantes. A causa de la naturaleza superficial del mínimo secundario, los flóculos formados se mantienen unidos débilmente y tienden a ser inestables, es decir, pueden romperse por pequeños *inputs* de energía, tales como una agitación suave. De hecho, para partículas muy pequeñas (<100 nm), el mínimo puede ser tan superficial que el movimiento Browniano evite la floculación. Para partículas más grandes, el mínimo secundario puede causar efectos observables tales como una aparente separación de fases en una dispersión altamente ordenada o concentrada, exhibiendo a veces birrefringencia y una fase diluida isotrópica. En este caso, una agitación débil regenerará la dispersión homogénea original. En otros casos se puede desarrollar un equilibrio dinámico entre pequeños flóculos y partículas coloidales individuales. Tal equilibrio puede tratarse teóricamente más bien como un proceso de agregación molecular en vapor o disolución en el que la concentración de moléculas que se agregan está por debajo del punto de saturación, es decir, es menor que la concentración

necesaria para formar un número de agregados de tamaño crítico para que ocurra condensación o cristalización.

1.8. *Estabilización estérica o entrópica.*

El mecanismo de estabilización de partículas dispersas que portan carga eléctrica superficial se produce por la interacción de sus respectivas dobles capas que proporcionan la barrera energética necesaria para su estabilidad cinética. Existe otro mecanismo de estabilización que se ha conocido durante siglos, pero que recientemente se ha estudiado en profundidad. Tal mecanismo incluye la presencia de un coloide liofílico que se adsorbe en la superficie de la partícula y proporciona lo que se conoce como estabilización entrópica o estérica. Aunque existe controversia en si se trata del mismo fenómeno, los dos términos, entrópica y estérica, se usan para nombrarlo.⁹⁶

Se ha reconocido por mucho tiempo que los agentes protectores estéricos no necesitan portar carga eléctrica para ser efectivos. Sin embargo, deben cumplir ciertos requerimientos, tales como una naturaleza química dual con respecto a sus características de solubilidad y un peso molecular relativamente alto. Así, de forma general, puede decirse que para lograr una estabilidad estérica debe haber una porción de la molécula que exhiba una solubilidad relativamente baja en el medio de dispersión y/o una alta tendencia a adsorberse en la superficie de la partícula. El resultado neto debe ser la formación de una capa adsorbida relativamente gruesa que imponga una barrera a la aproximación de la partícula y mejore la estabilidad del coloide.

Cuando dos partículas coloidales tienen una capa adsorbida de un polímero liofílico y se acercan una a la otra, las capas comenzarán a interpenetrarse. Tal interpenetración puede tener dos efectos: un efecto osmótico debido al aumento de la concentración local de las especies adsorbidas entre las dos partículas y un efecto de restricción de volumen o entrópico, ya que las especies interaccionantes empiezan a perder ciertos grados de libertad debido al solapamiento. En ambos casos, el sistema local experimentará una disminución en entropía que será desfavorable mientras que, el efecto osmótico puede acompañarse por un efecto entálpico desfavorable debido a la desolvatación de las unidades empaquetadas más compactas. Para recuperar la pérdida de entropía, las partículas deben apartarse permitiendo más libertad de movimiento,

mientras que el disolvente se traslada para “resolvatar” las unidades. El resultado es una barrera de energía que retarda la aproximación de las partículas y proporciona un mecanismo para la estabilización (Figura 10)

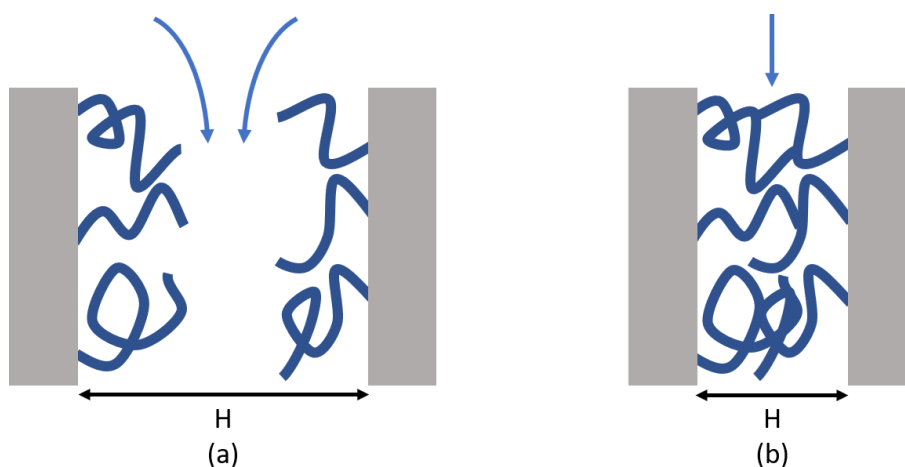


Figura 10. Cuando dos superficies que tienen un polímero adsorbido se aproximan, tienen lugar dos fenómenos: (a) a distancias de aproximación relativamente cortas, pero antes de que las capas interpenetren, la concentración local de las cadenas de polímero (entre las partículas) aumenta por encima del valor normal de equilibrio, dando lugar a un efecto de presión osmótica: las moléculas de disolvente se mueven a la región entre las superficies y las separa. (b) a distancias donde las capas interpenetran las cadenas de polímero empiezan a perder grados de libertad (disminución de entropía) y los factores termodinámicos introducen un segundo término repulsivo.

En un sistema estabilizado por condiciones estéricas, donde no existen cargas eléctricas que influyan, la energía neta de interacción será la suma de las fuerzas atractivas de Van der Waals y las interacciones estéricas repulsivas:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{ester} - \Delta G_{atrac}$$

Los agentes protectores poliméricos o, estabilizadores estéricos, deben anclarse fuertemente a la superficie de la partícula como mínimo en un punto, aunque es mucho mejor si lo hacen en varios puntos. Si solo se unen a un punto, el resultado sería un sistema con colas que se balancearían libremente proyectándose hacia la disolución y proporcionando la acción protectora. Si se producen dos o más puntos de anclaje, el resultado sería la formación tanto de lazos como de colas. Para una longitud de cadena determinada se puede ver intuitivamente que, en un sistema de colas, la distancia a la que se extiende la capa protectora en la disolución será mayor que en un sistema de

lazos. De aquí podría decirse que un sistema de unión en un solo punto proporcionaría una mayor protección. Sin embargo, los lazos se afectarían doblemente una vez que comienza la interpenetración, ya que muchas unidades afectadas por el efecto de restricción de volumen conducirían a un efecto entrópico más fuerte. No puede decirse, por tanto, que una configuración sea mejor que otra y, en la mayoría de los casos, se dan las dos simultáneamente.

A partir de la imagen de estabilización estérica presentada, estaría claro que el disolvente debe jugar un papel crítico en la determinación de la efectividad de un sistema estabilizador-coloide-disolvente dado. Si la naturaleza del disolvente cambia de manera que se vuelva un mejor disolvente para las unidades monómero que actúan como anclajes del estabilizador, entonces las cadenas pueden estar más débilmente adsorbidas, proporcionando el punto de partida para la floculación por depleción o fenómenos relacionados. Por el contrario, si el disolvente cambia desde un “buen” a un “mal” disolvente para los lazos y colas, el espesor de la capa protectora se reducirá, ya que las cadenas poliméricas colapsan en la superficie de la partícula. El resultado será una estabilidad reducida frente a la floculación.

1.9. *Floculación por depleción.*

Cuando en una disolución coloidal se añade un polímero que, o no se adsorbe o lo hace débilmente, puede ocurrir un fenómeno que se conoce como floculación por depleción. En este fenómeno, cuando dos partículas se aproximan, las cadenas de polímero que se adsorben débilmente o que simplemente se colocan entre las partículas son expulsadas del área de máxima aproximación, dejando las superficies desnudas que, por tanto, se atraen en la forma normal. Sin embargo, puede originarse una fuerza atractiva adicional como consecuencia de la eliminación del polímero de la región intermedia. En tanto el polímero es forzado a dejar el área entre las partículas que se aproximan, el balance osmótico local se desplaza, esto es, la concentración de la disolución entre las partículas es menor que la del seno de la disolución. La ósmosis entonces fuerza al disolvente a salir de la región entre las partículas hacia la disolución. El efecto neto en las partículas es que son dirigidas por el flujo del disolvente (un tipo de efecto de succión hidrodinámico) resultando en una pérdida de estabilidad y floculación.

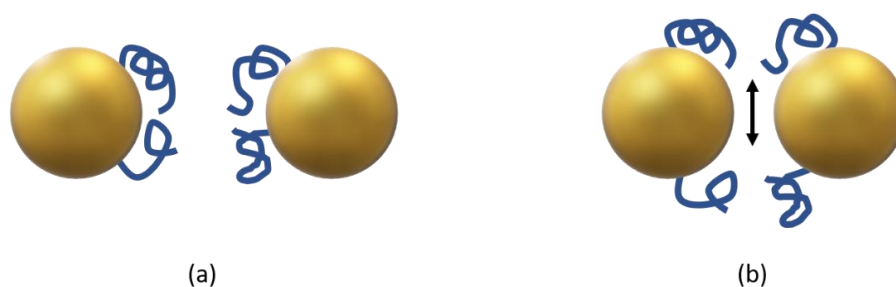


Figura 12. En un sistema estabilizado estéricamente conteniendo polímeros de bajo peso molecular o débilmente adsorbido, cuando se aproximan las dos partículas (a) el polímero unido débilmente puede desorberse, dejando huecos desnudos en las superficies que se aproximan conduciendo a una tendencia a la floculación (b). Este fenómeno se conoce como floculación por depleción.

1.10. Bibliografía

1. Yao, J.; Yang, M.; Duan, Y., Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (12), 6130-6178.
2. Nel, A. E.; Maedler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543-557.
3. Park, S.; Hamad-Schifferli, K., Nanoscale interfaces to biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (5), 616-622.
4. Gao, H.; He, Q., The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. *Expert Opin. Drug. Deliv.* **2014**, *11* (3), 409-420.
5. Walkey, C. D.; Chan, W. C. W., Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2780-2799.
6. Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Song, F.; Liu, R.; Guo, H.; Olsen, D. W. H.; Cohen, Y.; Emili, A.; Chan, W. C. W., Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *Acs Nano* **2014**, *8* (3), 2439-2455.
7. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (7), 2050-2055.
8. Monopoli, M. P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779-786.
9. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Cedervall, T.; Berggard, T.; Flanagan, M. B.; Lynch, I.; Elia, G.; Dawson, K., The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *Acs Nano* **2011**, *5* (9), 7503-7509.

10. Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J.; Puntès, V., Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *Acs Nano* **2010**, *4* (7), 3623-3632.
11. Milani, S.; Bombelli, F. B.; Pitek, A. S.; Dawson, K. A.; Raedler, J., Reversible versus Irreversible Binding of Transferrin to Polystyrene Nanoparticles: Soft and Hard Corona. *Acs Nano* **2012**, *6* (3), 2532-2541.
12. Vilanova, O.; Mittag, J. J.; Kelly, P. M.; Milani, S.; Dawson, K. A.; Radler, J. O.; Franzese, G., Understanding the Kinetics of Protein-Nanoparticle Corona Formation. *Acs Nano* **2016**, *10* (12), 10842-10850.
13. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (38), 14265-14270.
14. Mahmoudi, M.; Lohse, S. E.; Murphy, C. J.; Fathizadeh, A.; Montazeri, A.; Suslick, K. S., Variation of Protein Corona Composition of Gold Nanoparticles Following Plasmonic Heating. *Nano Letters* **2014**, *14* (1), 6-12.
15. Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Guo, H.; Emili, A.; Chan, W. C. W., Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (4), 2139-2147.
16. Tenzer, S.; Docter, D.; Rosfa, S.; Wlodarski, A.; Kuharev, J.; Rekić, A.; Knauer, S. K.; Bantz, C.; Nawroth, T.; Bier, C.; Sirirattanapan, J.; Mann, W.; Treuel, L.; Zellner, R.; Maskos, M.; Schild, H.; Stauber, R. H., Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. *Acs Nano* **2011**, *5* (9), 7155-7167.
17. Salvati, A.; Pitek, A. S.; Monopoli, M. P.; Prapainop, K.; Bombelli, F. B.; Hristov, D. R.; Kelly, P. M.; Aberg, C.; Mahon, E.; Dawson, K. A., Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8* (2), 137-143.
18. Dominguez-Medina, S.; Kisley, L.; Tauzin, L. J.; Hoggard, A.; Shuang, B.; D. S. Indrasekara, A. S.; Chen, S.; Wang, L.-Y.; Derry, P. J.; Liopo, A.; Zubarev, E. R.; Landes, C. F.; Link, S., Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle Aggregation. *ACS Nano* **2016**, *10* (2), 2103-2112.
19. Hamad-Schifferli, K., How can we exploit the protein corona? *Nanomedicine* **2013**, *8* (1), 1-3.
20. Pitek, A. S.; O'Connell, D.; Mahon, E.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Dawson, K. A., Transferrin Coated Nanoparticles: Study of the Bionano Interface in Human Plasma. *Plos One* **2012**, *7* (7).
21. Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G., Uptake of Engineered Gold Nanoparticles into Mammalian Cells. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (2), 1258-1288.
22. Goppert, T. M.; Muller, R. H., Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Inter. J. Pharm.* **2005**, *302* (1-2), 172-186.

23. Kreuter, J.; Hekmatara, T.; Dreis, S.; Vogel, T.; Gelperina, S.; Langer, K., Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Controll. Release* **2007**, *118* (1), 54-58.
24. Owens, D. E.; Peppas, N. A., Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Inter. J. Pharm.* **2006**, *307* (1), 93-102.
25. Davis, M. E.; Chen, Z.; Shin, D. M., Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Rev. Drug Discovery* **2008**, *7* (9), 771-782.
26. Huang, R.; Carney, R. R.; Ikuma, K.; Stellacci, F.; Lau, B. L. T., Effects of Surface Compositional and Structural Heterogeneity on Nanoparticle-Protein Interactions: Different Protein Configurations. *Acs Nano* **2014**, *8* (6), 5402-5412.
27. Prapainop, K.; Witter, D. P.; Wentworth, P., Jr., A Chemical Approach for Cell-Specific Targeting of Nanomaterials: Small-Molecule-Initiated Misfolding of Nanoparticle Corona Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 4100-4103.
28. Sanfins, E.; Augustsson, C.; Dahlback, B.; Linse, S.; Cedervall, T., Size-dependent effects of nanoparticles on enzymes in the blood coagulation cascade. *Nano letters* **2014**, *14* (8), 4736-44.
29. Hadjidemetriou, M.; Al-Ahmady, Z.; Mazza, M.; Collins, R. F.; Dawson, K.; Kostarelos, K., In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles. *Acs Nano* **2015**, *9* (8), 8142-8156.
30. Mirshafiee, V.; Kim, R.; Mahmoudi, M.; Kraft, M. L., The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis in vitro: Human plasma versus human serum. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 188-195.
31. Ke, P. C.; Lin, S.; Parak, W. J.; Davis, T. P.; Caruso, F., A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano* **2017**, *11* (12), 11773-11776.
32. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740-2779.
33. Liz-Marzán, L. M., Gold nanoparticle research before and after the Brust-Schiffrin method. *Chemical Communications* **2013**, *49* (1), 16-18.
34. Hunt, L. B., The true story of Purple of Cassius. *Gold Bulletin* **1976**, *9* (4), 134-139.
35. Faraday, M., X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145-181.
36. Hauser, E. A.; Linn, J. E., *Experiments in Colloid Chemistry*. 1940.
37. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, (11), 55-75.
38. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., The Formation of Colloidal Gold. *J. Phys. Chem.* **1953**, *57* (7), 670-673.
39. Frens, G., Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature-Physical Science* **1973**, *241* (105), 20-22.

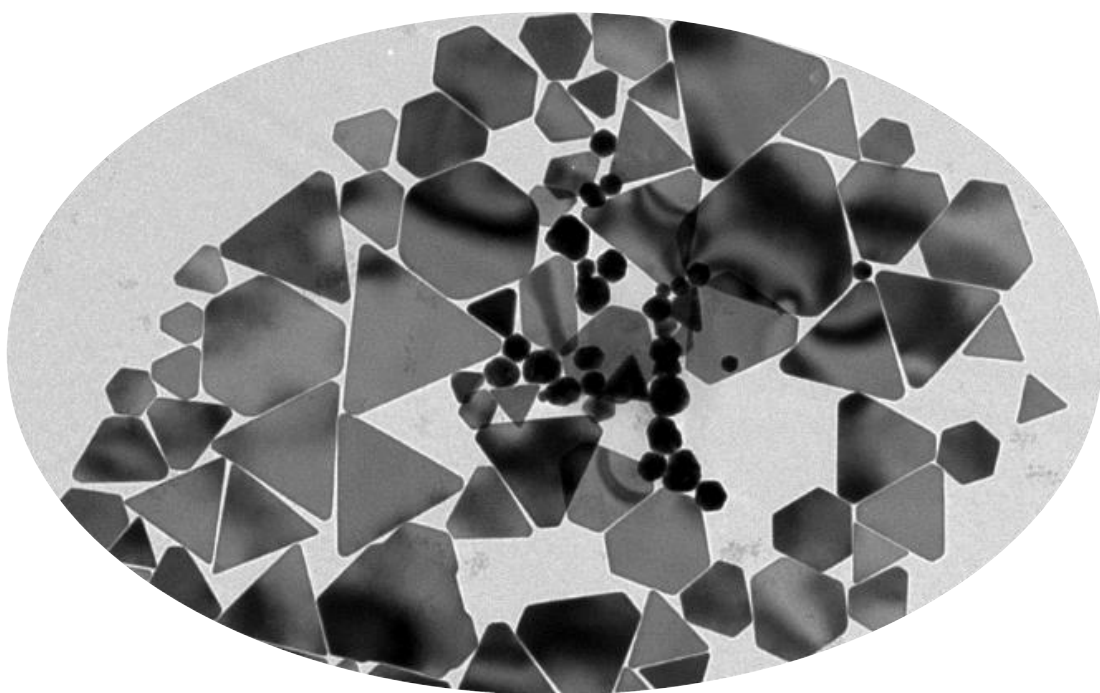
40. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A., Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (32), 15700-15707.
41. Sivaraman, S. K.; Kumar, S.; Santhanam, V., Monodisperse sub-10nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The role of chloroauric acid. *J. Colloid Inter. Sci.* **2011**, *361* (2), 543-547.
42. Zabetakis, K.; Ghann, W. E.; Kumar, S.; Daniel, M.-C., Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. *Gold Bulletin* **2012**, *45* (4), 203-211.
43. Shi, L.; Buhler, E.; Boué, F.; Carn, F., How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question. *J. Colloid Inter. Sci.* **2017**, *492*, 191-198.
44. Ji, X.; Song, X.; Li, J.; Bai, Y.; Yang, W.; Peng, X., Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13939-13948.
45. Schulz, F.; Homolka, T.; Bastus, N. G.; Puentes, V.; Weller, H.; Vossmeier, T., Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2014**, *30* (35), 10779-10784.
46. Bartosewicz, B.; Bujno, K.; Liszewska, M.; Budner, B.; Bazarnik, P.; Płociński, T.; Jankiewicz, B. J., Effect of citrate substitution by various α -hydroxycarboxylate anions on properties of gold nanoparticles synthesized by Turkevich method. *Colloid Surf. A* **2018**, *549*, 25-33.
47. Wuitschick, M.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Sztucki, M.; Vainio, U.; Pinna, N.; Rademann, K.; Emmerling, F.; Kraehnert, R.; Polte, J., Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 7052-7071.
48. LaMer, V. K.; Dinegar, R. H., Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (11), 4847-4854.
49. Chow, M. K.; Zukoski, C. F., Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *J. Colloid Inter. Sci.* **1994**, *165* (1), 97-109.
50. Rodriguez-Gonzalez, B.; Mulvaney, P.; Liz-Marzan, L. M., An electrochemical model for gold colloid formation via citrate reduction. *Z. Phys. Chem.* **2007**, *221* (3), 415-426.
51. Ojea-Jimenez, I.; Bastus, N. G.; Puentes, V., Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (32), 15752-15757.
52. Ojea-Jiménez, I.; Campanera, J. M., Molecular Modeling of the Reduction Mechanism in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (44), 23682-23691.
53. Goia, D.; Matijević, E., Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold. *Colloids Surf. A* **1999**, *146* (1), 139-152.
54. Polte, J.; Herder, M.; Eler, R.; Rolf, S.; Fischer, A.; Würth, C.; Thünemann, A. F.; Kraehnert, R.; Emmerling, F., Mechanistic insights into seeded growth processes of gold nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2* (11), 2463-2469.

55. Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V., Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098-11105.
56. Ojea-Jiménez, I.; Romero, F. M.; Bastús, N. G.; Puentes, V., Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (4), 1800-1804.
57. Ding, W.; Zhang, P.; Li, Y.; Xia, H.; Wang, D.; Tao, X., Effect of Latent Heat in Boiling Water on the Synthesis of Gold Nanoparticles of Different Sizes by using the Turkevich Method. *ChemPhysChem* **2014**, *16* (2), 447-454.
58. Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Wuithschick, M.; Pinna, N.; Kraehnert, R.; Rademann, K.; Polte, J., Missing Piece of the Mechanism of the Turkevich Method: The Critical Role of Citrate Protonation. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (11), 4072-4081.
59. Ahmadi, T. S.; Wang, Z. L.; Green, T. C.; Henglein, A.; ElSayed, M. A., Shape-controlled synthesis of colloidal platinum nanoparticles. *Science* **1996**, *272* (5270), 1924-1926.
60. Petroski, J. M.; Wang, Z. L.; Green, T. C.; El-Sayed, M. A., Kinetically controlled growth and shape formation mechanism of platinum nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (18), 3316-3320.
61. Bradley, J. S.; Tesche, B.; Busser, W.; Maase, M.; Reetz, M. T., Surface Spectroscopic Study of the Stabilization Mechanism for Shape-Selectively Synthesized Nanostructured Transition Metal Colloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (19), 4631-4636.
62. Teranishi, T.; Miyake, M., Size control of palladium nanoparticles and their crystal structures. *Chem. Mater.* **1998**, *10* (2), 594-600.
63. Teranishi, T.; Hosoe, M.; Tanaka, T.; Miyake, M., Size control of monodispersed Pt nanoparticles and their 2D organization by electrophoretic deposition. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (19), 3818-3827.
64. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (7), 2313-2322.
65. Esumi, K.; Nawa, M.; Aihara, N.; Usui, K., Growth of rodlike Au/Pt particles in cationic micelles by UV irradiation. *New J. Chem.* **1998**, *22* (7), 719-720.
66. Murphy, C. J.; Jana, N. R., Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (1), 80-82.
67. Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J., Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2679-2724.
68. Foss, C. A.; Hornyak, G. L.; Stockert, J. A.; Martin, C. R., Template-Synthesized Nanoscopic Gold Particles - Optical Spectra and the Effects of Particle-size and Shape. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (11), 2963-2971.
69. Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A., Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (16), 3073-3077.

70. Pileni, M. P.; Ninham, B. W.; Gulik-Krzywicki, T.; Tanori, J.; Lisiecki, I.; Filankembo, A., Direct relationship between shape and size of template and synthesis of copper metal particles. *Adv. Mater.* **1999**, *11* (16), 1358-1362.
71. Filankembo, A.; Pileni, M. P., Is the template of self-colloidal assemblies the only factor that controls nanocrystal shapes? *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (25), 5865-5868.
72. Peng, X. G.; Manna, L.; Yang, W. D.; Wickham, J.; Scher, E.; Kadavanich, A.; Alivisatos, A. P., Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* **2000**, *404* (6773), 59-61.
73. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. *Chem. Commun.* **2001**, (7), 617-618.
74. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (19), 4065-4067.
75. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Adv. Mater.* **2001**, *13* (18), 1389-1393.
76. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957-1962.
77. Ye, X.; Zheng, C.; Chen, J.; Gao, Y.; Murray, C. B., Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods. *Nano Letters* **2013**, *13* (2), 765-771.
78. Busbee, B. D.; Obare, S. O.; Murphy, C. J., An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (5), 414-+.
79. Johnson, C. J.; Dujardin, E.; Davis, S. A.; Murphy, C. J.; Mann, S., Growth and form of gold nanorods prepared by seed-mediated, surfactant-directed synthesis. *J. Mater. Chem.* **2002**, *12* (6), 1765-1770.
80. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. *Langmuir* **2001**, *17* (20), 6368-6374.
81. Pal, T.; De, S.; Jana, N. R.; Pradhan, N.; Mandal, R.; Pal, A.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C., Organized media as redox catalysts. *Langmuir* **1998**, *14* (17), 4724-4730.
82. Wang, Z. L.; Mohamed, M. B.; Link, S.; El-Sayed, M. A., Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios. *Surf. Sci.* **1999**, *440* (1-2), L809-L814.
83. Wang, Z. L.; Gao, R. P.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Surface reconstruction of the unstable {110} surface in gold nanorods. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (23), 5417-5420.
84. Mie, G., *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377.
85. Mulvaney, P., Metal Nanoparticles: Double Layers, Optical Properties, and Electrochemistry. In *Nanoscale Materials in Chemistry*, Klabunde, K. J., Ed. John Wiley and Sons, Inc.: New York, 2001.
86. Genzel, L.; Martin, T. P., Lattice Dynamics of MGO Microcrystals. *Phys. Status Solidi B* **1972**, *51* (1), 101-106.

87. Kittel, C., *Introduction to Solid State Physics*. 2nd ed.; Wiley: New York, 1956.
88. Kreibig, M.; Volmer, M., *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer: Berlin, 1995; Vol. 25.
89. Henglein, A.; Mulvaney, P.; Linnert, T., Chemistry of Agn Aggregates in Aquous Solution - Nonmetallic Oligomeric Clusters and Metallic Particles. *Faraday Discus.* **1991**, *92*, 31-44.
90. Orendorff, C. J.; Gearheart, L.; Jana, N. R.; Murphy, C. J., Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (1), 165-170.
91. Nikoobakht, B.; Wang, J. P.; El-Sayed, M. A., Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition. *Chem. Phys. Letters* **2002**, *366* (1-2), 17-23.
92. Mahmoud, M. A.; El-Sayed, M. A., Different Plasmon Sensing Behavior of Silver and Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Letters* **2013**, *4* (9), 1541-1545.
93. Sivapalan, S. T.; DeVetter, B. M.; Yang, T. K.; van Dijk, T.; Schulmerich, M. V.; Carney, P. S.; Bhargava, R.; Murphy, C. J., Off-Resonance Surface-Enhanced Raman Spectroscopy from Gold Nanorod Suspensions as a Function of Aspect Ratio: Not What We Thought. *ACS Nano* **2013**, *7* (3), 2099-2105.
94. Scarabelli, L.; Coronado-Puchau, M.; Giner-Casares, J. J.; Langer, J.; Liz-Marzán, L. M., Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2014**, *8* (6), 5833-5842.
95. Osmond, D. W. J.; Vincent, B.; Waite, F. A., Steric Stabilization - Reappraisal of Current Theory. *Colloid Polym. Sci.* **1975**, *253* (8), 676-682.
96. Myers, D., *Colloids and Colloidal Stability*. Wiley, VCH: New York, 1999.

Capítulo 2



Experimental

2. Experimental

Tradicionalmente, la caracterización instrumental de materiales en la escala nanométrica, tales como dispersiones coloidales y películas delgadas, se ha centrado principalmente en comportamientos colectivos como la coloración de partículas de oro conocida desde hace siglos. Sin embargo, para una mejor comprensión fundamental y diferentes aplicaciones potenciales, se requiere un incremento en la capacidad de la instrumentación para observar, medir y manipular los nanomateriales individuales y las nanoestructuras. La caracterización y manipulación de nanoestructuras individuales requiere no sólo de extrema sensibilidad y exactitud, sino también de resolución a nivel atómico. En este sentido, es destacable la importancia del papel central que las diversas modalidades de microscopía desempeñan en la caracterización y medida de materiales nanométricos y nanoestructuras. Asimismo, adquieren una especial relevancia propiedades físicas y fuerzas de corto alcance que, si bien no juegan un papel destacable en la caracterización a nivel macroscópico, representan un impacto significativo en la escala nanométrica. El objetivo de este capítulo es aportar una breve descripción del fundamento de las técnicas instrumentales que han sido empleadas en el presente trabajo.

2.1. Técnicas microscópicas. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las técnicas microscópicas representan una herramienta imprescindible para la caracterización de nanopartículas y sus estructuras, puesto que sólo por observación directa de la imagen se puede hacer una determinación del tamaño y forma de éstas, así como de su distribución y morfología. Dentro de las técnicas microscópicas, son muy empleadas las técnicas de electrones acelerados, tanto en la modalidad de barrido (microscopía electrónica de barrido, SEM), como en la modalidad de transmisión (microscopía electrónica de transmisión, TEM). Otro grupo de técnicas microscópicas de importancia son las conocidas bajo el nombre de microscopía de sonda de barrido, SPM, que engloba la microscopía de efecto túnel, STM y la microscopía de fuerzas atómicas, AFM.

La resolución que puede alcanzarse en un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz. El fundamento del microscopio electrónico se apoya en las propiedades ondulatorias del electrón, haciendo uso de un haz de electrones de alta energía y longitud de onda inferior a la de la luz, lo que permite incrementar la resolución.

Los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Así, disponen de un cañón de electrones y una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra. Una parte esencial de un microscopio electrónico la constituye el sistema de vacío, pues los electrones pueden ser desviados por las moléculas de aire, requiriéndose para evitar ésto un vacío casi total en el interior del microscopio. Finalmente, el sistema debe constar de un sistema para registrar las imágenes que producen los electrones al interactuar con la muestra.

El límite teórico del poder de resolución de un instrumento está determinado por la longitud de onda del haz electrónico usado y la apertura numérica del sistema. El poder de resolución, R , de un instrumento se define como:

$$R = \frac{\lambda}{2NA}$$

donde λ es la longitud de onda de los electrones usados y NA es la apertura numérica, la cual está grabada sobre cada objetivo y sistema de lentes condensadoras y da una medida de la capacidad del objetivo para recolectar electrones o la capacidad del condensador para suministrar electrones.

TEM es una de las técnicas más ampliamente usadas en la caracterización de nanomateriales y nanoestructuras. En TEM, los electrones son acelerados hasta energías de 100 KeV o mayores (por encima de 1MeV) y proyectados sobre una muestra delgada (menos de 200 nm) mediante un sistema de lentes condensadoras. Una parte de los electrones son dispersados o absorbidos por la muestra. Los electrones que se transmiten forman una imagen aumentada de la muestra sobre una pantalla fluorescente, la cual puede recogerse en una fotografía. La gran ventaja que ofrece TEM reside en su elevado rango de magnificación y su capacidad de suministrar tanto imágenes como información de difracción para una única muestra.

La elevada magnificación o resolución de TEM es resultado de la pequeña longitud de onda efectiva del electrón, λ , la cual viene dada por la relación de De Broglie:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mqV}}$$

donde m y q son la masa y la carga del electrón, h es la constante de Planck y V es la diferencia de potencial mediante la cual los electrones son acelerados. Cuanto mayor sea el voltaje operativo de un TEM, mayor será su resolución espacial lateral. Teóricamente, la resolución instrumental para discriminar entre dos puntos próximos es proporcional a $\lambda^{3/4}$. Los TEM de elevado voltaje alcanzan resoluciones superiores a 0.2 nm y presentan la ventaja adicional de un mayor poder de penetración electrónica, debido a que los electrones de alta energía interactúan menos fuertemente con la materia que los de baja energía. Una limitación de TEM es su escasa resolución en profundidad. La información de los electrones dispersados en una imagen TEM se origina por una muestra tridimensional, pero es proyectada en un detector en dos dimensiones. Por consiguiente, la información estructural a lo largo de la dirección del haz se superpone sobre la imagen plana.

En este trabajo, para imágenes de alta resolución (HR-TEM), se ha utilizado un microscopio JEOL JEM 2010 con una resolución de 0.194 nm entre puntos y una capacidad de magnificación que va de 50 a 1.500.000 de aumentos (Figura 1), equipo del servicio central de apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

Todas las muestras se prepararon depositando y evaporando gotas de las disoluciones de nanomateriales en rejillas de Cu recubiertas de Formvar (400 mesh) proporcionadas por Electron Microscopies Sciences. Las imágenes obtenidas se trataron con el programa Image-Pro PLUS con el que se realizó una medida exacta del tamaño de las partículas.



Figura 1. Microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JEM 2010

2.2. Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas se han usado ampliamente para la caracterización de nanomateriales, tanto la espectroscopia electrónica como la vibracional. La espectroscopia electrónica informa sobre la estructura de átomos, iones, moléculas o cristales mediante la excitación de electrones desde el estado fundamental a estados excitados (absorción) y la relajación desde estados excitados al estado fundamental (emisión). Las técnicas vibracionales suponen la interacción de fotones con especies en una muestra que resultan en la transferencia de energía hasta o desde la muestra a través de la excitación o desexcitación vibracional. Las frecuencias vibracionales suministran información de los enlaces químicos en las muestras estudiadas.

2.2.1. Espectroscopía UV-Visible

Las líneas características observadas en los espectros de absorción y emisión de átomos casi aislados e iones, debida a las transiciones entre niveles cuánticos, son extremadamente agudas. En consecuencia, sus longitudes de onda o energías fotónicas pueden ser determinadas con gran exactitud. Las líneas son características de un átomo o ion particular y pueden ser usadas para propósitos de identificación. Los espectros moleculares, aunque menos que los espectros atómicos, son también generalmente agudos. Las posiciones de las líneas espectrales pueden ser determinadas con suficiente exactitud como para verificar la estructura electrónica de moléculas. En sólidos, la gran degeneración de los niveles atómicos es dividida por interacciones en bandas cuasi-continuas (bandas de valencia y conducción), y origina un espectro óptico bastante ancho. La diferencia de energía entre el orbital molecular ocupado de más alta energía (HOMO) y el orbital molecular desocupado de más baja energía (LUMO) se designa como la brecha o gap fundamental. La profundidad de penetración de la radiación electromagnética está en el orden de 50 nm a través de la mayor parte del espectro óptico (luz visible). Esta escasa profundidad de penetración limita las aplicaciones de la espectroscopia de absorción para la caracterización de sólidos masivos; sin embargo, esta técnica es fácilmente aplicable para la caracterización de nanoestructuras y nanomateriales.

Los espectros de absorción para muestras de nanopartículas en suspensión ofrecen información valiosa sobre las especiales propiedades ópticas de estos sistemas. Por una parte, el fenómeno de la resonancia del plasmón superficial (SPR) da lugar a una banda de absorción que caracteriza tanto el tamaño de las partículas como su modificación superficial por ligandos orgánicos. El desplazamiento hacia el rojo en esta banda se interpreta, en algunos casos, como un efecto del acoplamiento en la resonancia del plasmón, entre partículas que se agregan, y puede tomarse como una medida de la estabilidad de la suspensión. Por otra parte, en el rango inferior de la escala nanométrica, las partículas presentan un espectro de absorción que exhibe propiedades de discretización en los niveles electrónicos, simulando el fenómeno físico de la escalera coulombiana y revelando un interesante comportamiento molecular, asociado a efectos del confinamiento cuántico en partículas de pequeñas dimensiones.



Figura 2. Espectrofotómetro Jasco V-570.

Los espectros UV-Visible-NIR se han realizado en un espectrofotómetro Jasco V-570 (Figura 2) utilizando en diferentes ensayos cubetas de 0.2 ó 1 cm de paso óptico, según fuese conveniente para que, dada la concentración de las disoluciones, se obtuvieran valores óptimos de absorbancia en torno a 0.4-0.8. Este equipo a su vez cuenta con una cámara termostatazada PELTIER con la cual se realizaron medidas espectroscópicas en función de la temperatura.

2.2.2. Espectroscopía FT-IR

La energía con la que las moléculas y los cristales vibran se encuentra en el rango que va de 10^{12} a 10^{14} Hz, el cual se corresponde con la región infrarroja (IR) del espectro electromagnético. De esta forma, es posible estudiar la interacción con la materia de la radiación electromagnética infrarroja, observando un intercambio de energía cuando se verifica la resonancia entre una cierta frecuencia vibracional y la frecuencia del haz incidente. Este intercambio de energía representa excitación de las vibraciones de enlaces químicos, siendo por tanto específico según el tipo de enlace y el grupo de átomos involucrados en la vibración.

Cualquier enlace entre dos átomos vibra a medida que los átomos se acercan y se alejan uno del otro. Este tipo de movimiento se denomina “tensión”. Las moléculas poliatómicas pueden sufrir además vibraciones de “flexión” en las cuales los ángulos

entre los enlaces periódicamente aumentan y disminuyen. La frecuencia a la cual las moléculas vibran depende de las masas de sus átomos y de la rigidez de sus enlaces: una molécula formada por átomos livianos unidos por enlaces rígidos tiene una frecuencia vibracional más alta que una formada por átomos pesados unidos por enlaces más débiles. Además, los movimientos de flexión de las moléculas tienden a ser menos rígidos que los movimientos de tensión; por tanto, las vibraciones de flexión absorben típicamente radiación de frecuencias más bajas que las vibraciones de estiramiento. La rigidez de un enlace se mide con su constante de fuerza, k , que puede definirse mediante la ley de Hooke para la fuerza de restauración de un resorte:

$$F = -k \cdot \text{desplazamiento}$$

Un enlace rígido experimenta una fuerza de restauración elevada, aún para desplazamientos bastante pequeños, y por ende k es elevada. Lo contrario ocurre con un enlace débil. En general, la constante de fuerza es mayor para las tensiones que, para las flexiones, lo que explica su mayor frecuencia o energía.

La frecuencia vibracional, ν , de un enlace entre dos átomos A y B de masas m_A y m_B viene dada por la expresión:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

donde μ es la llamada masa efectiva o masa reducida de los átomos que participan en la vibración molecular y viene dada por:

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

En principio, una molécula no lineal formada por N átomos puede vibrar de $3N-6$ formas diferentes, y una molécula lineal de $3N-5$. Cada forma en la cual una molécula puede vibrar se denomina modo normal de vibración, y cada modo tiene una frecuencia que depende de una manera complicada de las masas de los átomos que se mueven en la vibración y de las constantes de fuerza asociadas con los movimientos involucrados.

La modalidad espectroscopía de transmisión en IR es una de las más comunes. En ella, la radiación atraviesa una muestra -que puede estar en estado sólido (pastillas o emulsiones), líquido o gaseoso, comparándose la intensidad de la luz transmitida, I , con

la incidente, I_0 . Ahora bien, no toda la luz que incide sobre la muestra se transmite, ya que siempre existirá una componente de reflexión, R , y otra de dispersión, D . Así, la energía medida por el detector no sólo depende de la reflexión y dispersión producida, pudiéndose escribir la ley de Lambert-Beer en la forma:

$$I = (I_0 - R - D) \cdot 10^{-\epsilon lc}$$

donde ϵ es la absorptividad molar, l es el camino óptico recorrido por el rayo en la muestra y c es la concentración.

En este trabajo se ha trabajado mediante la metodología de reflexión total atenuada (Attenuated Total Reflection, ATR). Esta técnica se basa en la medida de los cambios que se producen en el haz de infrarrojos reflejado internamente cuando entra en contacto con la muestra. Para ello el haz infrarrojo se dirige a un cristal ópticamente denso, con un alto índice de refracción, en un determinado ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la muestra en contacto con el cristal. En las regiones del espectro de infrarrojos en las que la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenúa. El haz atenuado vuelve al cristal, sale a continuación por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector, que registra el haz de infrarrojos atenuado como una señal del interferograma y que se puede usar para generar un espectro de infrarrojos (Figura 3).

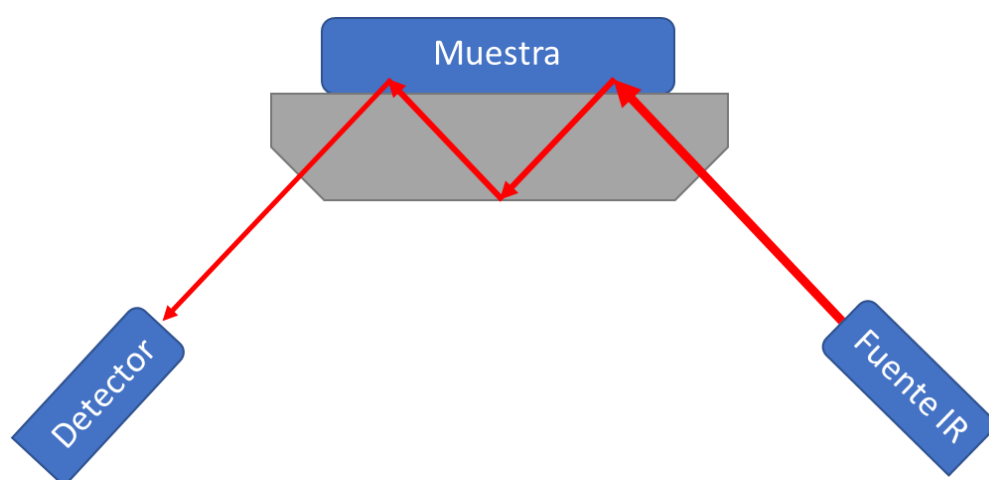


Figura 3. Esquema de un dispositivo ATR.

En cuanto al empleo de Transformadas de Fourier, que da origen al familiar término FT-IR (Fourier Transform Infrared spectroscopy), decir que su introducción ha hecho posible optimizar la relación señal/ruido, permitiendo obtener buenos registros para el caso de especies moleculares adsorbidas.

El empleo de esta técnica en la presente memoria aporta información relativa a los enlaces de las moléculas orgánicas que protegen la superficie de las partículas. Esta información resulta de especial relevancia a la hora de determinar detalles estructurales de las monocapas formadas por dichas moléculas.

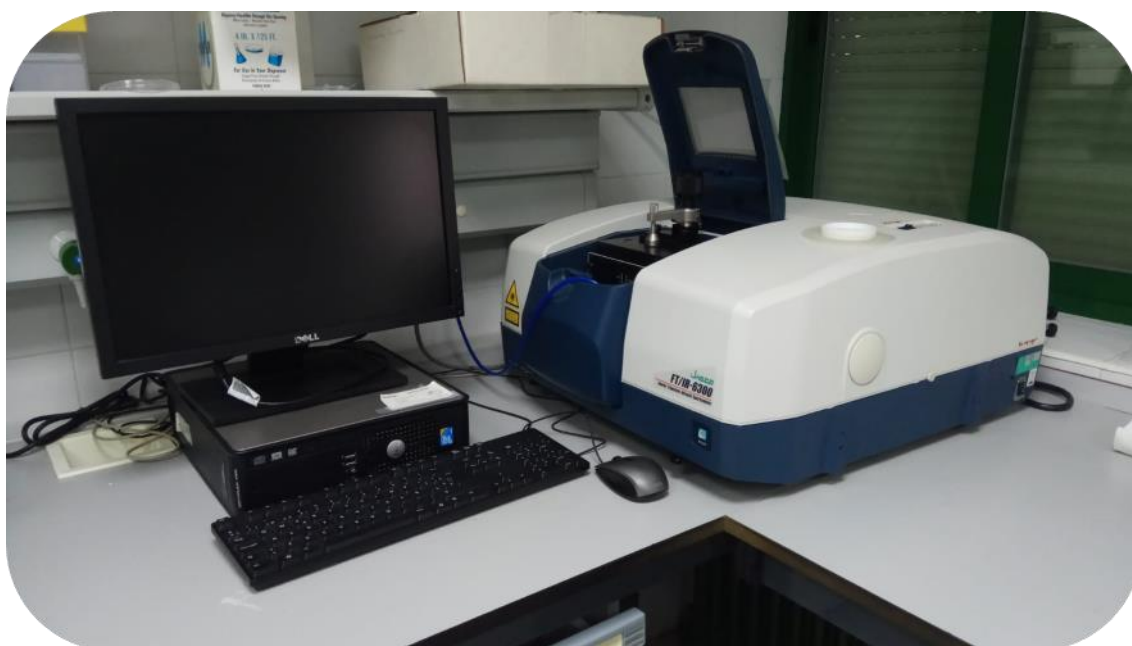


Figura 4. Espectrofotómetro FT-IR Jasco 6300.

Los espectros de infrarrojo ATR se han registrado en un instrumento JASCO 6300 FT-IR (Figura 4) con un rayo láser sencillo (He-Ne), en el intervalo de número de ondas entre $1000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, y los datos se han adquirido mediante el software integrado (Spectra Manager). Se ha usado un accesorio de reflectancia con ángulo variable (Pike Technologies-VeeMAX™) que va ensamblado en el compartimento de muestra del espectrofotómetro FTIR y en el que se ensambla el cristal para ATR (Figura 5). Se ha utilizado un cristal de germanio con una orientación de 60° .

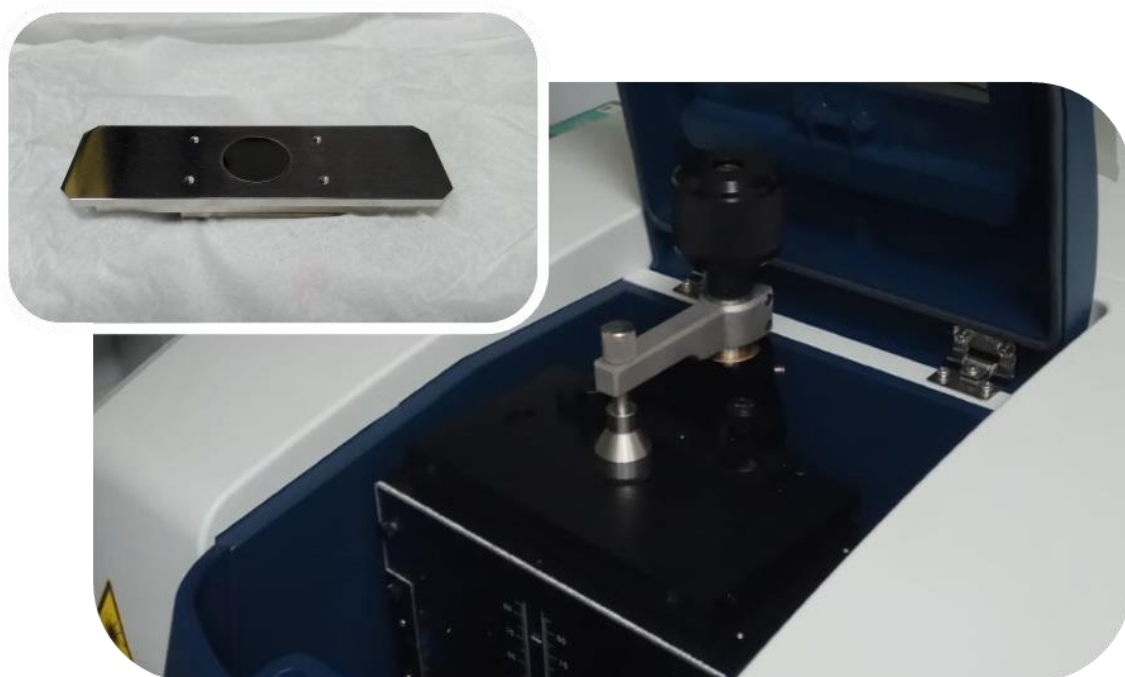


Figura 5. Detalle del dispositivo VeeMAX™ y del cristal de germanio.

Los espectros se registraron usando un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS), acumulando un total de 256 espectros con una resolución de 2 cm^{-1} en la ventana de número de ondas de 1000 a 4000 cm^{-1} . Los espectros se procesaron calculando las segundas derivadas y, las frecuencias obtenidas, así como los datos aceptados en la literatura, que se usaron para realizar los ajustes para los que se utilizaron funciones Gausianas.¹⁻³ Se empleó una técnica de ajuste con multipicos usando el software Micro Cal Origin 7.0 que incluye como parámetros de ajuste la anchura, el área y la posición de frecuencia de todas las bandas y que permite establecer restricciones para el ajuste. El ajuste multicomponente nos permite identificar las diferentes contribuciones y sus correspondientes frecuencias. El porcentaje de área de los picos deconvolucionados proporciona las cantidades relativas de los componentes. Previamente a las medidas tanto el interferómetro como el compartimento de muestra se purgan con un flujo de aire seco y libre de CO_2 con un flujo de 8 L/min , suministrado desde una fuente de aire comprimido y pasado por un sistema de secado (K-MT LAB, Parker/Zandet GmbH&Co.KG).

2.2.3. Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X

La espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica que se emplea para el estudio superficial, cualitativa, semi-cuantitativa y de baja resolución espacial que se utiliza para obtener información sobre la composición química de la superficie, como es el contenido de los elementos y el estado de valencia que presentan en un material.

Los espectros XPS se obtienen irradiando la muestra con rayos X. Se miden simultáneamente el número y la energía cinética de los electrones que escapan de la superficie del material. El número y la energía cinética de los electrones emitidos reflejan el contenido y el estado químico de los elementos de superficie, respectivamente. Los rayos X tienen una profundidad de penetración limitada, de ahí que se diga que esta técnica es superficial.

La emisión de estos rayos X se suele realizar con fuentes de excitación que usan las líneas $K\alpha_{1,2}$ de Mg o Al que tienen energías de 1253.6 y 1486 eV, respectivamente. Este proceso de fotoemisión que se produce resulta ser muy rápido, 10^{-16} s, y se describe según la ecuación de Einstein:

$$E_B = h\nu - KE$$

donde E_B es la energía de enlace del electrón en el átomo, $h\nu$ es la energía de la fuente de rayos X y KE es la energía cinética del electrón detectado, que es medida por el espectrómetro XPS.

Dentro de esta ecuación hay que incluir un término más, la función de trabajo del espectrómetro, ϕ_{sp} , que es la energía mínima requerida para impulsar un electrón hacia el más alto nivel ocupado en el vacío, ya que, si se suman las energías cinéticas y la de unión se observaría que no son iguales a la energía de la radiación X. De este modo la ecuación anterior quedaría como:

$$E_B = h\nu - KE - \Phi_{sp}$$

Por tanto, se necesita conocer la energía cinética y la función de trabajo del espectrómetro, siendo E_B^f la energía de enlace referenciada al nivel de Fermi. Para muestras conductoras el espectrómetro se ajusta mediante el empleo de Au estándar, conociendo que sus valores de energía de enlace son $E_f = 0$ eV y $4f_{7/2} = 84$ eV.

Los componentes primarios de este instrumento son el sistema de vacío, la fuente de rayos X, un analizador de energía del electrón y el sistema de datos.

La muestra se ubica en la cámara principal de ultra-vacío, donde es analizada. Esta se introduce previamente en una precámara donde se lleva a cabo un primer vacío, una operación lenta que conlleva varias horas. Una vez se han alcanzado estas condiciones, la muestra se puede reorientar en distintas posiciones, se puede elegir la zona de la superficie a trabajar siendo controlado todo mediante el uso de una cámara ubicada en el interior de la zona de análisis.

El equipo utilizado en este trabajo ha sido un espectrómetro SPECS Phoibos 150MCD (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba), Figura 6, el cual incorpora las fuentes de rayos X comentadas anteriormente de Al o Mg, habiendo utilizado en nuestro caso esta última y como sistema de vacío una cámara principal que opera a una presión de $5 \cdot 10^{-9}$ Pa.



Figura 6. Espectrómetro XPS SPECS Phoibos 150MCD.

Los barridos de las muestras fueron realizados en el rango comprendido entre 40 y 1150 eV, siendo las señales de los átomos de interés examinados y optimizados mediante la acumulación de espectros en la zona de energía de enlace definidas para esos átomos (como es el caso de las regiones del Au 4f, C 1s, O 1s, S 2p y Br 3p). Los

espectros así obtenidos fueron tratados con el programa SPECS y analizados con el software CasaXPS del propio equipo de medida.

Por tanto, puede decirse que XPS es una herramienta poderosa para analizar la química de la superficie de los materiales y también es una buena opción para la cuantificación de las moléculas que se encuentran modificando la superficie del material. Sin embargo, las señales de energía de unión normalmente se superponen parcialmente entre sí debido a la similitud de los estados químicos de los elementos, por ello es necesario un riguroso proceso de deconvolución para un análisis confiable, que depende significativamente de la experiencia del operador. Para evitar la ambigüedad y la subjetividad de la deconvolución, es necesario utilizar otra técnica de caracterización que acompañe a XPS para respaldar los resultados de la deconvolución y obtener la información confiable de la química de la superficie del material a analizar.

2.2.4. Espectroscopía Raman

La espectroscopia Raman puede medir los modos de vibración, rotación y otros modos de baja frecuencia, y se usa comúnmente para analizar la información química y estructural de los materiales.⁴ Los principios de la espectroscopia Raman e IR son muy similares. Raman proporciona información química a través del análisis de la dispersión de la luz donde solo los movimientos moleculares con cambio de polarizabilidad son "activos". Estos dos métodos proporcionan información estructural complementaria.

Los recientes avances en esta microscopía han aumentado significativamente la gama de aplicaciones que ahora se extienden desde el diagnóstico médico hasta la exploración de interfaces entre organismos biológicos y nanomateriales. Se ha propuesto como un método para monitorizar nanomateriales en sistemas biológicos, ya que potencialmente proporciona una sonda no invasiva, libre de etiquetas, de la propia nanopartícula, el ambiente local y la fisiología del organismo.

Las medidas a través de esta técnica se han realizado en la Universidad de Lincoln, Reino Unido, donde se trabajó con un espectrómetro Raman HORIBA Jobin Yvon LabRaman (Figura 7) con una rejilla holográfica de $1800 \text{ gr}\cdot\text{mm}^{-1}$. La línea de excitación fue proporcionada por dos láseres, uno de argón a 532nm y otro de HeNe a 632.8 nm. El haz de láser fue enfocado a través de un objetivo Japan LMPlanFL N 50x/0.50.

Para ello las muestras fueron depositadas sobre un vidrio de cuarzo, dejándolas secar *overnight* en el caso de las muestras líquidas como es el caso de las nanopartículas de oro. Posteriormente mediante el uso de los láseres de 532 y 632.8 nm, utilizando potencias de laser variables en función del tipo de muestra y un objetivo de 50x, se obtuvieron los diferentes espectros para su análisis. Los espectros Raman obtenidos fueron tratados con el software LabSpec con el que se llevó a cabo la corrección de las líneas de base, así como el estudio de los picos obtenidos.

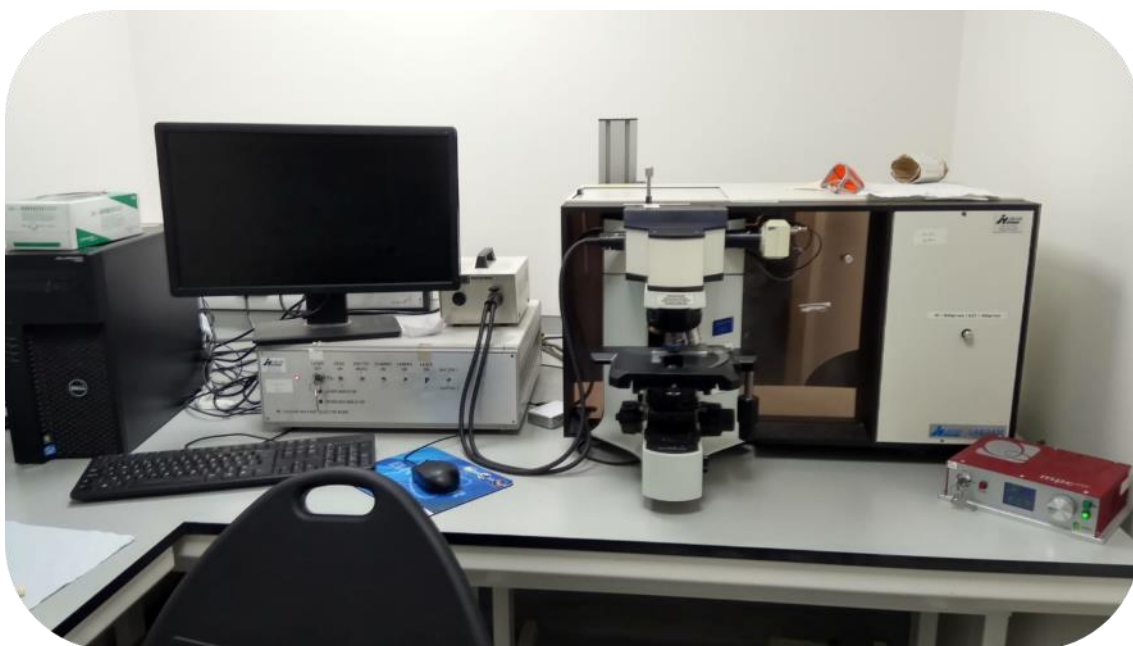


Figura 7. Espectrómetro Raman HORIBA Jobin Yvon LabRaman

2.3. Técnicas electroquímicas

La técnica de voltamperometría cíclica permite obtener información sobre los parámetros cinéticos y termodinámicos de los procesos de transferencia de carga o redox en la interfase sólido-líquido bajo el control del potencial aplicado. Las curvas de potencial se registran barriendo el potencial aplicado hacia valores positivos o negativos utilizando un electrodo de trabajo polarizable sumergido en una solución de electrolito, donde pueden tener lugar reacciones redox de especies disueltas o inmovilizadas en la superficie (respuesta farádica) en el intervalo de potencial escaneado.

2.3.1. Celdas y electrodos

Las medidas electroquímicas se realizaron en una celda de vidrio Metrohm con una capacidad de 25 ml de volumen de disolución del electrolito (tampón fosfato 0.1 M a pH 7). La celda de vidrio tiene una tapadera con cinco entradas, cuatro de ellas están dedicadas a los tres electrodos y al sistema de purga de nitrógeno. Los experimentos se llevaron a cabo en una configuración de celda de tres electrodos utilizando un hilo de Pt como contraelectrodo, un electrodo de Ag/AgCl saturado como electrodo de referencia y uno de carbono vítreo (GC) de 3 mm de diámetro como electrodo de trabajo (Figura 8).

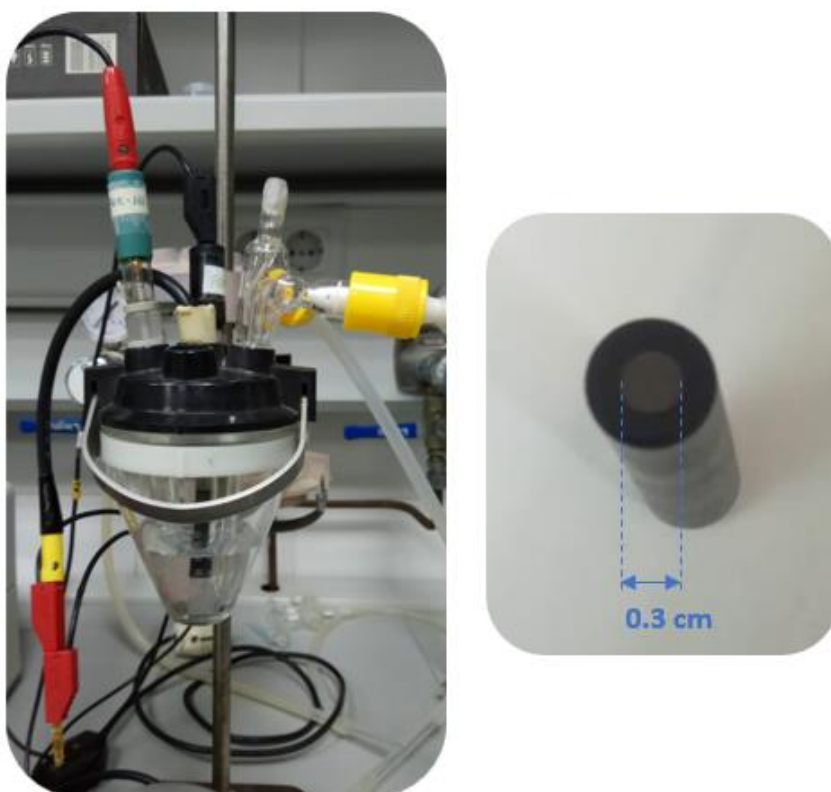


Figura 8. Celda electroquímica con el conjunto de electrodos. Derecha: electrodo GC utilizado en el trabajo.

La preparación del electrodo GC consistió en una limpieza mecánica previa mediante pulido con polvo de alúmina ($0.05 \mu\text{m}$) sobre una pulidora (METASERV 2000) dotada con un paño Buehler. Tras varios lavados con agua, los posibles restos de impurezas se eliminaron con un baño de ultrasonidos mediante un tratamiento de 5-10 minutos en agua ultrapura MilliQ. Tras estos procedimientos se procedió a la deposición de la

muestra mediante la técnica de “drop-casting” sobre la superficie del GC, tras su secado a temperatura ambiente se procedió en algunos de los casos a la inmovilización mediante el uso de una membrana de un polímero sintético (Nafion).

2.3.2. Medidas electroquímicas

Las medidas electroquímicas se han realizado previa eliminación del oxígeno disuelto mediante burbujeo de una corriente de gas de nitrógeno durante 15 minutos, manteniéndose bajo una atmósfera de nitrógeno inerte durante las medidas. Tras este tiempo se ha observado que la intensidad y potenciales de los picos voltamperométricos son reproducibles.

Los experimentos electroquímicos se realizaron usando un instrumento Autolab (Ecochemie model Pgstat30) (Figura 9). Para el control total de los experimentos, la adquisición de los datos y el análisis de los voltagramas ha sido utilizado el programa GPES 4.9, disponible como software del propio equipo de medida. Este programa permite el análisis de los voltagramas como la medida de la línea de base con distintas funciones (lineal, exponencial y polinómica), la corrección de la caída óhmica, así como la determinación automática de parámetros como intensidad, potencial, carga, semianchura de pico, etc.

Las tasas de escaneo y los valores de rango potenciales se seleccionaron de acuerdo con las diferentes condiciones experimentales probadas en este trabajo.



Figura 9. Instrumento Autolab (Ecochemie model Pgstat30).

2.4. Técnicas de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS) y medidas de potencial Z

Las técnicas de dispersión de luz así como de medida de potencial Z nos permiten obtener información importante sobre diferentes aspectos como son el tamaño y la estabilidad de las partículas. Por ello resulta importante su aplicación con objeto de conocer las condiciones en las que se encuentran los materiales en suspensión.

DLS, también conocida como espectroscopia de correlación fotónica o dispersión de luz cuasi-elástica, es una técnica usada de manera rutinaria para analizar el tamaño hidrodinámico y la distribución de partículas con diámetros que van desde unos pocos nm hasta unas pocas micras. Este instrumento detecta las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada causadas por el movimiento browniano de las partículas suspendidas en un líquido. Esta dispersión de la radiación como consecuencia del movimiento de las partículas genera interferencias constructivas y destructivas a lo largo del tiempo. En DLS esta fluctuación de la intensidad de luz dispersada se correlaciona con pequeños intervalos de decaimiento, obteniéndose la función de autocorrelación según la siguiente ecuación:

$$G(\tau) = 1 + b \cdot e^{-2D_t q^2 \tau}$$

donde, b es una constante que depende de la configuración óptica del instrumento, D_t es el coeficiente de difusión de traslación y q es un vector de dispersión que se puede expresar como:

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}}$$

donde, n_0 es el índice de refracción (IR) del disolvente, λ_0 es la longitud de onda de la luz en el vacío y θ es el ángulo de dispersión al que trabaja el equipo.

Esta intensidad ($G(\tau)$) se suele escribir como $G_2(\tau)$ y se expresa como una función de la función de correlación de campos $G_1(\tau)$ según la siguiente ecuación:

$$G_2(\tau) = 1 + G_1(\tau)^2$$

A partir de estos datos se genera un correlograma donde se representa RCF (función de correlación sin procesar) contra el tiempo de retardo (τ) como se expresa en la ecuación:

$$RCF = G2(\tau) - 1 = G1(\tau)^2$$

A partir del análisis de esta función de autocorrelación obtenida, se calcula el coeficiente de difusión de las partículas suspendidas y se determina el tamaño hidrodinámico de las partículas aplicando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_H}$$

donde D es el coeficiente de difusión de traslación, η es la viscosidad, T la temperatura absoluta, k la constante de Boltzmann y D_H es el diámetro hidrodinámico.

Estas ecuaciones ponen de manifiesto que la medida depende de diferentes parámetros como son la viscosidad del medio, la óptica del instrumento, la temperatura y el índice de refracción del material, entre otros. Por otro lado, otro efecto importante que se produce y puede evitarse es el *scatter* múltiple debido a la dispersión de la luz por múltiples partículas dando errores de en la medida. Por ello en el equipo utilizado en este trabajo usa una óptica de detección de 175° (Figura 10). Esta metodología se conoce como detección por retro dispersión, back-scattering o Non-Invasive Back-Scatter (NIBS).

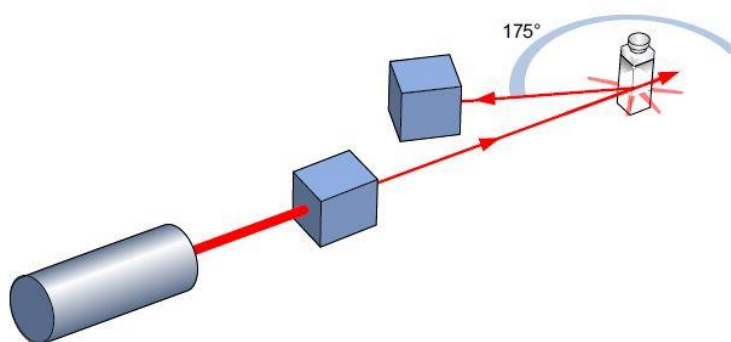


Figura 10. Disposición óptica del equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP.

Al realizar las medidas con esta metodología se puede trabajar con muestras más concentradas, ya que el paso óptico es menor y por tanto hay menos error de medida y

evita que posibles interferencias como restos plásticos o polvo que pueden encontrarse en las muestras den interferencias al reducir este paso óptico.

El potencial Z, también denominado potencial electrocinético, es el potencial en el plano de deslizamiento o de corte de una partícula coloidal que se mueve bajo la acción del campo eléctrico. El potencial eléctrico de una superficie es la cantidad de trabajo que se necesita hacer para llevar una unidad de carga positiva desde el infinito a la superficie sin ninguna aceleración. El potencial Z refleja la diferencia de potencial entre la EDL de las partículas electroforéticamente móviles y la capa de dispersante que las rodea en el plano de deslizamiento (Figura 11).

Como se comentaba en el Capítulo 1, el potencial superficial de una partícula, potencial ψ no puede determinarse y el campo electrostático disminuye en la dispersión con la distancia desde la superficie de la partícula según la ecuación:

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x}$$

donde ψ es el potencial superficial a la distancia x desde la capa de Stern, ψ_d es el potencial superficial en la capa de Stern, κ es el parámetro de Debye-Hückel y x es la distancia.

Cuando el plano de deslizamiento está próximo a la capa de Stern, $\psi_d \approx \zeta$ y por tanto la ecuación anterior queda como:

$$\psi = \zeta e^{-\kappa x}$$

De este modo el potencial Z no puede determinarse directamente y se deduce de la movilidad electroforética de partículas cargadas bajo la presencia de un campo eléctrico aplicado.

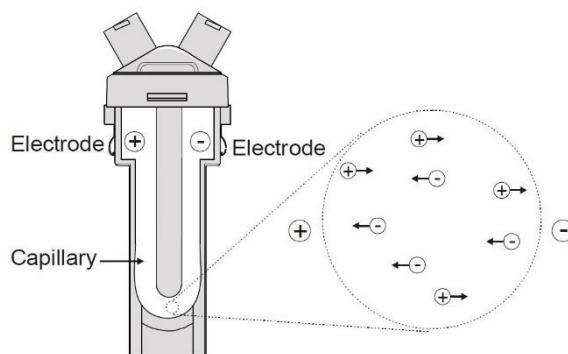


Figura 11. Celda utilizada para medir el potencial Z.

Esta movilidad electroforética (μ_e) de las partículas se calcula según la siguiente ecuación:

$$\mu_e = \frac{V}{E}$$

donde V es la velocidad de la partícula ($\mu\text{m/s}$) y E es la fuerza del campo eléctrico aplicado (Voltios/cm), parámetros conocidos en ambos casos. De esta forma el potencial Z es calculado a partir de esta movilidad electroforética y la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(Ka)}{3\eta}$$

donde ε_r es la constante de permitividad dieléctrica relativa, ε_0 es la permitividad en el vacío, ζ es el potencial Z, $f(Ka)$ es la función de Henry y toma diferentes valores según el medio, y η es la viscosidad.

En este trabajo se ha utilizado un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZSP (Instituto Universitario de Nanoquímica de la Universidad de Córdoba, IUNAN) (Figura 12), con objeto de evaluar el diámetro hidrodinámico y la carga superficial de las nanopartículas. El instrumento está equipado con un láser de 633 nm de He-Ne y un autovalorador MPT-2. Los datos medidos son el promedio de al menos 20 barridos. Los diámetros hidrodinámicos promedio y potencial zeta de cada muestra se determinaron usando el software proporcionado junto al equipo (ZetaSizer Software 7.11).



Figura 12. Instrumento Malvern Zetasizer Nano ZSP.

2.5. Medidas y tratamientos de datos

El material de vidrio utilizado se lavó previamente utilizando bien disolución de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1), también conocida como disolución “*piraña*”, con objeto de eliminar cualquier impureza orgánica o bien con disolución de HCl/HNO_3 (3:1), conocida como “*agua regia*” con objeto de eliminar los restos de oro que pudieran quedar adsorbidos en el material. A continuación, y tras la exposición del material a estas disoluciones, se somete a un lavado exhaustivo con agua ultrapura Milli-Q (Barnstead System) que tiene una resistividad mínima de $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, quedando el material de este modo dispuesto para su uso.

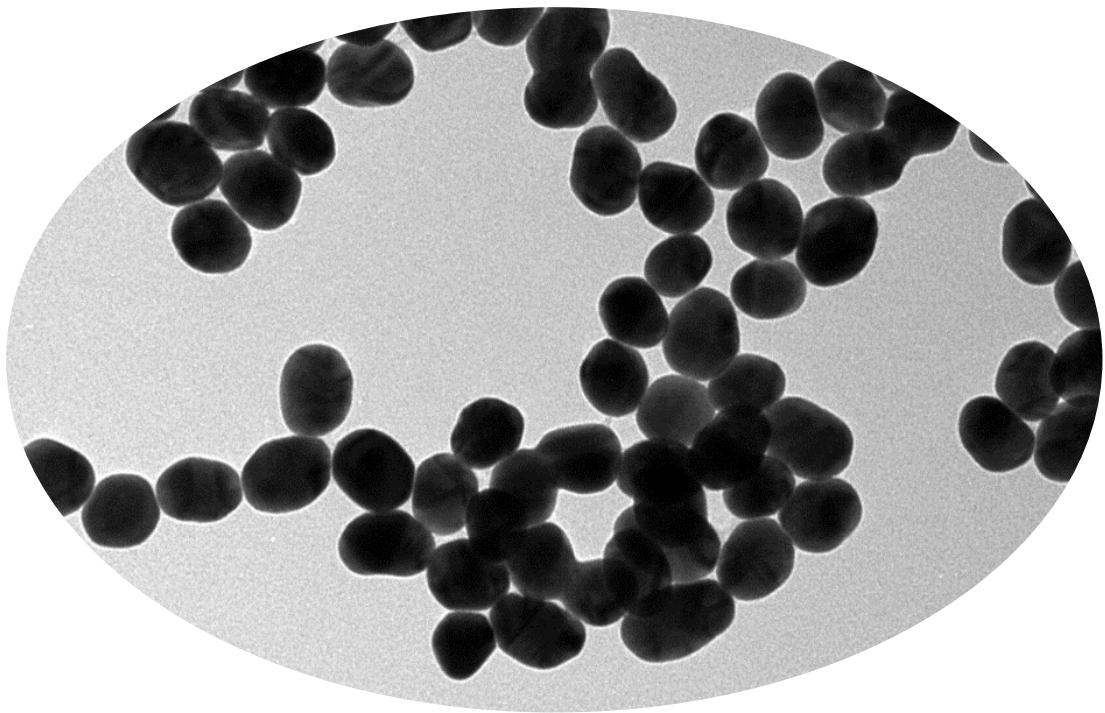
Las imágenes de las proteínas fueron realizadas mediante el software Swiss-Pdb Viewer.

El procesamiento, representación y ajustes de los datos que se muestran a lo largo de la memoria, se realizaron utilizando el software Microcal Origin Pro 7.0.

2.6. Bibliografía

1. M. Jackson, H. H. M., *Protein Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy*. Oxford University Press: New York, 2001.
2. Jackson, M.; Mantsch, H. H., The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein-Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1995**, *30* (2), 95-120.
3. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H., New Insight into Protein Secondary Structure from Resolution-Enhanced Infrared-Spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *952* (2), 115-130.
4. Yan, P. Q.; Zhang, B. S.; Wu, K. H.; Su, D. S.; Qi, W., Surface chemistry of nanocarbon: Characterization strategies from the viewpoint of catalysis and energy conversion. *Carbon* **2019**, *143*, 915-936.

Capítulo 3



*Nanopartículas de oro
esféricas (AuNPs)*

3. Nanopartículas de oro esféricas (AuNPs).

3.1. Introducción.

El objetivo principal de los estudios de la interacción de nanomateriales (NMs) con el entorno biológico es entender su comportamiento *in vivo* y ayudar en el diseño racional de los sistemas de distribución de fármacos.¹ Se acepta que la adsorción de proteínas tiene lugar tan pronto como los NMs se ponen en contacto con el medio biológico, produciendo cambios en la propia identidad biológica de los NMs en cuanto la superficie se rodea por la *corona* de proteínas. Esta *corona* de proteínas actúa como una antena primaria y se comunica con la maquinaria biológica creando nuevas interacciones celulares.²⁻⁴ El concepto de *corona* de proteínas que se definió por primera vez por Dawson y col.⁵⁻⁷ establece que, cuando los NMs se dispersan en un sistema biológico, se cubren rápidamente por una película dinámica de biomoléculas, principalmente proteínas, que además no es homogénea espacialmente. La capa interna (*hard corona*) se intercambia lentamente con las proteínas en disolución pero las capas externas (*soft corona*) se componen de proteínas débilmente enlazadas que se intercambian muy rápido.^{8 9}

Un punto importante es que las señales biológicas de las proteínas que se adsorben en la superficie permanecen elusivas en lo que respecta a si su conformación es diferente de la de su estado nativo.¹⁰ De hecho, la conformación tridimensional de las diferentes proteínas en los NMs es presumiblemente diferente a la de sus estados nativos, aunque aún permanece por explorarse cómo este efecto afecta a las interacciones NM-célula y NM-organismo vivo.^{1, 2, 11, 12} De hecho, la falta de conocimiento de las interacciones entre los NMs y el entorno fisiológico, tales como la sangre o los fluidos intersticiales, es una de las razones principales por las que la puesta a punto de estos sistemas no se ha establecido todavía.¹³ Los fluidos biológicos están compuestos de electrolitos, proteínas, lípidos y metabolitos y todos estos componentes pueden adsorberse en la superficie de los NMs.^{4, 14-18} Las nuevas capas que rodean al NM apantallan sus propiedades superficiales originales y alteran el tamaño y composición proporcionando una nueva identidad biológica.^{3, 17, 19}

La aplicabilidad de las nanopartículas de oro (AuNPs) se debe a las propiedades únicas que exhiben y que son de carácter químico, físico y óptico así como a la facilidad con la que pueden ser funcionalizadas por químicas relevantes para la biología.²⁰ El diseño preciso de AuNPs para la incorporación eficiente en el medio biológico es necesario para entender cómo estos materiales y sus propiedades se alteran y cómo los componentes del medio biológico responden a su presencia. Por tanto, la descripción fisicoquímica fundamental de la interfase *nano-bio* debe conocerse. Este conocimiento incluye la conformación de las proteínas que forman la *hard corona* y, cuando sea posible, la *soft corona*. Además, el desarrollo de nuevas estrategias para crear NPs con identidad biológica predecible/controlable, por recubrimiento con proteínas específicas, es una vía prometedora para controlar la formación de la *corona*, principalmente a partir de interacciones proteína-proteína. Además, de esta manera se puede conseguir un *targeting* aumentado por reclutamiento de proteínas a partir del medio biológico. En este sentido, la optimización de las propiedades de la superficie de la NP, bien por recubrimiento previo de proteínas o modificaciones químicas específicas, puede proporcionar un aumento en la accesibilidad de sus sitios activos a los receptores celulares.

En general, a causa del tamaño y la ruta de administración, las NPs pueden alcanzar fácilmente el flujo sanguíneo y las primeras entidades biológicas que se encuentran son las células rojas (glóbulos rojos) de la sangre (RBCs). Zhao y col.²¹ han encontrado que las NPs de sílice de diferentes tamaños y propiedades superficiales interactúan con RBCs humanas conduciendo a toxicidad, primero por la unión de los silanos que se encuentran de forma abundante en la superficie de las NPs a las moléculas de fosfatidilcolina presentes en la membrana celular y segundo, produciendo la flexión de las membranas para adaptarse a la superficie rígida de la sílice, que causa la disrupción de la célula. Aunque la formación de la *corona* de proteínas en las NPs al contactar con el fluido sanguíneo mitigue o suprima la hemólisis, no hay información de cuánta proteína es necesaria o cómo algunas proteínas intrínsecas como la hemoglobina (Hb) contribuyen a este fenómeno. En este sentido, un elegante estudio de espectroscopía SERS sobre la interacción de NPs de oro y plata con RBCs²² indica la interacción de las NPs con estas células así como con las proteínas Hb y con otros componentes de los

glóbulos rojos. Los autores concluyen que el uso de esta información espectral ayudará a aprender más sobre el papel de la membrana del eritrocito en la absorción de la NP. Así, es de gran interés estudiar la interacción de Hb con diferentes NPs y esta proteína se ha elegido en el presente estudio como un caso para la caracterización del complejo bioquímico proteína-AuNP. Ha habido intentos previos para estudiar los bioconjugados formados con Hb y NPs de plata,²²⁻²⁸ pero ninguno de ellos se ha dirigido al comportamiento en disolución acuosa bajo diferentes condiciones de pH para examinar la estabilidad frente a la agregación.

La electroquímica directa de proteínas redox es difícil de llevar a cabo en los electrodos de trabajo convencionales debido, por una parte, a que los centros activos se encuentran muy internos en la estructura tridimensional de la proteína y, por otra, a la orientación desfavorable que adoptan estas con respecto a la superficie del electrodo. Para acelerar la velocidad de transferencia electrónica, se han usado electrodos modificados de diferente forma para acortar la distancia entre los centros activos y los electrodos dirigiendo a la proteína a inmovilizarse en la orientación adecuada.²⁹⁻³¹ En este sentido, los materiales nanoestructurados y los NMs de diferente naturaleza y morfología se están utilizando actualmente para modificar electrodos aprovechando la ventaja de su alta conductividad, gran área superficial y buena biocompatibilidad, para facilitar la transferencia electrónica de las proteínas redox.²⁹ El reto es desarrollar un sistema apropiado para la inmovilización de la proteína redox, de forma que la velocidad de transferencia electrónica aumente con respecto a los sustratos metálicos clásicos.

La Hb es una metaloproteína típica con una estructura cuaternaria que contiene cuatro cadenas polipeptídicas (cadenas globina) y un grupo hemo en cada unidad de cadena globina. Sin embargo, como proteína intrínseca,^{32, 33} Hb no tiene una proteína redox como pareja para intercambio electrónico y, por tanto, puede carecer de caminos de túnel electrónico dentro de su propia estructura. Esta podría ser la razón de su ineficiente transferencia electrónica cuando se estudia usando un electrodo desnudo. Aun así, la electroquímica directa de Hb se ha conseguido en diferentes electrodos modificados usando biopolímeros,^{34, 35} membranas³⁶ y nanocompositos.^{37, 38}

Los conjugados proteína-NP, en particular aquellos formados con AuNPs, se han usado ampliamente para diferentes aplicaciones.³⁹ La buena biocompatibilidad de

AuNPs⁴⁰ junto con la fácil química de modificación,⁴¹⁻⁴³ sus propiedades únicas ya citadas y la posibilidad de cargar alta cantidad de proteínas, hacen de ellos muy buenos candidatos para probar la capacidad de facilitar la transferencia electrónica de la proteína Hb.⁴⁴

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo un estudio de los bioconjugados formados al mezclar Hb con AuNPs protegidas por aniones citrato (c), 6-mercaptopurina (MP) y ácido ω -mercaptoundecanoico (MUA). La caracterización de bioconjugados se lleva a cabo usando técnicas espectroscópicas tales como UV-visible y ATR-IR, dispersión dinámica de luz y medidas de potencial zeta y electroquímicas como la voltamperometría cíclica. En este trabajo se ha puesto interés en la evaluación de la estabilidad de los bioconjugados formados con AuNPs protegidas con capas superficiales de diferente identidad química, los cambios conformacionales en la estructura de la proteína al interactuar con las NPs y cómo esto se influye por el pH de la disolución. Además, se ha estudiado la funcionalidad de la proteína examinando la respuesta redox del bioconjugado depositado en un electrodo de carbón vitrificado, así como las propiedades electrocatalíticas de la Hb frente a peróxido de hidrogeno y oxígeno.

3.2. Experimental.

3.2.1. Reactivos.

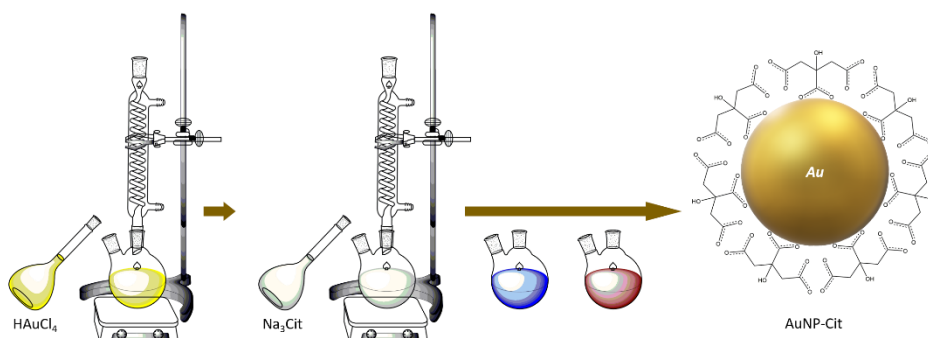
Hemoglobina, de sangre de bovino (Hb), 6-mercaptopurina (MP), ácido ω -mercaptoundecanoico (MUA) y NaOH fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se preparó, usando un procedimiento de la literatura,⁴⁵ a partir de oro metálico del 99.99% de pureza y fue almacenado en congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. El resto de los reactivos fueron de Merck (grado analítico). Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada producida por un sistema Millipore.

3.2.2. Síntesis de cAuNPs.

La preparación de nanopartículas de oro (AuNPs) se ha llevado a cabo siguiendo el método clásico que consiste en la reducción del ácido tetracloroaurico por aniones citrato los cuales actúan como agente reductor, decapante y estabilizador del coloide.⁴⁶⁻

⁴⁸ El procedimiento se lleva a cabo como sigue (Esquema 1): 50 mL de disolución acuosa

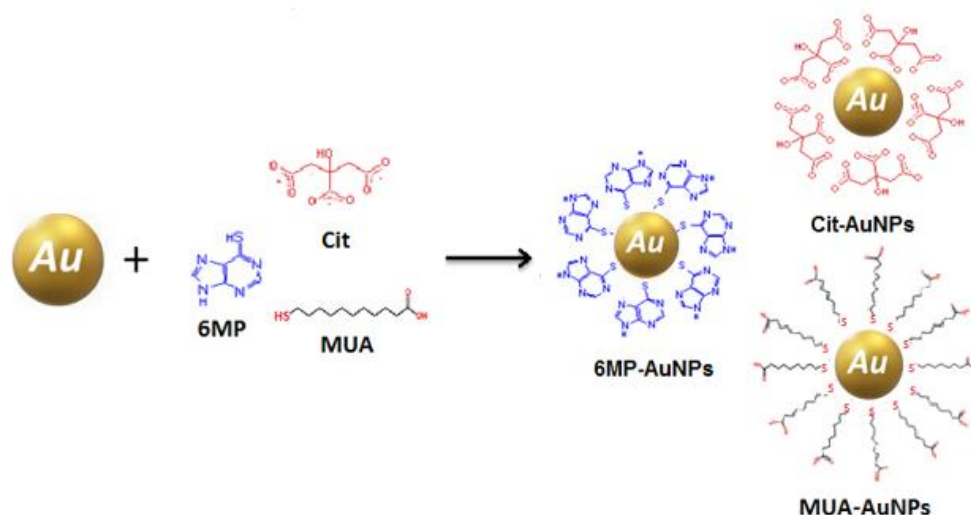
de HAuCl_4 1 mM se calientan en un sistema de reflujo con agitación vigorosa hasta observar la ebullición del líquido. En ese momento se añaden 5 mL de una disolución acuosa de citrato trisódico 38.8 mM, observándose un cambio en el color de la mezcla desde amarillo a incoloro, después a azul oscuro y finalmente a rojo vino. Al alcanzar la coloración rojiza, se retira la mezcla del calefactor y se deja enfriar con agitación. La preparación coloidal resultante se almacena en un frasco de vidrio opaco. Las nanopartículas así preparadas, cAuNPs, son estables varios meses.



Esquema 1. Procedimiento de síntesis de cAuNPs.

3.2.3. Modificación de AuNPs con monocapas autoensambladas.

La preparación de MP-AuNPs y MUA-AuNPs se ha realizado por modificación superficial de cAuNPs utilizando MP o MUA y aprovechando la estrategia de formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie del oro. Para ello se añade un exceso de unas 10 veces del mercaptoderivado a la disolución de cAuNPs, teniendo en cuenta la cantidad necesaria para formar una monocapa completa. La mezcla se mantiene bajo agitación durante 12 horas y el exceso de reactivos se elimina mediante diálisis frente a disoluciones de 10 mM NaOH. La formación de la monocapa autoensamblada es concomitante con el desplazamiento de los aniones citrato de la superficie de las AuNPs, lo que se ha demostrado mediante espectroscopia FT-IR.^{41, 43}



Esquema 2. Procedimiento de modificación de cAuNPs con MP y MUA.

3.2.4. Formación de los Bioconjugados.

Para evitar la agregación, los bioconjugados se han formado mezclando las cantidades apropiadas de AuNPs y proteínas en disolución acuosa a pH 12 e incubando a una temperatura de 4 °C por al menos 30 min.⁴⁴ Las disoluciones stock de los bioconjugados se han usado en los diferentes experimentos diluyendo en el tampón de interés o centrifugando para obtener preparaciones más concentradas. Los estudios de la influencia del pH se han llevado a cabo mediante experimentos de valoración comenzando a pH 12.

3.3. Resultados y discusión.

Las AuNPs sintetizadas según la metodología descrita en la sección 3.2.2. poseen una forma próxima a la esférica y, por tanto, muestran un espectro UV-visible característico en la región próxima a los 520 nm, banda de absorción conocida como de plasmon superficial localizado (LSPR). Esta característica permite una caracterización fisicoquímica muy interesante que ofrece información diversa sobre cuestiones como la estabilidad en disolución acuosa bajo diferentes condiciones experimentales y sobre la posibilidad de interacción con moléculas de diferente tamaño y propiedades. Por tanto, en este trabajo, se lleva a cabo un estudio mediante esta técnica espectroscópica con el objeto de tener una evaluación inicial de las propiedades de los sistemas que se prepararan a partir de estos nanomateriales.

3.3.1. Caracterización mediante espectroscopia UV-visible de los sistemas derivados de c-AuNPs con diferentes capas protectoras y de los bioconjugados Hb-AuNPs.

El procedimiento clásico de síntesis descrito en la sección experimental permite obtener dispersiones estables de AuNPs que además presentan un tamaño muy homogéneo, es decir, un alto índice de monodispersidad. Como se muestra en la Figura 1, el espectro UV-visible de una disolución acuosa a pH neutro, que contiene cAuNPs, muestra una banda LSPR con máximo a 520 nm que corresponde a formas esféricas con un diámetro de entre 13 y 15 nm.⁴⁹

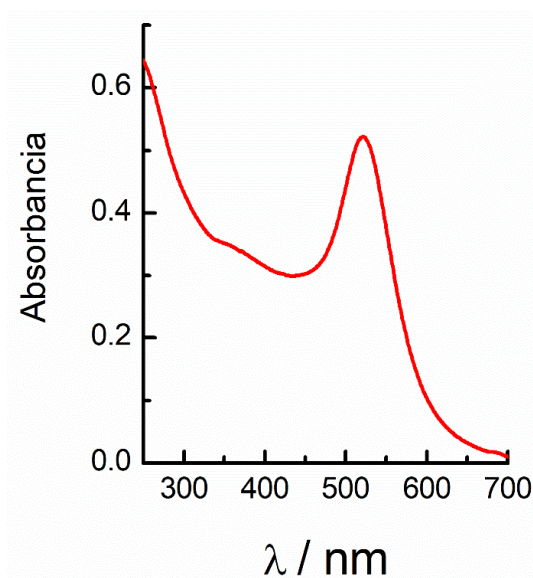


Figura 1. Espectro UV-Visible de cAuNPs.

Esta metodología de síntesis produce AuNPs que se encuentran protegidas por capas de aniones citrato que se usan en el procedimiento de síntesis y que actúan tanto como agente reductor como decapante. Estos aniones citrato, débilmente unidos a la superficie del núcleo de oro, confieren la estabilidad debido a la presencia de interacciones repulsivas entre las unidades que presentan carga superficial negativa. Con el objeto de estudiar, por una parte, la integridad de la capa protectora de citrato y, por otra, la influencia de la naturaleza química de otras capas superficiales en la posible formación de bioconjugados, se ha llevado a cabo la modificación de la superficie utilizando la estrategia de autoensamblado molecular (self-assembled-monolayer: SAM) utilizando moléculas de MP y MUA. Para formar estas SAMs sobre la superficie de las AuNPs es necesario desplazar la capa existente de citrato sobre la partícula. Esta operación de intercambio de ligandos es factible debido, fundamentalmente, a la unión débil comentada más arriba de la capa aniónica. Las condiciones experimentales que se utilizan para llevar a cabo el procedimiento de intercambio de ligandos se eligen de manera que las SAMs se formen de manera concertada y no se produzca la desestabilización de la dispersión durante el intercambio. Para ello se elige una disolución de intercambio en medio alcalino que garantiza la presencia de carga negativa en el coloide. Así, se obtienen preparaciones de MP- y MUA-AuNPs que son estables en disoluciones 10 mM de NaOH. Como puede observarse en los espectros de absorción que se muestran en la Figura 2, la presencia de una capa superficial unida fuertemente a la superficie del oro provoca un pequeño cambio en la posición de la banda LSPR con respecto a cAuNPs de unos pocos nanómetros. Este desplazamiento de la banda se debe al cambio en la constante dieléctrica del medio que rodea a las AuNPs.⁵⁰

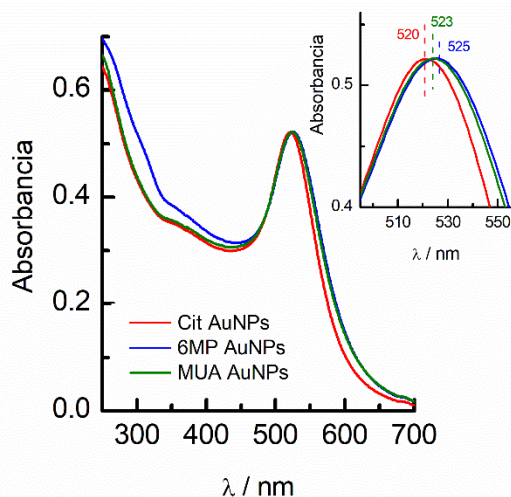


Figura 2. Espectros UV-visible normalizados de c-, MP- y MUA-AuNPs en tampón fosfato 10 mM, pH 7.4. Insert: Vista ampliada de la región del máximo de los espectros para resaltar los cambios en el máximo de las bandas LSPR.

El análisis preciso de los posibles cambios en los espectros de los bioconjugados puede hacerse si se conoce bien el comportamiento de los sistemas aislados. Por tanto, es necesario estudiar, en primer lugar, el comportamiento de la proteína libre bajo condiciones experimentales similares y, para ello, se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento de Hb en medio acuoso mediante espectroscopia UV-visible. En la Figura 3 se recogen los espectros de disoluciones de Hb a diferentes pH.

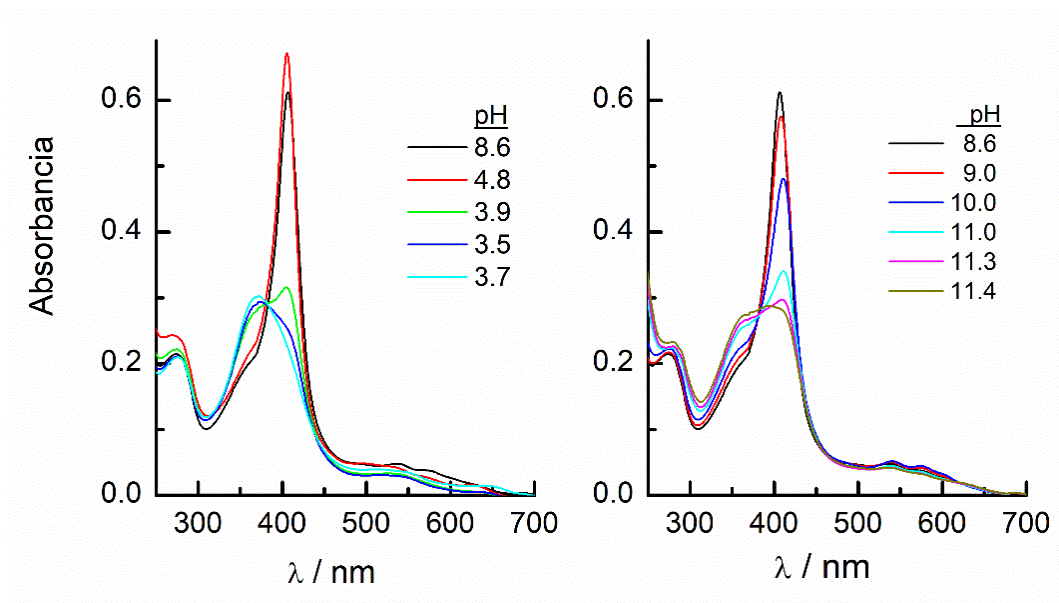


Figura 3. Espectros UV-visible de Hb 3 μM en tampón fosfato 10 mM a diferentes pH.

El espectro de Hb en medio neutro, muestra bandas localizadas a 279 nm (debida a los residuos de Trp y Tyr de la cadena polipeptídica), 349 nm (banda ϵ), 406 nm (banda Soret característica de la porfirina, transición electrónica permitida $\pi \rightarrow \pi^*$), 500 y 630 nm (bandas Q).⁵¹ Estas características se mantienen en un amplio intervalo de pH en la región neutra pero, tanto en medio ácido como alcalino, se observan cambios importantes, fundamentalmente en la banda Soret cuyo máximo se desplaza hacia mayores o menores longitudes de onda, cambio que se acompaña de la disminución de la absorbancia.

La formación del bioconjugado Hb-cAuNP se realiza mediante la adición de cantidades determinadas de proteína a una disolución de cAuNPs y, los cambios que se producen se monitorizan mediante espectroscopia UV-visible. La Figura 4 muestra los espectros obtenidos para una disolución de cAuNPs en presencia de concentraciones crecientes de Hb. A relaciones molares de Hb/cAuNP mayores de 200/1, la banda LSPR se mantiene constante mostrando un desplazamiento de 6 nm con respecto a la señal de AuNPs en ausencia de proteína. Este desplazamiento se toma como evidencia de la formación de una *corona* de proteínas.^{52, 53} Como se ha indicado más arriba, la presencia de una capa molecular en el entorno inmediato de la nanopartícula, con un valor de constante dieléctrica y/o espesor diferentes da lugar a cambios en la posición de la banda. La señal observada a 406 nm corresponde a la banda Soret de Hb, típica de met-Hb, que es la especie estable en tampón de fosfato 10 mM a pH 7.4.

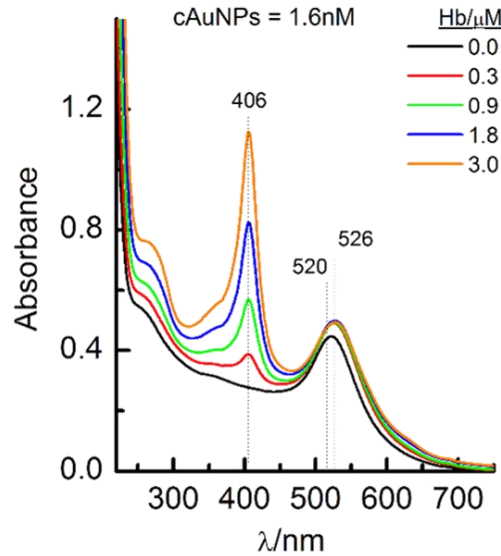


Figura 4. Espectros UV-visibles de Hb-cAuNPs a diferentes relaciones molares de Hb/cAuNPs, en tampón fosfato 10 mM a pH 7.4.

En el caso de los bioconjugados formados por MP- y MUA-AuNPs se ha observado un comportamiento similar al encontrado con c-AuNPs, por lo que los estudios posteriores se llevan a cabo utilizando la relación molar 200/1 para garantizar que se forma la *corona* de proteínas y evitar la influencia de un exceso de proteína libre en disolución. En la Figura 5 se recogen algunos espectros UV-visible significativos de los bioconjugados c-, MP- y MUA-AuNPs-Hb a diferentes pH.

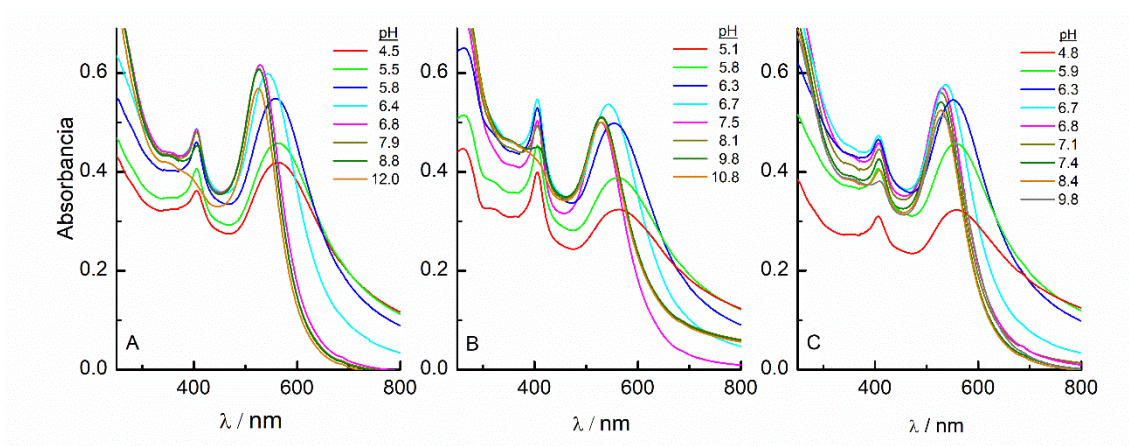


Figura 5. Espectros UV-visible de c-, MP- y MUA-AuNPs-Hb a diferentes pH.

Como puede observarse, en los tres casos se obtiene una banda LSPR en torno a 528 nm en la zona de medio alcalino. Al alcanzarse la región de pH neutro, la banda se desplaza a longitudes de onda más largas, aumentando la anchura a la vez que empieza a disminuir en absorbancia. Este fenómeno es una clara evidencia de la agregación de los bioconjugados. En la Figura 6 se recogen las variaciones de la longitud de onda de los máximos de las bandas LSPR tanto en ausencia como en presencia de la proteína para los tres bioconjugados estudiados. El comportamiento de las AuNPs en función del pH se ha visto⁵³ que está causado por el estado de carga de la superficie de la partícula y, por tanto, depende fuertemente de la naturaleza de las moléculas que forman la capa protectora. Así, en el caso de c-AuNPs la banda LSPR no cambia con el pH hasta que la disolución se vuelve fuertemente ácida, coincidiendo con la primera constante de disociación de la molécula de ácido cítrico ($pK_1 \approx 2$) donde se observa un desplazamiento abrupto hasta alcanzar los 630 nm, concomitante con la agregación de las c-AuNPs. En el caso de MP-AuNPs se ha visto que estas nanopartículas son estables en medio alcalino debido a las cargas negativas de las moléculas de MP que muestran un pK de disociación en torno a pH 6.^{41, 42} Por último, las MUA-AuNPs han demostrado ser uno de los sistemas más estables en disolución acuosa. De hecho, la banda LSPR cambia de acuerdo con el pK de disociación del grupo carboxílico de MUA pero el desplazamiento es mucho menor que en los casos anteriores, lo que estaría de acuerdo con una menor tendencia a la agregación de estas partículas ($\Delta\lambda = 116, 124$ y 55 nm para c- MP- y MUA-AuNPs, respectivamente). Por tanto, la protección superficial de las nanopartículas les confiere un comportamiento en cuanto al punto de inflexión y al desplazamiento de la banda LSPR que depende fuertemente de la naturaleza de las moléculas que forman la capa protectora. Sin embargo, los correspondientes bioconjugados muestran un comportamiento muy similar. De hecho, los desplazamientos obtenidos son de 38, 32 y 34 nm y los puntos de inflexión de 6.3, 6.5 y 6.5 para los bioconjugados formados por c-, MP- y MUA-AuNPs, respectivamente. Estos detalles dan cuenta de la formación de una *corona* de Hb en la superficie de la nanopartícula con una estructura global que es independiente de la modificación superficial previa de la nanopartícula, y que el fenómeno de agregación tiene lugar cuando cambia la carga global del bioconjugado.

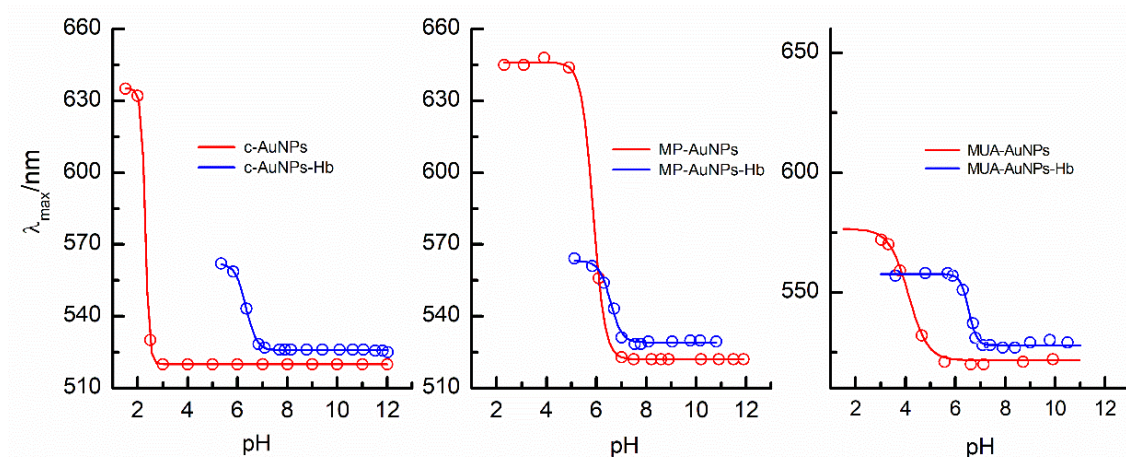


Figura 6. Cambios de la longitud de onda LSPR en función del pH de la solución. (a) Rojo: cAuNPs; Azul: Hb-cAuNPs. (b) Rojo: MP-AuNPs; Azul: Hb-MP-AuNPs. (c) Rojo: MUA-AuNPs; Azul: Hb-MUA-AuNPs. La titulación del pH se realizó a una relación molar Hb/AuNP de 200/1, en tampón fosfato 10 mM.

Es interesante tener en cuenta algunos aspectos relacionados con la conformación de la proteína Hb. Uno de los detalles más característicos es la posición de la banda Soret que, para met-Hb se observa a 405 nm. En esta especie, el Fe hémico se encuentra formando un complejo hexa-coordinado de alto espín, estando la sexta posición ocupada por una molécula de H₂O. Como se puede observar en la Figura 3, la banda Soret se mantiene a 405 nm desde medio ácido suave a básico, donde se observa un cambio a 411 nm con una inflexión a pH \approx 9. Este cambio se ha descrito que se produce por la disociación de la molécula de H₂O en el complejo para dar un grupo enlazado OH⁻

.⁵⁴

Se han monitorizado también los cambios en la banda Soret de Hb formando parte del bioconjugado y éstos se representan en la Figura 7 junto con los de la proteína libre. Solo en el caso del bioconjugado formado por MUA-AuNPs, la banda Soret se desplaza a partir de pH neutro describiendo una inflexión a 7.7, más de una unidad de pH más baja que en la proteína libre. Sin embargo, tras la disociación de la molécula de agua coordinada con el grupo hemo, la longitud de onda comienza a disminuir y alcanza el valor de 407 nm. En el caso de c-AuNP y MP-AuNP-Hb, el cambio en la banda de Soret tiene lugar a un valor de pH cercano al de la proteína libre, aunque el valor final es menor y coincide con el de los bioconjugados de Hb-MUA-AuNP. Aunque estos cambios solo están relacionados con la estructura de la región del hemo, podrían indicar que la

interacción de Hb con la superficie de las nanopartículas protege el entorno del hemo contra los cambios con el pH de la solución. El diferente comportamiento observado para los bioconjugados MUA-AuNP-Hb podría explicarse por una orientación diferente de la proteína, probablemente debido a las cargas negativas en la superficie de MUA-AuNPs en este intervalo de pH.

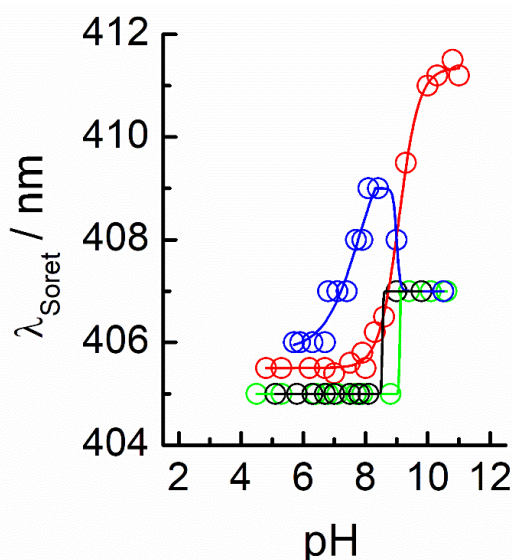


Figura 7. Cambios de la banda Soret con la longitud de onda de: Rojo: Hb libre; Negro: c-AuNP-Hb; Verde: MP-AuNP-Hb. Azul: MUA-AuNP-Hb.

3.3.2. Caracterización mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y medidas de potencial Z.

Una herramienta potente para la determinación del tamaño de las nanopartículas en disolución es la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). En el presente trabajo se ha utilizado esta metodología para poner de manifiesto la formación del bioconjugado y, asimismo, para detectar la existencia de cualquier fenómeno de agregación. Este estudio se ha realizado registrando el diámetro hidrodinámico (D_H) de las AuNPs tanto en ausencia como en presencia de la proteína, es decir, formando el bioconjugado. En la Figura 8 se recoge una medida del diámetro de cAuNPs y cAuNP-Hb. Se observa un único pico en cada caso, indicando que el sistema bajo estudio es monodisperso. Los valores de diámetro obtenidos son 33 nm y 95 nm para cAuNPs y cAuNP-Hb, respectivamente. Estos valores son mayores que los obtenidos mediante TEM, lo que

está de acuerdo con que los valores del diámetro hidrodinámico son siempre mayores que los obtenidos en las micrografías TEM.

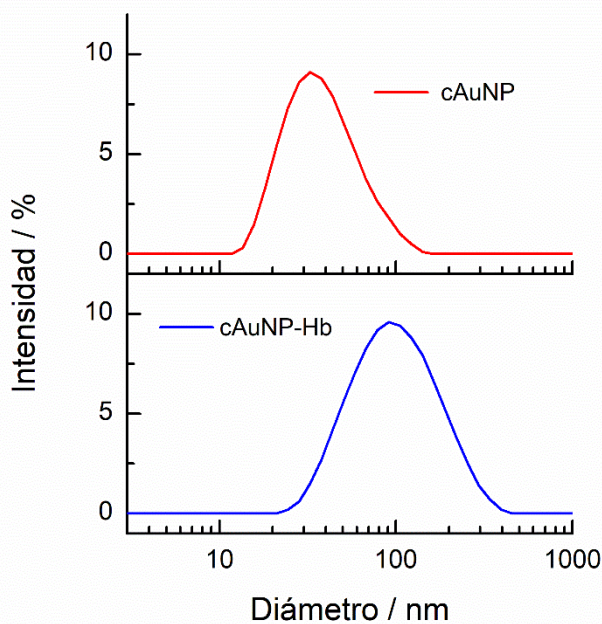


Figura 8. Distribución de diámetros hidrodinámicos de cAuNPs y cAuNP-Hb medidos en intensidad.

Se ha llevado a cabo esta determinación en función del pH. Como se observa en la Figura 9, el tamaño de las c-AuNPs se mantiene constante desde medio alcalino hasta débilmente ácido. Sin embargo, a $\text{pH} < 5$, se observa un aumento del tamaño que debe corresponder a la formación de agregados. Si se tienen en cuenta los valores de pK del ácido cítrico, la reducción de carga negativa que se produce al bajar el pH de la disolución, provocaría bien la disminución de las fuerzas de repulsión o la propia desorción de los aniones de la superficie de las cAuNPs.⁵⁵ Los bioconjugados siguen una tendencia similar, mostrando un valor de D_H mayor que para las c-AuNPs, lo que indica de nuevo la formación de la *corona* de proteínas alrededor de la misma. Sin embargo, en este caso, la agregación tiene lugar de forma súbita a pH 6. Esto está de acuerdo con los resultados UV-visible que muestran un desplazamiento de la banda LSPR a mayores longitudes de onda en ese intervalo de pH. Hay que destacar que la tendencia que se observa indica la formación de grandes agregados que, conforme disminuye el pH se hacen de menor tamaño. En la Figura 9 se aprecia una curva de caída que se hace estacionaria a $\text{pH} < 3$. Este efecto se observa también con las c-AuNPs aunque en menor

extensión y, de hecho, es un resultado aparente. Una pista importante de lo que puede estar ocurriendo se obtiene si se comparan los espectros UV-visible de los bioconjugados en este intervalo de pH. Como puede observarse en los espectros que se recogen en el insert de la Figura 9, la absorbancia de la banda LSPR a pH 3 es menor que la de las bandas que se registran a pHs 5 y 8. La explicación de este efecto podría ser que la técnica DLS mide los agregados más grandes que se forman en un primer momento pero conforme va pasando el tiempo del experimento de valoración estos agregados precipitan y solo permanecen en disolución los agregados de menor tamaño que tardarían más tiempo en precipitar. Por tanto, el espectro tomado a pH 3 así como el diámetro hidrodinámico medido en esas condiciones solo correspondería a los agregados de menor tamaño que aún permanecerían en disolución. De estos resultados cabe concluir que los bioconjugados se forman y son estables en disoluciones alcalinas y neutras pero que a pHs más bajos se agregan continuando en disolución solo aquellos con menores tamaños y menor tendencia a la precipitación.

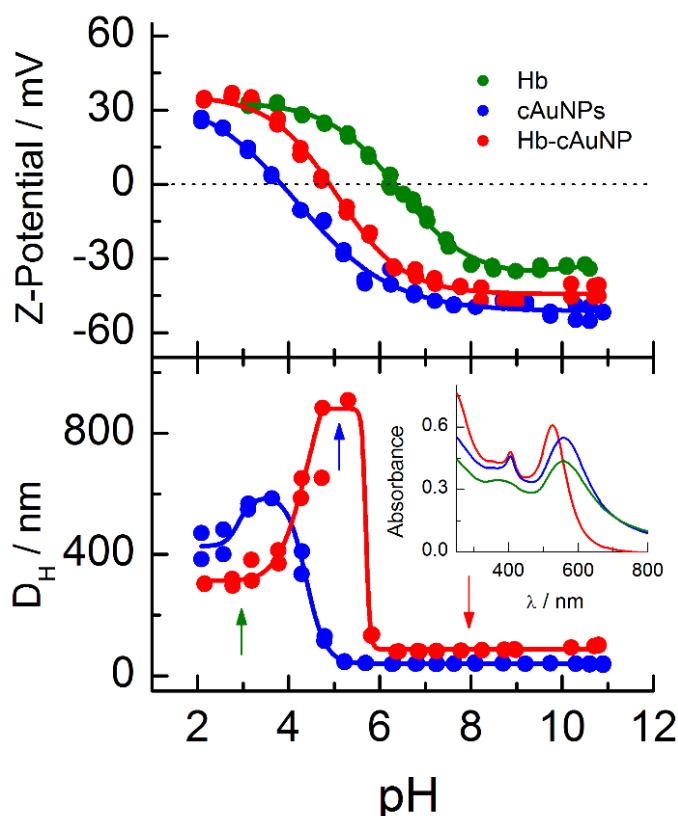


Figura 9. DLS (parte inferior) y potenciales zeta (parte superior) obtenidos en la valoración de cAuNPs, Hb y Hb-cAuNPs en función del pH. Insert: espectros UV-visible del bioconjugado a diferentes pH. Las flechas de colores en las curvas de valoración se han dibujado en el mismo color que los espectros para señalar los pH a los que se han registrado los espectros.

Se ha llevado a cabo en paralelo una valoración de potencial Z de estos sistemas. La valoración de la proteína libre, partiendo desde medio alcalino, da un valor de -34 mV que se mantiene prácticamente constante hasta alcanzar medio neutro en que empieza a subir lentamente hasta alcanzar valores positivos (+32 mV). Esta curva, con forma sigmoideal, define una inflexión que debe coincidir con el punto isoeléctrico (pI) de la proteína y que da un valor de 6.3, de acuerdo con los datos de la literatura. Por otra parte, la dispersión de c-AuNPs muestra un potencial Z de -50 mV en medio alcalino, de acuerdo con la presencia de aniones citrato protegiendo la superficie que, bajo estas condiciones de pH, se encuentran completamente disociados. Este valor de potencial Z negativo se mantiene hasta que se alcanzan los valores de pH en que los aniones citrato se protonan hasta alcanzar la neutralización. Se obtiene un valor de pI = 3.8. Finalmente, el bioconjugado cAuNP-Hb muestra un comportamiento intermedio entre el de la Hb libre y las cAuNPs, cambiando desde -44 mV en medio alcalino a +35 mV en medio ácido. El pI obtenido para el bioconjugado es 4.9, más de una unidad de pH más bajo que el de la proteína libre, lo que indica que las cargas positivas de la proteína están parcialmente neutralizadas u ocultas en la conformación que adoptan en la *corona* de proteínas.

Es interesante destacar el comportamiento paralelo que se observa en las medidas de DLS y potencial Z, produciéndose la formación de agregados de forma concomitante con la pérdida de carga superficial negativa.

3.3.3. Caracterización mediante espectroscopia Infrarroja (Attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR)).

La espectroscopia IR es una herramienta altamente sensible cuando se emplea para estudiar la estructura secundaria de proteínas, en particular, cuando se examinan las bandas características amida I y amida II. La banda amida I, que se obtiene en la región de 1600-1700 cm^{-1} , se atribuye a las vibraciones de tensión C=O de los enlaces peptídicos del esqueleto de la proteína, mientras que la amida II, observada a 1500-1600 cm^{-1} , corresponde a la combinación de las vibraciones de flexión NH y de tensión CN. La amida I es sensible a las estructuras secundarias del péptido tales como hélice- α , lámina- β y giro- β , ya que las correspondientes energías de las bandas dependen de la fuerza del enlace de hidrógeno que se forma entre las unidades amida que presentan una conformación diferente.⁵⁶⁻⁵⁸

Las moléculas de Hb nativa muestran bandas de IR a 1651 y 1545 cm^{-1} para las bandas amida I y amida II, respectivamente (Figura 10), con una relación de intensidad de las bandas amida I/II igual a 1.2. Ya que los modos de vibración de las amidas I y II son perpendiculares entre sí, la relación entre las intensidades de estas bandas proporciona una forma cualitativa de conocer los cambios en la conformación y orientación de la proteína.^{59,60} Tras la formación de los bioconjugados, la banda amida I no cambia apreciablemente, pero la amida II muestra un aumento en la intensidad que proporciona una relación de intensidad de 1.1, 1.05 y 1.05 para los bioconjugados formados por MUA-, c- y MP-AuNPs respectivamente. La similitud entre los bioconjugados y la proteína libre indican que la conformación de Hb no cambia cuando se une a las nanopartículas.

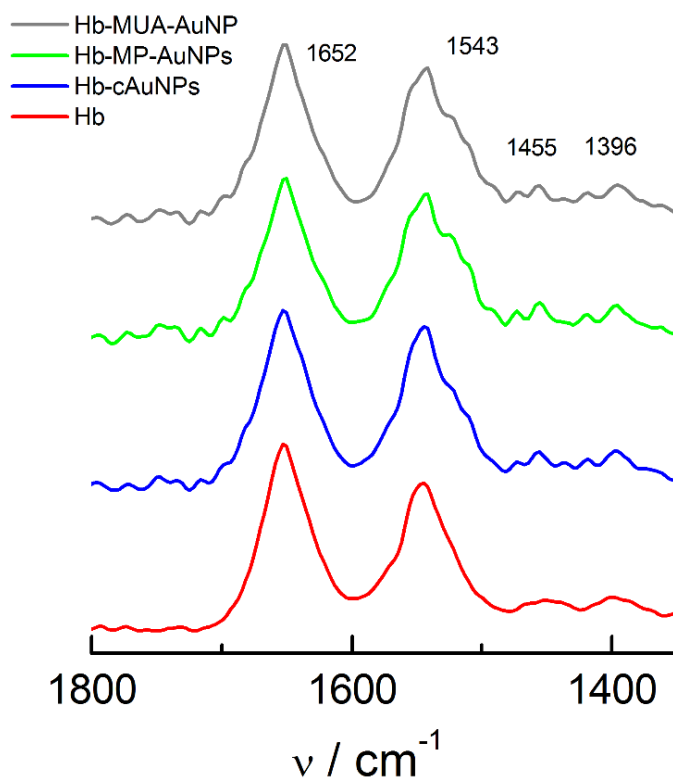


Figura 10. Espectros infrarrojos ATR de Hb y los bioconjugados en la región de las bandas amida I y II. (Hb) = 1.5 μM ; (AuNP) = 5 nM. En tampón fosfato 10 mM a pH 7.4.

Los bioconjugados Hb-AuNPs se han formado utilizando una relación molar de proteína/nanopartícula de 300/1. Como se explicará más abajo, esta relación representa la cantidad de moléculas de proteína que podrían formar parte de la *corona* de Hb. En estas condiciones, la señal obtenida correspondería a las proteínas que están en

contacto cercano con las AuNPs, evitando la interferencia de las que se encuentran libres en disolución. Los espectros se muestran en la Figura 10 y, como puede observarse, además de las bandas amida I y II se observan bandas a 1455 y 1396 cm^{-1} que se asocian con la flexión C–H y la combinación de las vibraciones de flexión C–N y C–H, respectivamente.

Se ha analizado la banda amida I utilizando un proceso de ajuste no lineal mediante el uso de curvas gaussianas (Figura 11). Los parámetros han sido elegidos por auto-deconvolución y análisis de la segunda derivada. En todos los casos estudiados, los parámetros elegidos concuerdan con los de la literatura. Se han elegido los siguientes parámetros para ajustar los espectros: 1651-1658 cm^{-1} , α -hélice, 1618-1642 cm^{-1} , lámina- β , 1666-1688 cm^{-1} , giros, 1618-1623 cm^{-1} (T), agregados intermoleculares (A_1), 1683-1689 cm^{-1} , agregados intramoleculares (A_2).⁵⁶ El aumento en el motivo A_1 puede facilitarse en un entorno de abundancia de proteínas. De hecho, ya que los enlaces de H pueden formarse entre los grupos C=O y NH de cualquier cadena polipeptídica con la que entren en contacto, la consecuencia es que, cuando las proteínas se sitúan para formar la *corona*, se forman muchos enlaces de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas vecinas, dando lugar a agregados estables que no tienen por qué provocar el desplegamiento de la cadena proteica.⁶¹

Para profundizar en los posibles cambios en la estructura de la proteína al formar los bioconjugados se ha llevado a cabo un estudio mediante deconvolución de los espectros obtenidos en condiciones de pH neutro (antes de sufrir el fenómeno de agregación) y ácido (después de agregarse). La Figura 11 muestra los espectros correspondientes a Hb libre y formando el bioconjugado realizados en tampón fosfato 10 mM a pH 7.4 y 4. Existen pequeñas diferencias en los parámetros obtenidos en el procedimiento de ajuste (Tabla 1). Hay que tener en cuenta que los bioconjugados son muy estables en disolución a pH 7.4 (ver Figura 5) y no se esperan grandes cambios en la estructura de la proteína. Sin embargo, si éstos se forman a pH 4, el sistema experimenta una agregación moderada, como también se observa en la Figura 5. Como se puede ver, la señal de amida I para los bioconjugados a pH 4 aumenta en intensidad aproximadamente 2.5 veces con respecto a la señal correspondiente a la proteína libre obtenida para una misma concentración. Este aumento se debe al efecto SEIRAS

producido probablemente, tanto por la interacción de la proteína con la nanopartícula en el bioconjugado, como por la presencia de los agregados que forman un sistema nanoestructurado cerca de la superficie del cristal de germanio utilizado en la técnica ATR. Este efecto, que está ausente a pH 7, debe ser la razón de la ausencia de efecto SEIRAS bajo estas condiciones.

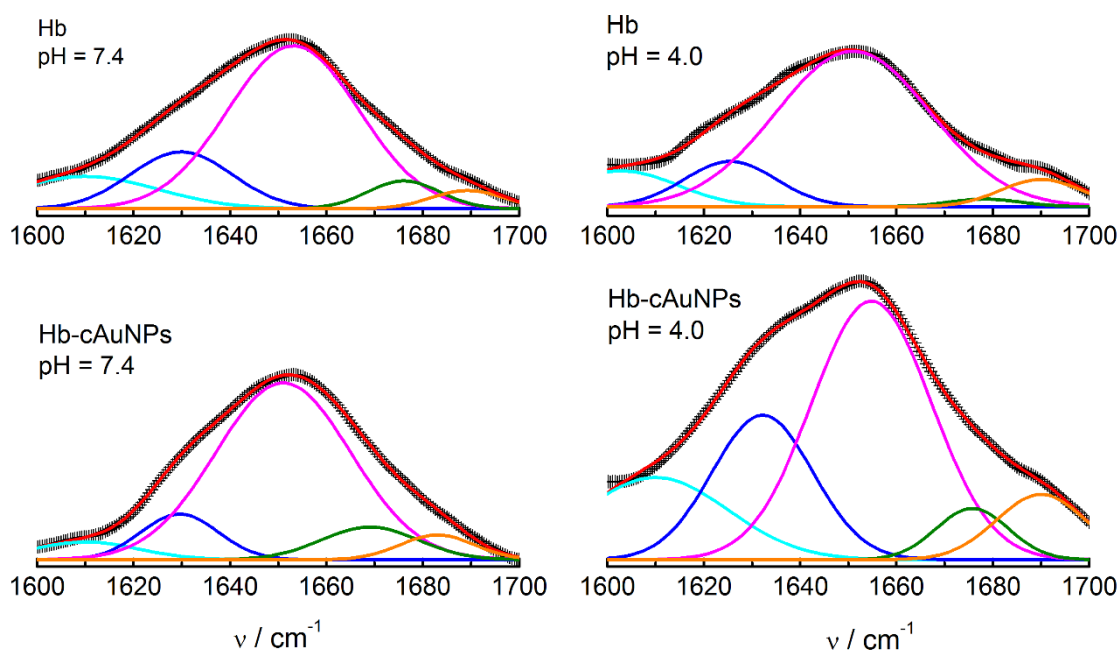


Figura 11. Espectros ATR-IR de Hb y Hb-cAuNPs a pH 7.4 y pH 4. (Hb) = 1.5 μ M; (cAuNP) = 5 nM. Se muestran los datos experimentales (+++), suma de contribuciones (—); A1 (—); β (—); α (—); T (—); A2 (—) (componentes nombradas como en Tabla 1).

Además del efecto SEIRAS, se puede observar un pequeño cambio en la forma de la banda amida I. De hecho, el análisis de deconvolución (Tabla 1) indica que las proteínas que forman los bioconjugados a pH 4 pierden algo de la estructura de la hélice- α , mientras que se observan pequeños aumentos en el contenido de la lámina- β junto con el componente A₁. Este último efecto puede ser el resultado de interacciones más fuertes entre proteínas, probablemente a través de enlaces de hidrógeno entre las cadenas expuestas de las moléculas de Hb individuales en el estado agregado. Es interesante destacar que el contenido de hélice- α no cambia significativamente, en contraste con la importante transformación de la hélice- α a lámina- β observada en el caso del bioconjugado Hb-AgNP reportada en bibliografía.⁶¹

Tabla 1. Parámetros obtenidos en la deconvolución de los espectros de IR de Hb y de los bioconjugados de Hb-cAuNPs a pH 7.4 y 4, que se muestran en la Figura 8.

Estructura	Posición λ				Fwhm				% Área			
	pH 7.4		pH 4		pH 7.4		pH 4		pH 7.4		pH 4	
	Hb	Hb-AuNP	Hb	Hb-cAuNP	Hb	Hb-cAuNP	Hb	Hb-cAuNP	Hb	Hb-cAuNP	Hb	Hb-cAuNP
A₁	1610	1610	1606	1610	30	22	23	30	8.3	5.5	11.4	17.7
β	1630	1629	1625	1630	21	16	19	21	10.4	10.3	11.9	21.8
α	1653	1651	1651	1655	27	28	32	25	66.8	70	68.8	46.2
T	1676	1659	1678	1675	15	20	15	15	10.7	9.1	1.6	5.6
A₂	1689	1683	1690	1690	15	15	17	18	3.8	5.1	6.3	8.7

3.3.4. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para comprobar si los estados de agregación intuidos a partir de las diferentes técnicas estructurales estudiadas hasta aquí se obtienen realmente, se ha llevado a cabo un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión. Las micrografías obtenidas para cAuNPs o cAuNP-Hb se muestran en la Figura 12. Puede observarse que mientras que las cAuNPs se agregan en alguna extensión al depositarse sobre la rejilla de cobre, los bioconjugados aparecen bien separados, probablemente debido a la presencia de la película de proteína que forma la *corona*.

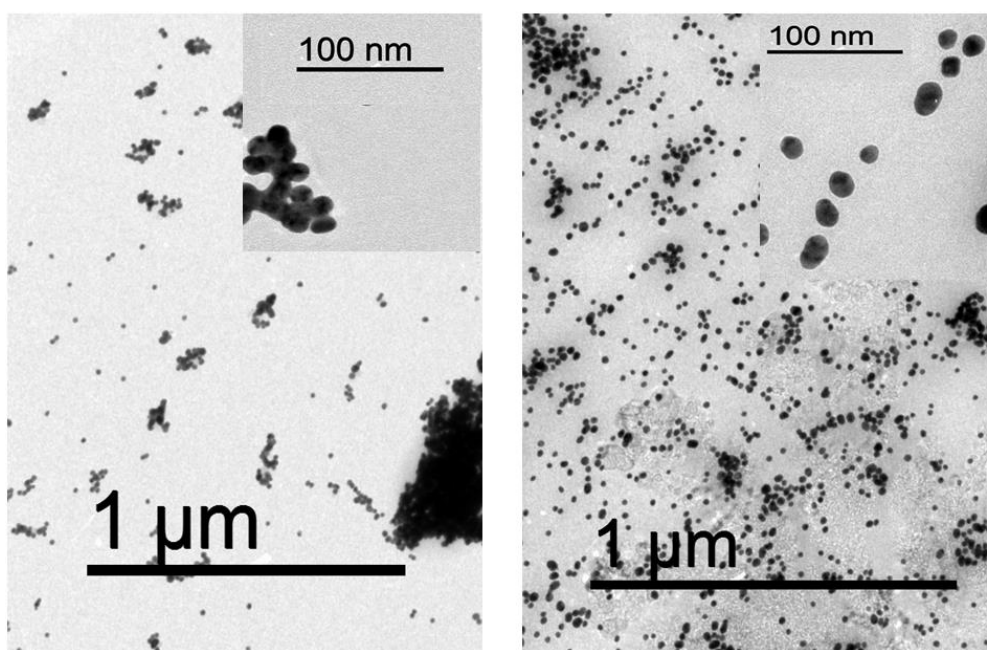


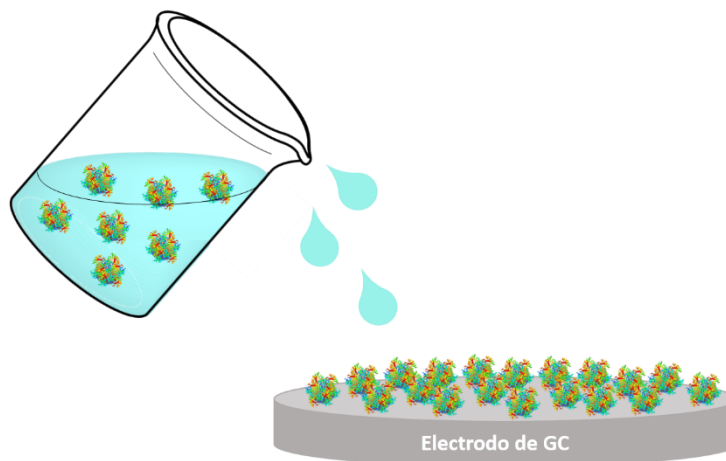
Figura 12. Micrografías TEM de cAuNPs (izquierda) y cAuNP-Hb (derecha) tomadas con dos resoluciones diferentes.

3.3.5. Caracterización mediante técnicas electroquímicas.

Ya que la proteína Hb posee un grupo prostético con propiedades redox, el grupo hemo, se ha realizado un estudio electroquímico de los bioconjugados para así poder examinar si las propiedades electroquímicas de la proteína se afectan por la interacción con las AuNPs.

El estudio electroquímico se ha llevado a cabo partiendo de los bioconjugados ya formados y estabilizados en disolución. Una vez transcurrido el tiempo necesario para

ello, se depositan unas gotas de la preparación sobre la superficie de un electrodo de carbón vítreo (GC) (Esquema 3) y se permite que se evapore el agua, quedando formada una película sobre la superficie del electrodo.



Esquema 3. Preparación del electrodo GC modificado con bioconjugados.

El electrodo preparado en estas condiciones se sumerge en la disolución en la que se pretende realizar la medida electroquímica. Esta determinación se realiza también con la proteína libre con el objeto de encontrar la influencia que ejerce el nanomaterial sobre la respuesta electroquímica de la misma. En contraste con lo que se observa con la proteína libre, que no produce señal electroquímica bajo las mismas condiciones experimentales, los bioconjugados muestran una respuesta reversible cuando se mide mediante voltamperometría cíclica (VC) (Figura 13). El bioconjugado cAuNP-Hb exhibe un par de picos bien definidos a -0.351 y -0.389 V vs. SCE que pueden atribuirse a la transferencia electrónica directa entre Hb y la superficie del electrodo GC subyacente, mediada por los cAuNPs. El potencial formal, E° , obtenido es de -0.37 V y está de acuerdo con estudios previos sobre la electroquímica directa de Hb mediante el uso de AuNPs mezcladas con MWCNTs,⁶² fibroína de seda,⁶³ electrodos de pasta de carbono,³⁷ y núcleos nanoestructurados de Fe_3O_4 ,⁶⁴ o polielectrolito catiónico,⁶⁵ compuesto de óxido de zinc/grafeno con estructura tipo flor,⁶⁶ película de celulosa compuesta con poli (etilenglicol-diglicidil-éter),⁶⁷ aerogel de carbono,⁶⁸ multicapas de quitosano y grafeno,⁶⁹ entre otros.

La alta solubilidad de los bioconjugados de Hb-AuNP provoca que, una vez que estén en contacto con la solución de electrolito, tiendan a solubilizarse y la respuesta electroquímica desaparezca en los ciclos sucesivos. Para evitar esto, una vez que se seca la cantidad depositada del bioconjugado, se aplica una película delgada de Nafion sobre el material adsorbido y seco en la superficie del electrodo. En estas condiciones, la señal electroquímica se mantiene después de horas de ciclo continuo (Figura 13).

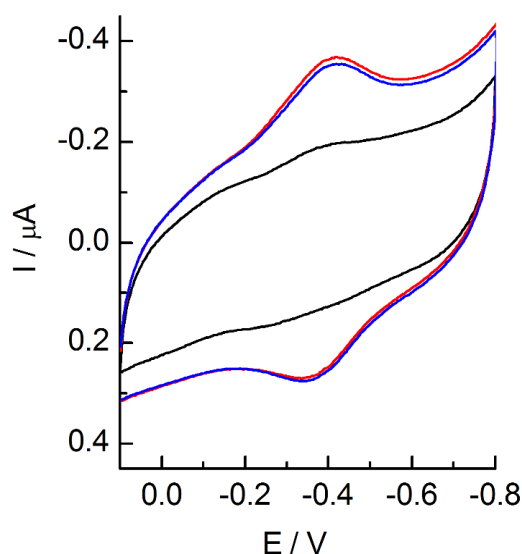


Figura 13. VCs de Hb (—) y cAuNP-Hb depositados en un electrodo GC en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4. La señal (—) se obtuvo inmediatamente después de la inmersión del electrodo en la disolución tampón y (—) después de 1 h de ciclado (protección con película de Nafion).

Es interesante notar que la separación de los potenciales de pico (ΔE_p) es de 38 mV (a 0.1 V/s), lo que indicaría que las AuNPs facilitan la transferencia electrónica del par redox Hb(Fe(III/II)). Para los tres bioconjugados formados a partir de c-, MUA- y MP-AuNPs, la separación entre los potenciales anódico y catódico está en torno a 30-40 mV, de nuevo como es típico para un proceso de transferencia electrónica rápida y casi reversible.

Se ha investigado la influencia de la velocidad de barrido en la respuesta electroquímica de los bioconjugados. Los resultados se muestran en la Figura 13 para cAuNP-Hb.

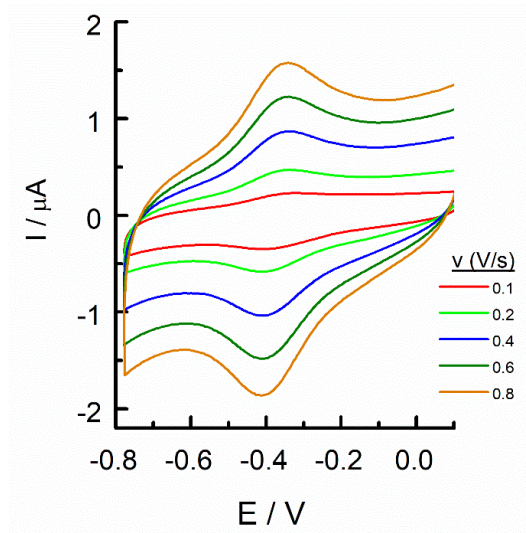


Figura 14. VCs de cAuNP-Hb depositados en un electrodo GC en función de la velocidad de barrido en tampón fosfato 50 mM a pH 7.4.

Puede observarse la presencia de un par de picos cuasi reversibles bien definidos en los VCs a todas las velocidades ensayadas. Las intensidades de los picos catódico y anódico, obtenidas una vez eliminada la corriente de carga, son prácticamente iguales y varían linealmente con la velocidad de barrido (Figura 15), como es de esperar para especies confinadas en el electrodo y que pueden analizarse siguiendo la ecuación 1.

$$i_p = \frac{n^2 \cdot F^2}{4RT} \cdot A \cdot \Gamma \cdot v \quad (1)$$

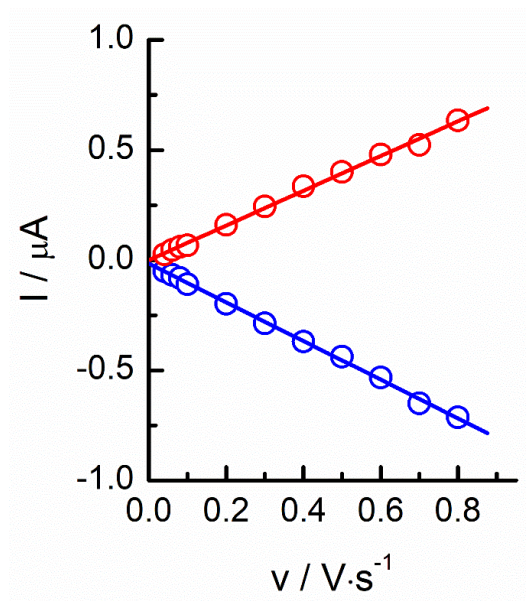


Figura 15. Representación de la corriente de los picos catódico y anódico de los VCs de la Figura 13, en función de la velocidad de barrido.

La representación logarítmica de estas magnitudes da un valor de pendiente cercana a la unidad (0.9 y 1.03), indicando que se trata de un proceso electroquímico con control superficial (ecuación 1), como es de esperar, ya que los bioconjugados quedan atrapados bajo la película de Nafion.

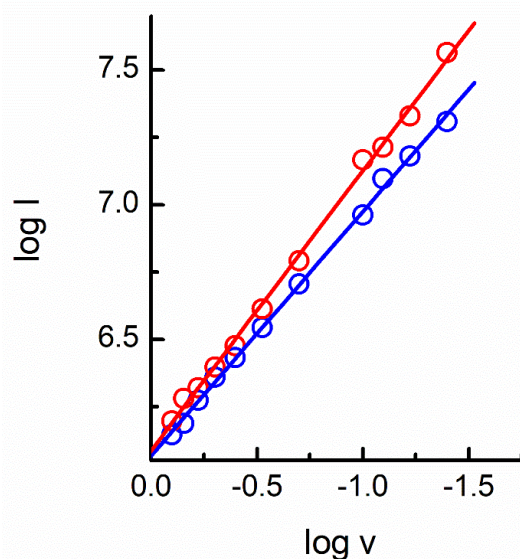


Figura 16. Representación logarítmica de la corriente de los picos catódico y anódico de los VCs de la Figura 13, en función de la velocidad de barrido.

En la Figura 17 se recogen los picos catódicos una vez que se ha sustraído la corriente de carga y, como puede observarse, presentan una alta simetría.

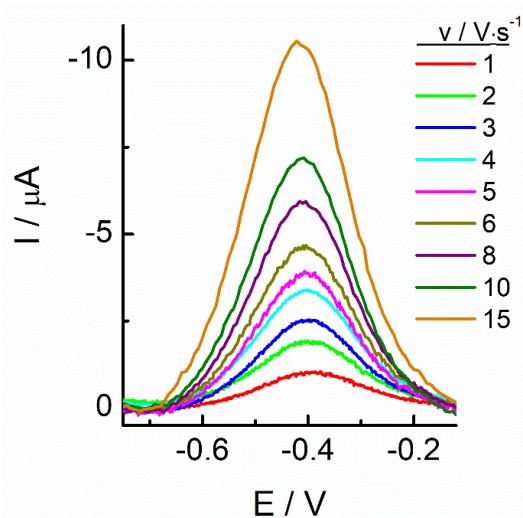


Figura 17. Señales voltamperométricas de la corriente catódica después de restar el fondo en los VCs de los bioconjugados cAuNS-Hb a diferentes velocidades de barrido.

A partir de estos datos se puede realizar un análisis del proceso electroquímico y con ello evaluar las características de los picos anódicos y catódicos. En estos sistemas, la carga involucrada en el proceso de transferencia electrónica se puede determinar a partir de la integración de los picos de los VCs. Los resultados de la determinación de la carga involucrada, Q , se muestran en la Figura 18, junto con los valores de la anchura a la mitad de la altura, W , en función de la velocidad de barrido. Este último parámetro tiene un valor oscilante entre 210 y 235 mV a bajas velocidades de barrido, pero a valores por encima de 10 V/s comienza a aumentar para mantenerse prácticamente constante a las más altas velocidades estudiadas.

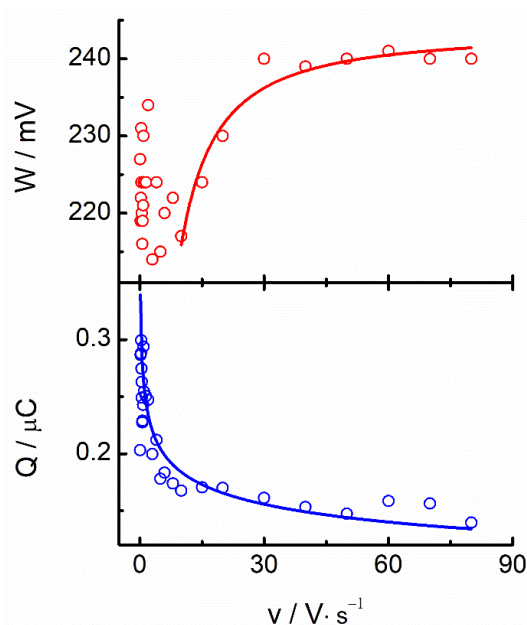


Figura 18. Representación de la anchura a la mitad de la altura (W) y la carga involucrada en el proceso catódico (Q) de las curvas voltamperométricas representadas en la Figura 16 para el bioconjugado cAuNR-Hb en función de la velocidad de barrido.

Estos valores de semianchura de pico son mucho mayores que los esperados para un proceso redox monoelectrónico en fase adsorbida que presente características reversibles e ideales. Estas condiciones vienen dadas por la ecuación 2:

$$\Delta E_p(1/2) = 3.53 \frac{RT}{nF} = \frac{90.6}{n} \text{ mV a } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2)$$

Por tanto, el alejamiento del comportamiento actual con respecto al de las condiciones ideales es importante. Hay que señalar que el comportamiento ideal es

raramente observado en sistemas complejos como el del presente trabajo. La separación de la idealidad se ha explicado como consecuencia de la existencia de interacciones laterales entre especies electroactivas o por la existencia de una distribución espacial de centros redox en multicapas⁷⁰ y por la presencia de sitios electroactivos no equivalentes.⁷¹ Se ha considerado también el efecto de doble capa que puede tener lugar en el caso de que la caída de potencial no tenga lugar dentro de la película de baja permitividad entre el electrodo y el plano redox. Por otra parte, se ha identificado una fuente de ensanchamiento de picos como consecuencia de una población heterogénea de proteínas adsorbidas debido a la falta de uniformidad en los microentornos de adsorción a través de la superficie, que puede dar lugar a una distribución de estados redox.⁷²⁻⁷⁴ hay que tener en cuenta que los modelos electrostáticos iniciales de la distribución de potencial interfacial asumen que los centros redox están todos localizados en el mismo plano, a una distancia dada desde la superficie del electrodo. Sin embargo, este no es siempre el caso. Así, cuando los centros redox se esparcen en una lámina tridimensional se obtienen voltamperogramas más anchos y asimétricos que reflejan una conversión redox *layer-by-layer*.⁷⁵

En el presente caso, la anchura de los picos sobrepasa con mucho el valor teórico esperado de 90.6 mV (Figura 18). La falta de idealidad en el sistema bajo estudio debe venir provocado por la presencia de diferentes microentornos en los nanomateriales que se encuentran rodeados de proteína Hb y que, a su vez, se encuentran empaquetados al depositarse sobre la superficie del electrodo. Además, la propia proteína Hb es un tetrámero que contiene 4 unidades (2 α y 2 β) y cada una de ellas incluye un grupo hemo que es la especie electroactiva. No puede olvidarse tampoco que la comunicación redox entre la proteína y el electrodo se hace a través de las nanopartículas metálicas.

Por otra parte, puede observarse (Figura 18) que la carga involucrada en el proceso catódico disminuye conforme aumenta la velocidad de barrido de forma drástica a bajas velocidades y que, por encima de 8 a 10 V/s, se hace constante. Este comportamiento se ha visto en otros sistemas y se ha explicado que se debe a la presencia de multicapas de proteínas adsorbidas en la superficie del electrodo y que, solo a bajas velocidades, pueden experimentar el proceso redox de manera eficiente. Sin embargo, cuando se

aumenta la velocidad de barrido, la densidad de carga disminuye hasta que se alcanza un valor constante, evidenciando que solo se produce el intercambio electrónico con la capa de proteína más próxima a la superficie del electrodo.⁷⁴

A partir de lo expuesto, se puede hacer un análisis de la situación, teniendo en cuenta la ecuación (3), que permite determinar el recubrimiento superficial (Γ), si se conocen la carga y el área (A) involucradas.^{76, 77}

$$Q = n \cdot F \cdot A \cdot \Gamma \quad (3)$$

Los recubrimientos superficiales obtenidos mediante aplicación de la ecuación (3) se recogen en la Tabla 2. Para determinar este recubrimiento, como valor de área, se ha utilizado la superficie total de las AuNPs contenidas en los bioconjugados. Aprovechando el hecho de que la señal electroquímica es producida por la proteína Hb añadida en forma de bioconjugado, puesto que no se obtiene respuesta en ausencia de AuNPs (ver Figura 13), se puede atribuir la señal electroquímica solo a las unidades de Hb que forman parte del bioconjugado. Como se puede conocer la cantidad de bioconjugado atrapado debajo de la película de Nafion y el tamaño de las AuNPs está bien definido, el área superficial de oro se determina fácilmente (0.0149 cm² en el presente experimento). En la Tabla 2 también se incluyen los recubrimientos aparentes y el número de moléculas de Hb por AuNP que dan la señal electroquímica obtenidos a baja (1) y alta (2) velocidad de barrido, para los tres bioconjugados estudiados en el presente trabajo, c-, MP- y MUA-AuNP-Hb.

En un cálculo aproximado, utilizando las dimensiones reportadas para la proteína Hb de 6.5 x 5.5 x 5.0 nm,⁷⁸ el área ocupada por una unidad de Hb tetramérica suponiendo una molécula con el eje largo paralelo a la superficie metálica es de 32-36 nm². Bajo estas condiciones, el recubrimiento superficial teórico de una monocapa es de 1.89 x 10⁻¹¹ mol/cm² (para monómeros de proteína) y, entonces, los valores experimentales corresponden a aproximadamente 9, 12 y 13 monocapas de proteína para c-, MP- y MUA-AuNPs respectivamente. Sin embargo, considerando la forma esférica de la nanopartícula y la influencia del aumento del radio en el número de moléculas que pueden acomodarse en las capas sucesivas, se puede determinar que la cantidad de Hb necesaria para formar las capas compactas alrededor de la AuNP es de 15, 65 y 150 para la primera, segunda y tercera capas de *corona* respectivamente. Por

tanto, los resultados obtenidos indican que las dos primeras capas de proteína están siempre involucradas en el intercambio electrónico y, solo una porción de la tercera capa lo estaría siendo esta dependiente de la naturaleza de la capa protectora que porta la nanopartícula utilizada para construir el bioconjugado. Como puede extraerse de los datos incluidos en la Tabla 2, a altas velocidades de barrido, la porción de moléculas de Hb que se encuentran en la tercera capa no es capaz de contribuir a la señal electroquímica.

Tabla 2. Recubrimientos superficiales (determinados como mol de electrones por cm^2), número de moléculas de Hb (como tetrámeros) por unidad de bioconjugado y constantes de velocidad de transferencia electrónica de los bioconjugados a baja (1) y alta (2) velocidad de barrido.

Bioconjugado	$\Gamma / \text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ (1)	$\Gamma / \text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ (2)	Hb/AuNP (1)	Hb/AuNP (2)	k_s / s^{-1}
c-AuNP-Hb	1.7×10^{-10}	0.8×10^{-10}	155	77	277
MP-AuNP-Hb	2.3×10^{-10}	1.1×10^{-10}	215	104	260
MUA-AuNP-Hb	2.4×10^{-10}	1.0×10^{-10}	228	93	234

La escala de tiempo que se requiere para cambiar el estado de oxidación de una especie redox confinada en la superficie involucra dos mecanismos complementarios. Por una parte, el mecanismo de transferencia de carga involucra la transferencia electrónica directa entre el electrodo y el sitio redox localizado a una distancia a la que, probablemente, debe actuar el efecto túnel. Por otra parte, la propagación de la reacción redox dentro de la película y más allá de la distancia túnel desde el electrodo requiere el intercambio de electrones entre sitios vecinos. Este proceso, conocido como transporte de carga, es de naturaleza difusiva y está asistido por los movimientos segmentales de la película polimérica y facilita que los sitios redox vecinos se acerquen lo suficiente como para que se produzca un evento de “*electron hopping*”.⁷⁹ Las velocidades de transporte y transferencia de carga y su dependencia con las variables experimentales se han estudiado y se ha encontrado que los resultados obtenidos en

películas organizadas aleatoriamente no pueden extrapolarse al caso de multicapas ordenadas que exhiben la capacidad de controlar la naturaleza y la carga de las capas.

El modelo de Laviron ^{70, 80} trata centros redox localizados en planos bien definidos, mientras que los casos reales tienen una distribución más homogénea. Un modelo más reciente ⁷⁹ permite que el potencial varíe con la distancia del centro redox a la superficie del electrodo. La diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción (ΔE^0) a bajas velocidades de barrido aumenta al disminuir el coeficiente de difusión aparente D_{ap} . Este efecto se asocia con las limitaciones en el transporte de carga. En este caso, ΔE^0 alcanza un valor constante a unos 58 mV, muy cerca del valor esperado para un sistema controlado por difusión. El modelo de Laviron que considera sitios redox localizados en planos paralelos al electrodo, predice una disminución de este valor al aumentar v . Esto ocurre cuando la difusión puede penetrar solo el primer plano y, por tanto, se restaura el comportamiento de capa delgada. Cuando la transferencia de carga es más lenta que el transporte de carga, el primer proceso enmascara la separación de picos y no permite observar el fenómeno difusivo.

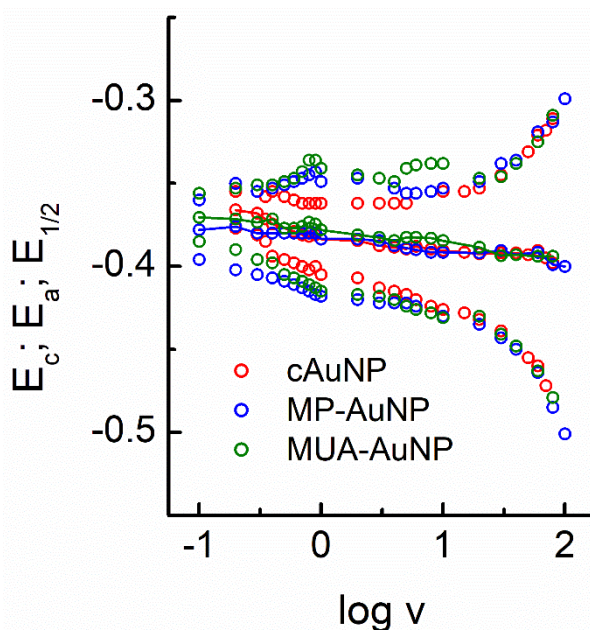


Figura 19. Variación de los potenciales de pico catódico y anódico y del potencial de onda media de los bioconjugados en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

Como se observa en la Figura 19 los potenciales de pico para los tres bioconjugados varían en forma muy similar. En todos los casos se observa una pequeña separación de

los picos a baja velocidad de barrido que aumenta levemente conforme aumenta la velocidad hasta que, a muy altos valores de velocidad, el cambio se hace más importante. En la Figura 19 se muestra también la tendencia del potencial de onda media que es similar para los tres bioconjugados y tiende a un desplazamiento hacia valores más negativos.

Esta variación de los potenciales de pico (E_p) con v significa que el comportamiento no es ideal. Se puede explicar asumiendo una distribución de entornos químicos (y de esta forma, una distribución de valores E) en la dirección normal al electrodo. Esta suposición está basada en el hecho de que, en el límite de baja velocidad de barrido, la técnica de voltamperometría sondea los sitios redox y, por tanto, da un potencial de pico que es el promedio de todos los valores de la película. En el límite de alta velocidad, solo se sondean los sitios adyacentes al electrodo y como consecuencia solo contribuyen los valores de esos sitios al potencial promedio.

El método general de Laviron⁷⁷ para determinar la constante de transferencia de carga, k , de especies adsorbidas en un electrodo está basado en la aproximación de Butler-Volmer y usa los potenciales obtenidos en función de la velocidad de barrido. Este método se basa en la determinación del coeficiente de transferencia, α , que es una medida de la simetría de la barrera de energía para la reacción redox. En el caso ideal, $\alpha = 0.5$, para todos los sobrepotenciales, aunque también hay casos en que se desvía de este valor. Por tanto, la determinación de α es crucial para poder determinar k . Así, a partir de la representación de E_p vs. $\log v$, se obtienen dos ramas que parecen guardar cierta simetría con respecto a los valores de los potenciales promedio (Figura 19). Para llevar a cabo las determinaciones, se realiza la sustracción de estos potenciales promedio a los potenciales para cada pico. Los resultados se recogen en la Figura 20.

Como puede observarse, incluso a las más bajas velocidades de barrido estudiadas, se observa una cierta separación entre los picos anódico y catódico, que empieza a hacerse mayor al aumentar la velocidad. Este comportamiento estaría de acuerdo con el fenómeno de transporte de carga antes mencionado y que se ajustaría al modelo derivado por Calvo y col.⁷⁹ Bajo estas condiciones, se puede determinar tanto el valor de α como de k , a partir del método de Laviron.^{70, 80}

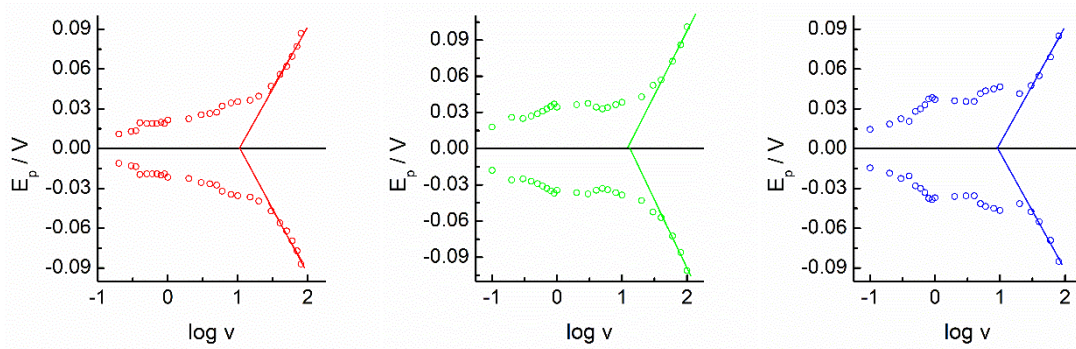


Figura 20. Variación de los potenciales de pico (después de sustraer el potencial de onda media) en función del logaritmo de la velocidad de barrido para los bioconjugados (○) C-, (○) MP- y MUA-AuNP-HB (○).

A altas velocidades, se observa que los valores de E_p varían linealmente con $\log v$ y, como estas ramas alcanzan valores de $\Delta E > 200/n$ mV, se pueden usar las ecuaciones apropiadas⁸¹ para determinar los parámetros α y k . Así, teniendo en cuenta la ecuación 4, que relaciona los cambios en E_p con $\log v$, puede verse que la pendiente de esta representación permite determinar α .

$$E_p = E^{o'} + \frac{2.303RT}{\alpha nF} \left(\frac{\log \alpha nF}{RT - \log k_s} \right) + \frac{2.303RT}{\alpha nF \log v} \quad (4)$$

En el presente caso, se obtienen valores de α de 0.65, 0.54 y 0.67 para c-, MP- MUA-AuNP-Hb, respectivamente. Los valores están próximos al valor teórico para el caso de picos voltamperométricos simétricos que es de 0.5. Para determinar k , se utiliza la ecuación 5:

$$\log k = \alpha \cdot \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \cdot \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{\alpha \cdot (1 - \alpha) nF \eta}{2.3RT} \quad (5)$$

No obstante, un método más simple de determinar la constante de velocidad k , se puede conseguir aplicando la condición límite de sobrepotencial $E_p - E_{1/2} = \eta = 0$, que reduce la ecuación 5 a la ecuación 6:

$$k = \frac{\alpha \cdot n \cdot F \cdot v}{RT} \quad (6)$$

De esta manera, determinando los valores de corte con el eje X para las ramas anódica y catódica (Figura 20), se obtiene el valor de velocidad que puede usarse en la ecuación (6).

A partir de este análisis se obtienen valores de k de 277, 260 y 234 s^{-1} para los bioconjugados c-, MP- MUA-AuNP-Hb, respectivamente. Estos valores son mucho mayores que los encontrados para esta misma proteína formando parte de diferentes materiales compósitos, tanto nanométricos como poliméricos o con nanotubos o aerogeles de carbono,⁶⁸ materiales nanoestructurados de Fe_3O_4 ,⁶⁴ nanocilindros de oro modificados con sílice⁸² y electrodos de oro modificados con AuNPs.⁸³ No obstante, en ninguno de estos casos se muestra un análisis claro de los datos empleados en el cálculo y, por tanto, no sirven de comparación adecuada.^{65, 84-88}

Se ha explorado también el efecto del pH de la disolución en el comportamiento electroquímico de los bioconjugados de Hb-AuNP. La Figura 21 muestra los voltamperogramas cíclicos de cAuNP-Hb a diferentes pH. La forma de los picos redox se mantiene a todos los valores de pH estudiados y la corriente aumenta suavemente con esta variable. Los potenciales de pico anódico y catódico evolucionan hacia valores negativos y, por tanto, el potencial formal, E^0 , (Figura 20b), revelando que el proceso redox de Hb(Fe(III)/(II)) involucra transferencia de protones.

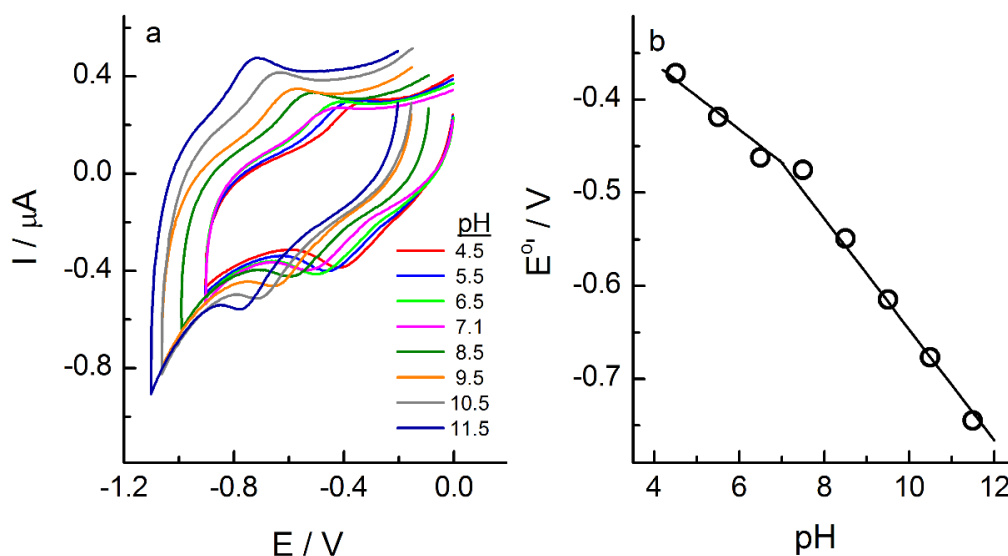
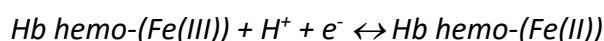


Figura 21. (a) Voltamperogramas cíclicos de Hb-cAuNPs depositados en un electrodo de carbono vítreo en tampón de fosfato 50 mM en función del pH. (b) Variación del potencial formal E^0' en función del pH.

La tendencia observada puede ajustarse a dos líneas diferentes que muestran un punto de corte en torno a pH 7. A pH > 7, el valor de la pendiente es de 59 mV/pH, valor teórico de la ecuación de Nernst para una reacción de transferencia monoelectrónica acoplada con un protón.⁸⁹ A pH < 7, la pendiente disminuye hasta un valor de 35 mV/pH. Esta disminución de la pendiente obtenida en medio ácido puede atribuirse a una mayor complejidad del proceso que debe verse influida por la protonación de aminoácidos y/o moléculas de agua que se encuentran próximos al entorno del grupo hemo.³⁶ Puede establecerse que la reacción involucrada en todo el intervalo de pH puede ser:

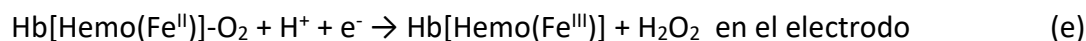
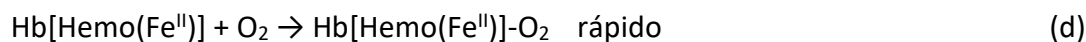
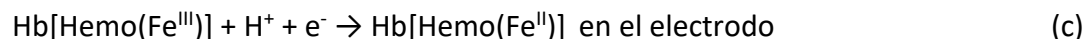
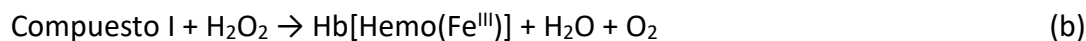
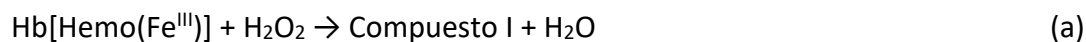


La naturaleza de los aminoácidos que participan en el proceso electroquímico es desconocida, pero no se puede descartar el papel de un residuo de histidina situado en el entorno cercano al hemo, ya que su estado de protonación está estrechamente relacionado con la interacción del ion hierro con el anillo de porfirina en los diferentes estados de oxidación y, por tanto, tiene una constante de disociación aparente que depende de la naturaleza de estas interacciones.

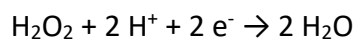
3.3.6. Bioelectrocatalisis.

Existen muchos trabajos que tratan estudios de proteínas y enzimas que contienen el grupo hemo, como las peroxidasas, citocromo c, Hb y mioglobina, que demuestran la capacidad de estas proteínas para reducir el H₂O₂ y el O₂ de forma electrocatalítica.⁹⁰⁻⁹⁴

En este sentido, se ha investigado la posibilidad de que los bioconjugados AuNP-Hb muestren actividad catalítica hacia la reducción de H₂O₂. En la Figura 22 se muestran los voltamperogramas de los bioconjugados c-AuNP-Hb depositados en un electrodo de carbón vítreo obtenidos en disoluciones con cantidades crecientes de H₂O₂ en tampón fosfato a pH 7.4. Se observa que la corriente de pico de reducción aumenta gradualmente, mientras que la de oxidación disminuye hasta que finalmente desaparece. Este comportamiento es típico de sistemas electrocatalíticos en los que, el estado reducido de Hb que se genera, se oxida inmediatamente con el H₂O₂ presente,⁹⁵ como se muestra en el esquema de reacción:



La reacción global es:



Obteniéndose como producto final H_2O .

Las reacciones (a), (b) y (d) se pueden llevar a cabo en disolución, pero las reacciones (c) y (e) solo pueden tener lugar en un electrodo enzimático.

Puede observarse que la corriente catódica varía linealmente con la concentración de H_2O_2 en el intervalo de concentraciones de $5 \mu\text{M}$ a $400 \mu\text{M}$. Los valores de sensibilidad de los electrodos modificados con los bioconjugados se recogen en la Tabla 3.

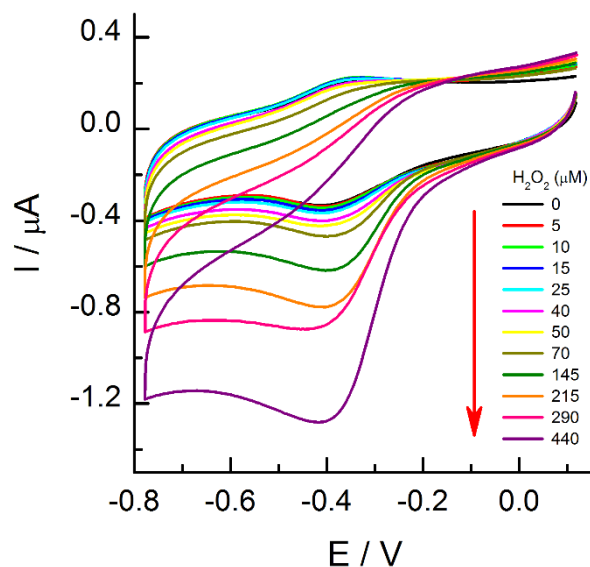


Figura 22. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de H_2O_2 a una disolución tampón de fosfato 50 mM a $\text{pH } 7.4$ con un electrodo de carbono vítreo en el que se ha depositado el bioconjugado $c\text{-AuNP-Hb}$.

Al aumentar la concentración de H_2O_2 se obtiene un valor límite de corriente de reducción, fenómeno característico de un comportamiento tipo Michaelis-Menten. A

partir de estos datos, se puede determinar la constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk:⁹⁵

$$\frac{1}{I_{SS}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M^{app}}{I_{max}} \cdot \frac{1}{c} \quad (7)$$

donde I_{SS} es la corriente obtenida a diferentes concentraciones de sustrato, c es la concentración de sustrato e I_{max} es la corriente máxima medida en condiciones de saturación del sustrato. La K_M^{app} se puede obtener mediante el análisis de la pendiente y la intersección de la representación de las recíprocas de la corriente frente a la concentración de H_2O_2 . Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros electrocatalíticos determinados para H_2O_2 con los bioconjugados depositados en un electrodo GC.

Bioconjugado	$I_{max} / \mu A$	K_M / mM	$S / \mu A \cdot mM^{-1}$
Hb-cAuNP	2.0	1.2	2.1
Hb-MP-AuNP	3.0	1.4	2.1
Hb-MUA-AuNP	4.1	1.9	1.8

Estos valores son algo más altos que los obtenidos con otros sistemas como multicapa de Hb/quitosano/grafeno (0.66 mM),⁶⁹ pero más bajos que los de Hb/Au/SBA15/GC (2.87 mM).⁹⁶ Un pequeño valor de K_M^{app} implica buena afinidad entre la Hb inmovilizada y el H_2O_2 , lo que favorece la reacción electroquímica.

Por otro lado, es bien conocido que la proteína Hb posee la capacidad de transportar oxígeno sólo cuando se encuentra en estado ferroso y, por tanto, una O_2 dando lugar a la especie oxi-Hb(Fe(II) O_2), mientras que pierde esta propiedad cuando se encuentra en la forma férrica met-Hb(Fe(III)). Teniendo en cuenta estas cuestiones, se ha examinado el comportamiento electroquímico de los bioconjugados de Hb en presencia de O_2 .

La reducción de O_2 sobre un electrodo desnudo tiene lugar a -0.615 V (empleando tampón fosfato a pH 7). Sin embargo, cuando se realiza el voltamperograma utilizando el electrodo modificado con el bioconjugado, se obtiene una señal a -0.415 V, un

potencial 200 mV más positivo que para el electrodo desnudo. Este cambio en el potencial de reducción es indicativo de la electrocatalisis de O₂ debido a la presencia de los bioconjugados, Figura 23.

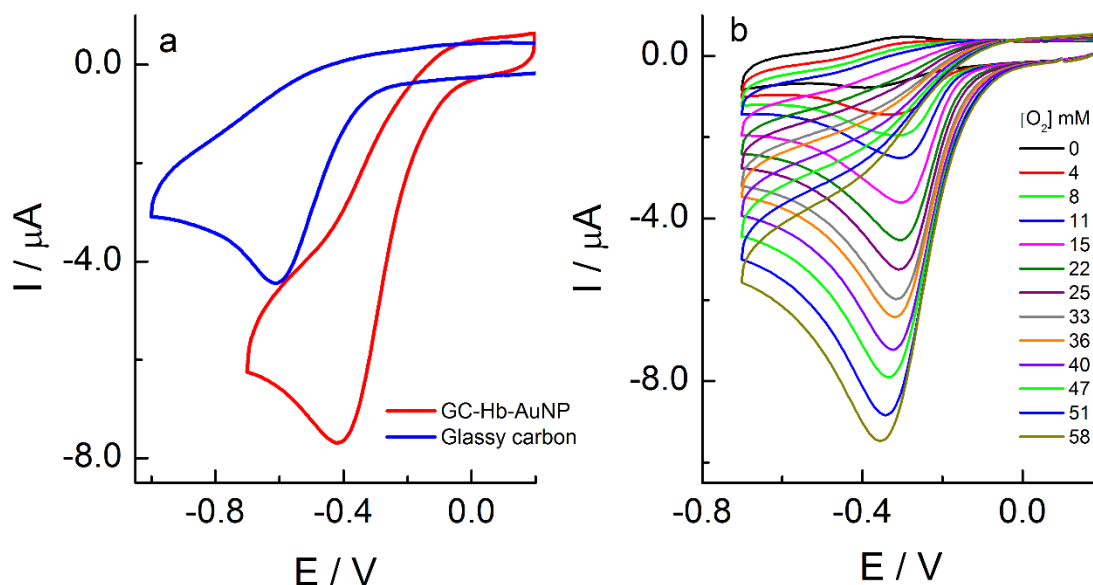
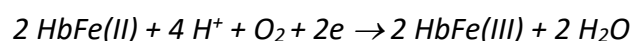


Figura 23. (a) Voltamperograma cíclico para la reducción de O₂ (la concentración de O₂ es la que existe en equilibrio). (b) Efecto de la adición de concentraciones crecientes de O₂ a una solución tampón de fosfato 50 mM a pH 7.4 con c-AuNPs-Hb depositados en un electrodo de carbono vítreo (se eliminó todo el O₂ presente en la disolución mediante burbujeo de N₂). La concentración de O₂ se ha calculado considerando el volumen de aire agregado y una composición de O₂ del 21%.

En la Figura 23b, se muestra el efecto en los voltamperogramas en función de las concentraciones crecientes de O₂. Después de la eliminación del O₂ presente en la disolución, la concentración se incrementó introduciendo aire con una jeringa. Como se puede observar, la intensidad de corriente de pico de reducción aumenta linealmente con la concentración de O₂ presente en la disolución, al mismo tiempo que desaparece el pico de oxidación de Hb. El O₂ se reduce en la superficie del bioconjugado según las reacciones:^{64, 97}



El comportamiento electrocatalítico de los bioconjugados en la reducción de H₂O₂ y O₂, puede tomarse como una prueba de que la Hb mantiene su estabilidad

conformacional después de interactuar con las AuNPs. Por otro lado, también se demuestra la actividad electrocatalítica de este sistema.

3.4. Bibliografía

1. Cai, K.; Wang, A. Z.; Yin, L.; Cheng, J., Bio-nano interface: The impact of biological environment on nanomaterials and their delivery properties. *J. Control. Release* **2017**, *263*, 211-222.
2. Nel, A. E.; Maedler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (7), 543-557.
3. Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A., What the Cell "Sees" in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5761-5768.
4. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (7), 2050-2055.
5. Cedervall, T.; Lynch, I.; Foy, M.; Berggad, T.; Donnelly, S. C.; Cagney, G.; Linse, S.; Dawson, K. A., Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2007**, *46* (30), 5754-5756.
6. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K. A., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (38), 14265-14270.
7. Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Dawson, K. A., Nanobiotechnology. Nanoparticle coronas take shape. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6* (1), 11-12.
8. Yang, S. T.; Liu, Y.; Wang, Y. W.; Cao, A. N., Biosafety and Bioapplication of Nanomaterials by Designing ProteinNanoparticle Interactions. *Small* **2013**, *9* (9-10), 1635-1653.
9. Docter, D.; Westmeier, D.; Markiewicz, M.; Stolte, S.; Knauer, S. K.; Stauber, R. H., The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6094-6121.
10. Kelly, P. M.; Aberg, C.; Polo, E.; O'Connell, A.; Cookman, J.; Fallon, J.; Krpetic, Z.; Dawson, K. A., Mapping protein binding sites on the biomolecular corona of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10* (5), 472-479.
11. Moyano, D. F.; Rotello, V. M., Nano Meets Biology: Structure and Function at the Nanoparticle Interface. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10376-10385.
12. Saptarshi, S. R.; Duschl, A.; Lopata, A. L., Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnol.* **2013**, *11*.
13. Caracciolo, G.; Farokhzad, O. C.; Mahmoudi, M., Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 257-264.

14. Walkey, C. D.; Olsen, J. B.; Song, F.; Liu, R.; Guo, H.; Olsen, D. W. H.; Cohen, Y.; Emili, A.; Chan, W. C. W., Protein Corona Fingerprinting Predicts the Cellular Interaction of Gold and Silver Nanoparticles. *Acs Nano* **2014**, *8* (3), 2439-2455.
15. Hamad-Schifferli, K., How can we exploit the protein corona? *Nanomedicine* **2013**, *8* (1), 1-3.
16. Hamad-Schifferli, K., Exploiting the novel properties of protein coronas: emerging applications in nanomedicine. *Nanomedicine* **2015**, *10* (10), 1663-1674.
17. Casals, E.; Puntès, V. F., Inorganic nanoparticle biomolecular corona: formation, evolution and biological impact. *Nanomedicine* **2012**, *7* (12), 1917-1930.
18. Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S., Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5610-5637.
19. Monopoli, M. P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A., Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779-786.
20. Goswami, N.; Zheng, K.; Xie, J., Bio-NCs - the marriage of ultrasmall metal nanoclusters with biomolecules. *Nanoscale* **2014**, *6* (22), 13328-13347.
21. Zhao, Y. N.; Sun, X. X.; Zhang, G. N.; Trewyn, B. G.; Slowing, I.; Lin, V. S. Y., Interaction of Mesoporous Silica Nanoparticles with Human Red Blood Cell Membranes: Size and Surface Effects. *Acs Nano* **2011**, *5* (2), 1366-1375.
22. Drescher, D.; Buechner, T.; McNaughton, D.; Kneipp, J., SERS reveals the specific interaction of silver and gold nanoparticles with hemoglobin and red blood cell components. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (15), 5364-5373.
23. Tom, R. T.; Samal, A. K.; Sreeprasad, T. S.; Pradeep, T., Hemoprotein bioconjugates of gold and silver nanoparticles and gold nanorods: Structure-function correlations. *Langmuir* **2007**, *23* (3), 1320-1325.
24. Sahoo, D.; Bhattacharya, P.; Patra, H. K.; Mandal, P.; Chakravorti, S., Gold nanoparticle induced conformational changes in heme protein. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13* (12), 6755-6760.
25. Shao, Q.; Wu, P.; Gu, P. A.; Xu, X. Q.; Zhang, H.; Cai, C. X., Electrochemical and Spectroscopic Studies on the Conformational Structure of Hemoglobin Assembled on Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (26), 8627-8637.
26. Garabagiu, S., A spectroscopic study on the interaction between gold nanoparticles and hemoglobin. *Mater. Res. Bull.* **2011**, *46* (12), 2474-2477.
27. Yang, W.; Sun, L.; Weng, J.; Chen, L.; Zhang, Q., Probing the interaction of bovine haemoglobin with gold nanoparticles. *IET Nanobiotechnol* **2012**, *6* (1), 26-32.
28. Garabagiu, S., Gold nanorods-hemoglobin bio-conjugate: Spectroscopy studies. *J. Molec. Struct.* **2013**, *1031*, 216-220.
29. Vatsyayan, P., Recent Advances in the Study of Electrochemistry of Redox Proteins. In *Trends in Bioelectroanalysis*, Matysik, F.-M., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 223-262.

30. Armstrong, F. A.; Wilson, G. S., Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochim. Acta* **2000**, *45* (15-16), 2623-2645.
31. Armstrong, F. A., Recent developments in dynamic electrochemical studies of adsorbed enzymes and their active sites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (2), 110-117.
32. Guo, L. H.; Hill, H. A. O., Direct Electrochemistry of Proteins and Enzymes. *Adv. Inorg. Chem.* **1991**, *36*, 341-375.
33. Hill, H. A. O.; Hunt, N. I., Direct and Indirect Electrochemical Investigations of Metalloenzymes. *Metallobiochemistry, Pt D* **1993**, *227*, 501-522.
34. Yang, J.; Hu, N. F., Direct electron transfer for hemoglobin in biomembrane-like dimyristoyl phosphatidylcholine films on pyrolytic graphite electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1999**, *48* (1), 117-127.
35. Huang, H.; Hu, N. F.; Zeng, Y. H.; Zhou, G., Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films. *Anal. Biochem.* **2002**, *308* (1), 141-151.
36. Lu, Q.; Hu, C.; Cui, R.; Hu, S., Direct Electron Transfer of Hemoglobin Founded on Electron Tunneling of CTAB Monolayer. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (33), 9808-9813.
37. Xua, Y. X.; Hu, C. G.; Hu, S. S., A reagentless nitric oxide biosensor based on the direct electrochemistry of hemoglobin adsorbed on the gold colloids modified carbon paste electrode. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2010**, *148* (1), 253-258.
38. Zhou, Y. L.; Li, Z.; Hu, N. F.; Zeng, Y. H.; Rusling, J. F., Layer-by-layer assembly of ultrathin films of hemoglobin and clay nanoparticles with electrochemical and catalytic activity. *Langmuir* **2002**, *18* (22), 8573-8579.
39. Ariga, K.; Ji, Q. M.; Mori, T.; Naito, M.; Yamauchi, Y.; Abe, H.; Hill, J. P., Enzyme nanoarchitectonics: organization and device application. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6322-6345.
40. Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A., The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740-2779.
41. Viudez, A. J.; Madueno, R.; Pineda, T.; Blazquez, M., Stabilization of gold nanoparticles by 6-mercaptopurine monolayers. Effects of the solvent properties. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (36), 17840-17847.
42. Viudez, A. J.; Madueno, R.; Blazquez, M.; Pineda, T., Synthesis, Characterization, and Double Layer Capacitance Charging of Nanoclusters Protected by 6-Mercaptopurine. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (13), 5186-5192.
43. Reyes, E.; Madueño, R.; Blazquez, M.; Pineda, T., Facile Exchange of Ligands on the 6-Mercaptopurine-Monolayer Protected Gold Clusters Surface. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (38), 15955-15962.
44. del Caño, R.; Mateus, L.; Sanchez-Obrero, G.; Sevilla, J. M.; Madueño, R.; Blazquez, M.; Pineda, T., Hemoglobin bioconjugates with surface-protected gold nanoparticles in aqueous media: The stability depends on solution pH and protein properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *505*, 1165-1171.

45. Brauer, G., *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry*. Academic Press: New York, 1965; p 1057.
46. Keating, C. D.; Musick, M. D.; Keefe, M. H.; Natan, M. J., Kinetics and thermodynamics of Au colloid monolayer self-assembly - Undergraduate experiments in surface and nanomaterials chemistry. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76* (7), 949-955.
47. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, (11), 55-75.
48. Frens, G., Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature-Physical Science* **1973**, *241* (105), 20-22.
49. Shipway, A. N.; Katz, E.; Willner, I., Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *Chemphyschem* **2000**, *1* (1), 18-52.
50. Templeton, A. C.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Mulvaney, P., Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (3), 564-570.
51. Kristinsson, H. G., Acid-induced unfolding of flounder hemoglobin: Evidence for a molten globular state with enhanced pro-oxidative activity. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50* (26), 7669-7676.
52. Canaveras, F.; Madueño, R.; Sevilla, J. M.; Blázquez, M.; Pineda, T., Role of the Functionalization of the Gold Nanoparticle Surface on the Formation of Bioconjugates with Human Serum Albumin. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (18), 10430-10437.
53. Cárdenas, B.; Sanchez-Obrero, G.; Madueño, R.; Sevilla, J. M.; Blázquez, M.; Pineda, T., Influence of the Global Charge of the Protein on the Stability of Lysozyme-AuNP Bioconjugates. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (38), 22274-22283.
54. Brunori, M.; Amiconi, G.; Antonini, E.; Wyman, J.; Zito, R.; Fanelli, R., Transition between Acid and Alkaline Ferric Heme Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *154* (2), 315-322.
55. Kunze, J.; Burgess, I.; Nichols, R.; Buess-Herman, C.; Lipkowski, J., Electrochemical evaluation of citrate adsorption on Au(111) and the stability of citrate-reduced gold colloids. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *599* (2), 147-159.
56. M. Jackson, H. H. M., *Protein Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy*. Oxford University Press: New York, 2001.
57. Jackson, M.; Mantsch, H. H., The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein-Structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1995**, *30* (2), 95-120.
58. Byler, D. M.; Susi, H., Examination of the Secondary Structure of Protein by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers* **1986**, *25* (3), 469-487.
59. Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H., New Insight into Protein Secondary Structure from Resolution-Enhanced Infrared-Spectra. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *952* (2), 115-130.
60. Fabian, H.; Choo, L. P.; Szendrei, G. I.; Jackson, M.; Halliday, W. C.; Otvos, L.; Mantsch, H. H., Infrared Spectroscopic Characterization of Alzheimer Plaques. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47* (9), 1513-1518.

61. Mahato, M.; Pal, P.; Kamilya, T.; Sarkar, R.; Chaudhuri, A.; Talapatra, G. B., Hemoglobin-Silver Interaction and Bioconjugate Formation: A Spectroscopic Study. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (20), 7062-7070.
62. Chen, S. H.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Zhang, L. Y.; Wang, N.; Li, X. L., Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (7), 1268-1274.
63. Guo, H. L.; Liu, D. Y.; Yu, X. D.; Xia, X. H., Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on nanostructured gold colloid-silk fibroin modified glassy carbon electrode. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2009**, *139* (2), 598-603.
64. Liu, Y.; Han, T.; Chen, C.; Bao, N.; Yu, C. M.; Gu, H. Y., A novel platform of hemoglobin on core-shell structurally Fe₃O₄@Au nanoparticles and its direct electrochemistry. *Electrochim. Acta* **2011**, *56* (9), 3238-3247.
65. Xuan, J.; Jia, X.-d.; Jiang, L.-P.; Abdel-Halim, E. S.; Zhu, J.-J., Gold nanoparticle-assembled capsules and their application as hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin. *Bioelectrochemistry* **2012**, *84*, 32-37.
66. Xie, L.; Xu, Y.; Cao, X., Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized at graphene, flower-like zinc oxide, and gold nanoparticles nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Colloid Surf. B* **2013**, *107*, 245-250.
67. Li, F. P.; Nie, M. Z.; He, X. L.; Fei, J. J.; Ding, Y. L.; Feng, B., Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on a glassy carbon electrode modified with poly(ethylene glycol diglycidyl ether) and gold nanoparticles on a quaternized cellulose support. A sensor for hydrogen peroxide and nitric oxide. *Microchim. Acta* **2014**, *181* (13-14), 1541-1549.
68. Peng, L.; Dong, S. Y.; Li, N.; Suo, G. C.; Huang, T. L., Construction of a biocompatible system of hemoglobin based on AuNPs-carbon aerogel and ionic liquid for amperometric biosensor. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2015**, *210*, 418-424.
69. Zhang, L. L.; Han, G. Q.; Liu, Y.; Tang, J.; Tang, W. H., Immobilizing haemoglobin on gold/graphene-chitosan nanocomposite as efficient hydrogen peroxide biosensor. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2014**, *197*, 164-171.
70. Laviron, E.; Roullier, L.; Degrand, C., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 11-23.
71. Pearce, P. J.; Bard, A. J., Polymer films on electrodes: Part III. Digital simulation model for cyclic voltammetry of electroactive polymer film and electrochemistry of poly(vinylferrocene) on platinum. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *114* (1), 89-115.
72. Clark, R. A.; Bowden, E. F., Voltammetric peak broadening for cytochrome c/alkanethiolate monolayer structures: Dispersion of formal potentials. *Langmuir* **1997**, *13* (3), 559-565.
73. Doan, T. T.; Vargo, M. L.; Gerig, J. K.; Gulka, C. P.; Trawick, M. L.; Dattelbaum, J. D.; Leopold, M. C., Electrochemical analysis of azurin thermodynamic and adsorption properties at

monolayer-protected cluster film assemblies – Evidence for a more homogeneous adsorption interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352* (1), 50-58.

74. Beissenhirtz, M. K.; Scheller, F. W.; Lisdat, F., A Superoxide Sensor Based on a Multilayer Cytochrome c Electrode. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (16), 4665-4671.

75. Calvente, J. J.; Andreu, R.; Molero, M.; López-Pérez, G.; Domínguez, M., Influence of Spatial Redox Distribution on the Electrochemical Behavior of Electroactive Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (39), 9557-9568.

76. Finklea, H. O., *Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker: New York, 1996; Vol. 16.

77. Laviron, E., General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101* (1), 19-28.

78. Perutz, M. F.; Rossmann, M. G.; Cullis, A. F.; Muirhead, H.; Will, G.; North, A. C. T., Structure of Haemoglobin-3-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* **1960**, *185* (4711), 416-422.

79. Tagliazucchi, M.; Calvo, E. J., Charge Transport in Redox Polyelectrolyte Multilayer Films: The Dramatic Effects of Outmost Layer and Solution Ionic Strength. *Chemphyschem* **2010**, *11* (13), 2957-2968.

80. Laviron, E., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part I. Description and discussion of the model. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 1-9.

81. Laviron, E., Use of linear potential sweep voltammetry and of AC voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *100* (1-2), 263-270.

82. Zhang, J. J.; Liu, Y. G.; Jiang, L. P.; Zhu, J. J., Synthesis, characterizations of silica-coated gold nanorods and its applications in electroanalysis of hemoglobin. *Electrochem. Commun.* **2008**, *10* (3), 355-358.

83. Gu, H. Y.; Yu, A. M.; Chen, H. Y., Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid-cysteamine-modified gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *516* (1-2), 119-126.

84. Palanisamy, S.; Cheemalapati, S.; Chen, S.-M., Highly sensitive and selective hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized at multiwalled carbon nanotubes-zinc oxide composite electrode. *Anal. Biochem.* **2012**, *429* (2), 108-115.

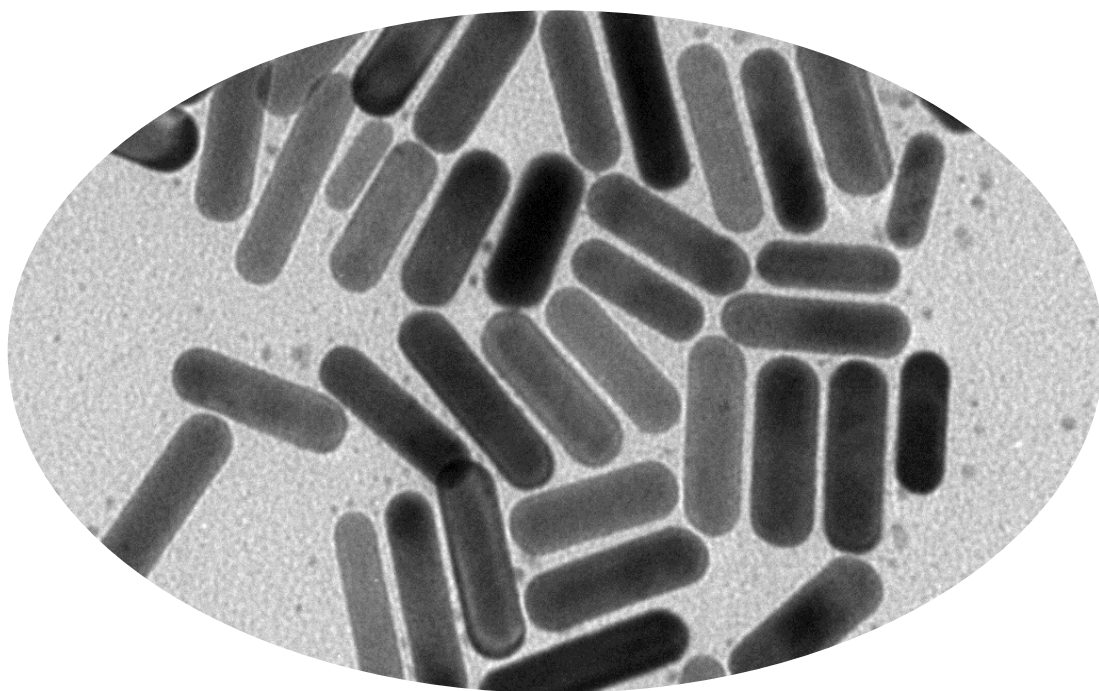
85. Wang, Y.; Qian, W.; Tan, Y.; Ding, S.; Zhang, H., Direct electrochemistry and electroanalysis of hemoglobin adsorbed in self-assembled films of gold nanoshells. *Talanta* **2007**, *72* (3), 1134-1140.

86. Salimi, A.; Sharifi, E.; Noorbakhsh, A.; Soltanian, S., Direct voltammetry and electrocatalytic properties of hemoglobin immobilized on a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8* (9), 1499-1508.

87. Li, J.; Liu, L.; Yan, R.; Xiao, M.; Liu, L.; Zhao, F.; Zeng, B., Enhanced direct electron transfer reactivity of hemoglobin in cationic gemini surfactant-room temperature ionic liquid composite film on glassy carbon electrodes. *Electrochim. Acta* **2008**, *53* (13), 4591-4598.

88. George, S.; Lee, H. K., Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Hemoglobin in Nafion/Carbon Nanochip Film on Glassy Carbon Electrode. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (47), 15445-15454.
89. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Principles and Applications*. 2^a ed.; John Wiley and Sons: New York, 2001.
90. Zhao, G.; Feng, J. J.; Xu, J. J.; Chen, H. Y., Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on self-assembled ZrO₂ film. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7* (7), 724-729.
91. Zhao, G.; Xu, J. J.; Chen, H. Y., Fabrication, characterization of Fe₃O₄ multilayer film and its application in promoting direct electron transfer of hemoglobin. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8* (1), 148-154.
92. Topoglidis, E.; Campbell, C. J.; Cass, A. E. G.; Durrant, J. R., Nitric oxide biosensors based on the immobilization of hemoglobin on mesoporous titania electrodes. *Electroanalysis* **2006**, *18* (9), 882-887.
93. Liu, X. J.; Zhang, W. J.; Huang, Y. X.; Li, G. X., Enhanced electron-transfer reactivity of horseradish peroxidase in phosphatidylcholine films and its catalysis to nitric oxide. *J. Biotechnol.* **2004**, *108* (2), 145-152.
94. Zhou, Y. L.; Hu, N. F.; Zeng, Y. H.; Rusling, J. F., Heme protein-clay films: Direct electrochemistry and electrochemical catalysis. *Langmuir* **2002**, *18* (1), 211-219.
95. Kamin, R. A.; Wilson, G. S., Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Anal. Chem.* **1980**, *52* (8), 1198-1205.
96. Xian, Y. Z.; Xian, Y.; Zhou, L. H.; Wu, F. H.; Ling, Y.; Jin, L. T., Encapsulation hemoglobin in ordered mesoporous silicas: Influence factors for immobilization and bio electrochemistry. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9* (1), 142-148.
97. Scheller, F. W.; Bistolas, N.; Liu, S. Q.; Janchen, M.; Katterle, M.; Wollenberger, U., Thirty years of haemoglobin electrochemistry. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**, *116* (1-3), 111-120.

Capítulo 4



Nanocilindros de oro
(AuNRs)

4. Nanocilindros de oro (AuNRs)

4.1. Introducción.

Las propiedades ópticas, en particular, aquellas que derivan de la forma anisotrópica, confieren un gran potencial a los AuNRs en el campo de las aplicaciones biológicas. Estas propiedades proporcionan una gran sensibilidad a los cambios en el índice de refracción del medio en el que se encuentran.¹

Uno de los principales problemas que presenta el uso de AuNRs en los sistemas biológicos es la presencia del surfactante CTAB que se emplea en los procedimientos de síntesis mediados por semillas, en los que actúa como agente director y estabilizante de la forma y que permanece en forma de bicapa en la superficie de los AuNRs (CTAB-AuNRs).^{2,3}

La alta toxicidad de CTAB está bien documentada en la literatura y asimismo su capacidad de intercalarse en las membranas celulares,⁴ de manera que es necesario eliminarlo de la superficie para que los AuNRs puedan utilizarse en los entornos biológicos. Así, aunque solo una pequeña fracción del CTAB estaría unida a la superficie (si se tiene en cuenta la superficie de la nanopartícula, la densidad de empaquetamiento típico y se considera la existencia de una bicapa, la cantidad que debe quedar unida será una concentración μM), la síntesis se lleva a cabo en disoluciones de CTAB 0.1 M. Es bien conocido que cuando se transfieren los CTAB-AuNRs a una disolución de baja concentración del surfactante ($0.1\text{mM} < \text{CTAB} < 1 \text{ mM}$), se produce una desestabilización rápida de las nanopartículas que termina en un proceso de agregación.⁵ Este efecto se debe a que el CTAB se encuentra sólo débilmente unido a la superficie y se intercambia continuamente con las micelas en disolución. Si la concentración se reduce por debajo de un cierto valor (menor que la concentración micelar crítica (*cmc*)), entonces se pierde el CTAB unido y ya no hay nada que estabilice a los AuNRs frente a la agregación.

La existencia de una bicapa de CTAB en lugar de una monocapa se acepta ampliamente y se ha demostrado experimentalmente mediante diferentes técnicas de caracterización como son la espectroscopía IR, análisis termogravimétrico (TGA) y medidas de potencial zeta.⁶⁻⁸ Los análisis termogravimétricos de CTAB-AuNRs muestran

la presencia de dos picos sucesivos que sugieren la existencia de moléculas unidas en dos conformaciones diferentes. Por otra parte, mediante espectroscopía Raman se ha observado la presencia de un pico debido al enlace Au-Br que sugiere que el grupo de cabeza está fuertemente unido a la superficie del AuNR.⁹ Cabría pensar, entonces, que la cadena de alcano hidrofóbica quedaría expuesta a la disolución, lo que facilitaría que se formara una segunda capa. El papel del ion bromuro se ha determinado añadiendo ion yoduro a nivel de trazas y observándose que se obtienen nanopartículas de formas distintas a las que resultan en ausencia de éstos.^{10, 11} Además, se ha puesto de manifiesto que el propio ion bromuro, independientemente del catión CTA⁺, juega un papel significativo en la dirección del crecimiento de la nanopartícula.¹²

Los trabajos pioneros que describieron el protocolo de síntesis mediado por semillas por los grupos de Murphy y El-Sayed¹³⁻¹⁵ han usado CTAB junto con otras especies químicas que ayudan en el crecimiento de cristales anisotrópicos. Aunque se ha intentado sintetizar AuNRs evitando CTAB,¹⁶ los métodos han fallado tanto en la reproducibilidad de los resultados como en la homogeneidad de la muestra. El papel del surfactante en la formación de los NRs se ha estudiado mediante simulación por dinámica molecular¹⁷ poniéndose de manifiesto que el crecimiento anisotrópico viene facilitado por la adsorción epitaxial de CTAB en las facetas cristalinas que se desarrollan. Esto es consecuencia de las diferentes energías de adsorción en las distintas facetas del oro, que dan lugar a la pasivación por CTAB de las facetas (110) y (100) y median el crecimiento anisotrópico del cristal a través de la reducción preferencial en las facetas (111). Además, hay que destacar el papel de la morfología micelar y la química superficial^{1, 15, 18-20} en la capacidad del CTAB de pasivar efectivamente las superficies del oro epitaxiales, lo que en definitiva viene dictado por la fuerza iónica y la población de contraiones.¹⁴

El crecimiento epitaxial de CTAB, en lo que respecta a la pasivación preferencial y a la energía de unión, se espera que varíe también cuando el método de síntesis mediado por semillas emplee nitrato de plata, observándose que la introducción de Ag(I) en la disolución de crecimiento mejora la monodispersidad morfológica y el rendimiento de los NRs.¹⁵ El análisis cristalográfico de NRs sintetizados por ambos métodos ha puesto de manifiesto que en presencia de Ag(I), se producen monocristales en los que el

crecimiento longitudinal ocurre en la dirección $\langle 001 \rangle$ y la punta está formada por facetas (110) y (111), mientras que el diámetro del cilindro consta de ocho facetas de más alto índice (250).²¹ Además, se ha indicado ¹⁸ que las facetas (250) se desarrollan a través de migración de ad-átomos, ya que los AuNRs maduran durante la síntesis y el NR está enlazado por facetas alternantes (100) y (110) en los estados iniciales. En ausencia de Ag(I), se produce una partícula *penta-twinned*, creciendo el cilindro en la dirección $\langle 001 \rangle$. La superficie longitudinal está enlazada por facetas (100) y (110) y las puntas por facetas (111).²²

Es posible que la Ag(I) tenga un efecto directo en la adsorción de CTA⁺. Estudios de estructura fina de rayos X indican que la Ag está presente en la superficie del NR ^{23, 24} y proponen ²⁵ que se adsorbe siguiendo un proceso de deposición a bajo potencial (*upd*), siendo probable que lo haga en las facetas longitudinales (110), actuando como pasivantes de estas facetas, para dar lugar al crecimiento anisotrópico y proporcionar una superficie diferente en la que se adsorberá CTAB. En un estudio de XPS ²⁶ se ha indicado que el complejo CTA⁺AgBr²⁻ es potencialmente, el surfactante activo, lo que es de esperar que altere la micelización y la adsorción epitaxial en comparación con CTAB.

Por otra parte, se ha mostrado que el contraión tiene efectos significativos en la morfología y densidad del CTAB adsorbido en superficies epitaxiales. Comparando la adsorción de CTA⁺ en superficies de sílice cuando se emplean Br⁻ y Cl⁻ como contraión ²⁷ se ve que, por encima de la *cmc* de CTAB y CTAC, la concentración superficial de CTA⁺ es 60% más alta con Br⁻ que con Cl⁻. Los agregados de CTAB se adsorben como micelas “*worm-like*” y son proclives a coalescer en estructuras homogéneas lateralmente, presumiblemente como bicapas, mientras que la morfología de los agregados de CTAC aparecen como proyecciones circulares. Ya que los efectos de CTA⁺ se ejercen principalmente en el crecimiento de los AuNRs a través de pasivación micelar de las superficies en evolución, se puede esperar que los sistemas empleando Br⁻ promoverán la pasivación epitaxial de las facetas (110) y (100) y, por tanto, el crecimiento anisotrópico. Esto se ha demostrado ¹⁸ viendo que cuando se reduce la relación de Br⁻ a CTA⁺ por debajo de la unidad, añadiendo CTAC, el rendimiento de los AuNRs se reduce con un aumento simultáneo de subproductos isotrópicos.

A la vista de la importancia de las micelas de CTAB en el crecimiento anisotrópico y pasivación de la superficie uniéndose fuertemente a las facetas en evolución, debe concluirse que el papel de CTAB es algo más complejo que el de un surfactante que pasiva la superficie. Además, las consideraciones energéticas ponen de manifiesto que su interacción con el oro es fuerte y tiene importantes implicaciones. Como consecuencia, la eliminación de CTAB de la superficie del NR, via reacciones de intercambio, no es un mero ejercicio de desplazamiento como ocurre en las partículas recubiertas con aniones citrato.

El método más utilizado para eliminar CTAB de la superficie de los AuNRs consiste en el lavado de las suspensiones hasta que su concentración disminuye ²⁸ a un valor por debajo del cual se produce la agregación de los AuNRs.^{14, 15} Se ha propuesto un método para reducir la concentración de CTAB residual que consiste en la extracción desde la fase acuosa a una fase inmiscible con el agua formada por un líquido iónico que contiene ligandos tiolados hidrofóbicos que se unirían fuertemente a la superficie del oro desplazando el CTAB.²⁹ Otros métodos usan el reemplazamiento de las moléculas de CTAB durante el lavado por aniones citrato o con la ayuda de sulfonato de poliestireno que actúa como detergente,^{18, 30} así como mediante la adición de borohidruro sódico seguido rápidamente por el reemplazamiento del ligando.³¹

Para llevar a cabo el intercambio de moléculas en la superficie de los AuNRs se han utilizado numerosas estrategias. Los métodos más populares emplean bien el ensamblado de moléculas zwitter-iónicas *capa-a-capo* sobre el CTAB-AuNR o bien con moléculas que se unen a la superficie vía el enlace S-Au y que deben desplazar el CTAB.³²⁻³⁵ Esta última aproximación es preferible y toma ventaja de la afinidad del S por el oro, que puede llevar a cabo el intercambio de ligandos en la superficie del AuNR, donde la molécula deseada forma una SAM, desplazando idealmente toda la bicapa de CTAB. La ventaja de esta estrategia sobre la de *capa-a-capo* es la posibilidad de eliminar completamente el CTAB, aumentando la estabilización y evitando el riesgo de la contaminación de la disolución. Sin embargo, la estrategia de intercambio de ligandos es más difícil. Los AuNRs se pueden agregar irreversiblemente durante el proceso debido a la desestabilización excesiva de la bicapa de CTAB antes de que la superficie del NR se pase con el ligando entrante.²² En cuanto a la eliminación incompleta, muchos

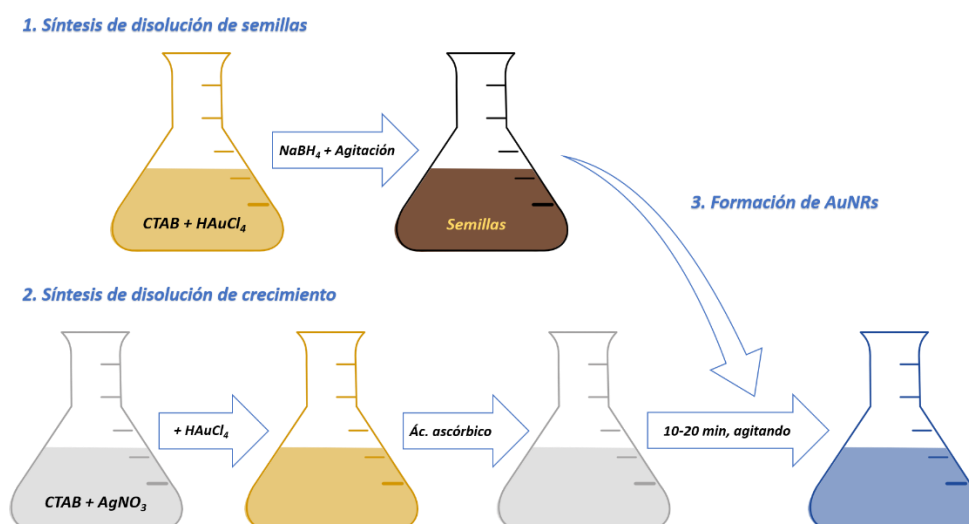
protocolos indican que el CTAB permanece atrapado dentro de la capa de polímero en la superficie del NR, especialmente cuando se emplean moléculas largas como PEG.²² Sin embargo, estudios recientes han mostrado un gran progreso en este tema. La condición para que se produzca el intercambio de ligando es que la molécula desplace al CTAB de la superficie del AuNR, que se una favorablemente y que permanezca unida bajo diferentes condiciones experimentales.^{22, 36-40}

La literatura reciente se ha enfocado en el desarrollo de estrategias para el uso de mercaptoderivados, ditiocarbamatos y disulfuros cíclicos que permiten unir estas moléculas a la superficie del oro. La fuerza del enlace semicovalente S-Au (≈ 45 kcal/mol) aumenta la fuerza de unión de la molécula injertada.⁴¹ Además, la química del tiol es muy atractiva y ha conducido a un aumento rápido del número de moléculas que llevan grupos tiol para el intercambio de ligandos. Las aproximaciones más utilizadas para intercambio de ligandos en AuNRs son *one-pot*, transferencia de fase y fase sólida.⁴²⁻⁴⁷ La aproximación *one-pot* es la más directa. Se trata de métodos bien descritos para la modificación de AuNPs,⁴³ en los que los ligandos se añaden directamente a una disolución acuosa teniendo en cuenta que las AuNPs funcionalizadas resultantes deben mantener su solubilidad y estabilidad.

4.2. Experimental.

4.2.1. Síntesis de AuNRs.

La síntesis de AuNRs se lleva a cabo mediante el método de crecimiento mediado por semillas (Esquema 1). El método se realiza en dos pasos, el primero de los cuales es la preparación de las semillas de oro. Para ello, se mezclan 5 ml de CTAB 0.2 M con 5 ml de una disolución de H₂AuCl₄ 0.5 mM bajo condiciones de agitación vigorosa. A continuación, se añaden 0.6 ml de NaBH₄ 0.01 M (frío), produciéndose inmediatamente un cambio de color a amarillo parduzco. La mezcla se mantiene con la agitación vigorosa durante 2 minutos a 25 °C y se obtienen las semillas de oro.



Esquema 1. Síntesis de AuNRs por el método de crecimiento mediado por semillas.

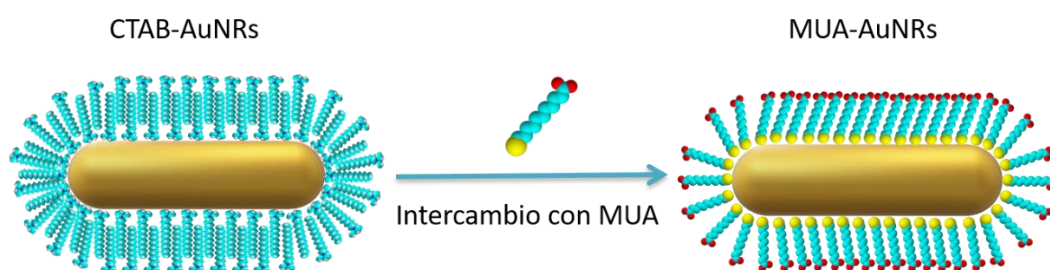
El segundo paso comienza con la preparación de la disolución de crecimiento. Para ello, se mezclan 475 ml de disolución de CTAB 0,1 M con 5 ml de AgNO_3 0,01 M. Esta mezcla se mantiene bajo agitación suave y se añaden secuencialmente 25 ml de HAuCl_4 0,01 M y 2,75 ml de ácido ascórbico 0,1 M. La adición de ácido ascórbico, un reductor suave, da como resultado la reducción de los iones Au(III) a Au(I) , observándose un cambio de color de amarillo oscuro a incoloro. Por último, se añaden 0,6 ml de la disolución de semillas a la disolución de crecimiento, manteniendo la temperatura a 27 °C. El color de la disolución cambia gradualmente (10-20 minutos) hasta que se obtiene un color verdoso o marrón según la relación de aspecto que vayan adquiriendo los AuNRs.

4.2.2. Modificación superficial de CTAB-AuNRs con ácidos mercapto-undecanoico (MUA) y mercapto-hexadecanoico (HMDA).

Los CTAB-AuNRs obtenidos en el procedimiento de síntesis se encuentran en una disolución de alta concentración de CTAB. Para proceder con el proceso de intercambio de ligandos es necesario disminuir la concentración de surfactante. El método que se ha considerado más efectivo para ello es someter a la muestra a varios ciclos de centrifugación (10.000 rpm durante 20 min), redispersando el precipitado obtenido en una disolución de CTAB 2 mM. La repetición de esta operación asegura que la concentración final de CTAB en la disolución que contiene a los CTAB-AuNRs tiene una

concentración constante e igual a 2 mM. Esta es la disolución que se somete a intercambio de ligandos bien con MUA o con ácido mercaptohexadenoico (MHDA).

En el caso de MUA, se parte de una disolución de CTAB-AuNRs 0.35 nM y se añade MUA hasta hacer la disolución 25 mM en el reactivo de intercambio. Esta mezcla se mantiene 24 horas bajo agitación suave. Transcurrido este tiempo, se procede a eliminar el exceso de reactivos mediante varios ciclos de diálisis frente a NaOH 10 mM.



Esquema 2. Modificación de CTAB-AuNRs con MUA.

Para la reacción de intercambio con MHDA se utiliza un procedimiento similar al descrito. No obstante, debido a la menor solubilidad de MHDA en agua, es necesario emplear disoluciones etanólicas. Para el intercambio de CTAB por MHDA se parte de una suspensión de 15 mL de CTAB-AuNRs 0.3 nM a pH 9, a la que se añaden 18 μ L de una disolución etanólica de MHDA 20 mM. La mezcla se mantiene bajo condiciones de agitación, controlando el pH y evitando que disminuya por debajo de pH 9 (4 h). Se ha comprobado que, manteniendo esta mezcla durante 8 h adicionales, se produce el desplazamiento completo de las moléculas de CTAB superficiales. Para eliminar el exceso de MHDA se realizan varios ciclos de diálisis frente a NaOH 10 mM.

4.3. Resultados y discusión.

4.3.1. Caracterización de AuNRs mediante espectroscopia UV-Visible.

Se ha llevado a cabo la síntesis de CTAB-AuNRs siguiendo la metodología descrita en la sección Experimental. Los AuNRs obtenidos se caracterizan, en primer lugar, mediante espectroscopía UV-Visible-NIR. En la Figura 1 se muestran los espectros correspondientes a dos preparaciones en las que se obtienen CTAB-AuNRs de diferente relación de aspecto (AR). En el caso de CTAB-AuNRs (1) aparecen dos bandas LSPR a 517

y 645 nm que corresponden a los modos transversal y longitudinal, respectivamente. Para los CTAB-AuNRs (2) se observan bandas a 510 y 760 nm, lo que está de acuerdo con un cambio en las dimensiones de los AuNRs. Estos parámetros de longitud de onda máxima indican un valor de AR de entre 3 y 4 para los CTAB-AuNRs (1) y (2), respectivamente.^{15, 48}

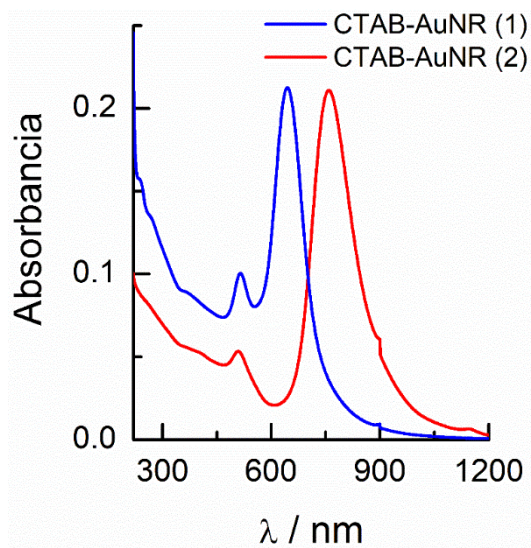
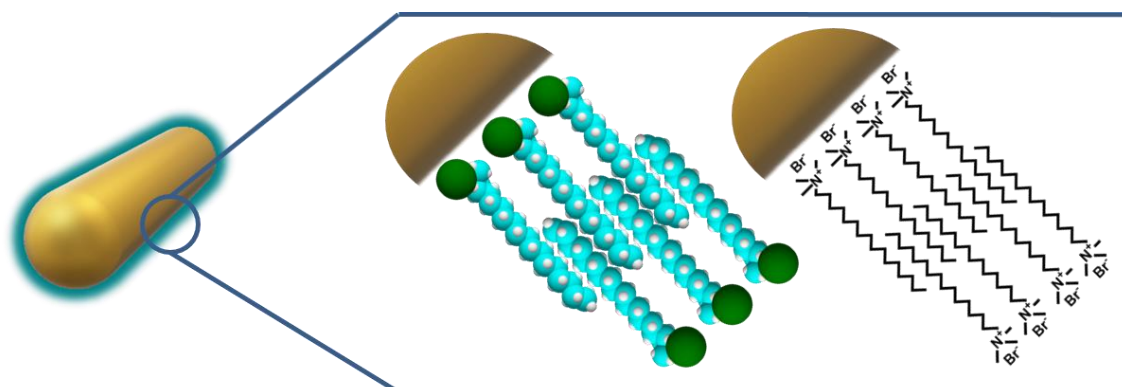


Figura 1. Espectros de absorción UV-visible-NIR de CTAB-AuNRs preparados bajo diferentes condiciones experimentales.

4.3.2. Modificación de CTAB-AuNRs mediante intercambio de ligandos.

La modificación superficial de los CTAB-AuNRs se lleva a cabo mediante intercambio de ligandos poniendo en contacto la suspensión con una disolución de las moléculas que se pretenden intercambiar. En el caso de partículas protegidas por moléculas o aniones unidas a la superficie mediante interacción electrostática o Van der Waals, el intercambio con moléculas que se unen covalentemente es relativamente fácil. En estas condiciones sólo es necesario encontrar las condiciones experimentales apropiadas para que el intercambio se produzca de forma concertada y que la disolución sea capaz de mantener la estabilidad de las partículas modificadas. En cambio, cuando se trata de intercambio partiendo de CTAB-AuNRs, las condiciones son más demandantes. En primer lugar, la bicapa de CTAB formada durante la síntesis es muy estable, y la existencia de interacciones de diferente naturaleza hacen difícil su eliminación. Hay que tener en cuenta que los aniones Br^- se encuentran formando un enlace fuerte con la superficie del oro y, éstos atraen a los cationes CTA^+ a través de la cabeza polar, que

formarían la primera monocapa. De esta manera se expondrían las colas apolares a la disolución acuosa lo que dirige al sistema hacia la formación de una segunda capa mediante interacciones hidrofóbicas y así, se exponen las cabezas trimetilamonio a la disolución (Esquema 3). En segundo lugar, los CTAB-AuNRs presentan carga superficial positiva y el intercambio de ligandos con moléculas que dan lugar a capas moleculares neutras o negativas, resulta desfavorable.



Esquema 3. Disposición de las cadenas de CTAB formando una bicapa en la superficie de los AuNRs.

Se ha visto que la velocidad de desplazamiento de CTAB por mercaptoderivados aumenta un orden de magnitud cuando la reacción de intercambio se lleva a cabo en un medio en el que la concentración de CTAB se encuentra por debajo de 2 mM, concentraciones a las que la bicapa muestra cierta labilidad y se vuelve más fácil de intercambiar.⁴⁹

En este trabajo, se lleva a cabo la modificación de CTAB-AuNRs con los ácidos mercaptoundecanoico (MUA) y mercaptohexadecanoico (MHDA). La efectividad de la reacción de intercambio se puede comprobar utilizando diferentes técnicas de caracterización. Una vez preparados los MUA-AuNRs se realiza un espectro de absorción UV-visible-NIR. En la Figura 2 se muestran los espectros y se comparan con los de CTAB-AuNRs utilizados (1 y 2) obtenidos antes del intercambio. En el caso del intercambio con MUA, se observa que la banda longitudinal LSPR muestra un pequeño desplazamiento al azul desde 645 nm en CTAB-AuNRs a 641 nm, para MUA-AuNRs (Figura 2, insert). Estos desplazamientos se adscriben a los cambios en la constante dieléctrica de la capa

molecular conectada al núcleo de oro.⁵⁰ Este pequeño desplazamiento al azul en la reacción de intercambio de CTAB por MUA estaría de acuerdo con la disminución del espesor de la capa de MUA en comparación con la bicapa de CTAB.

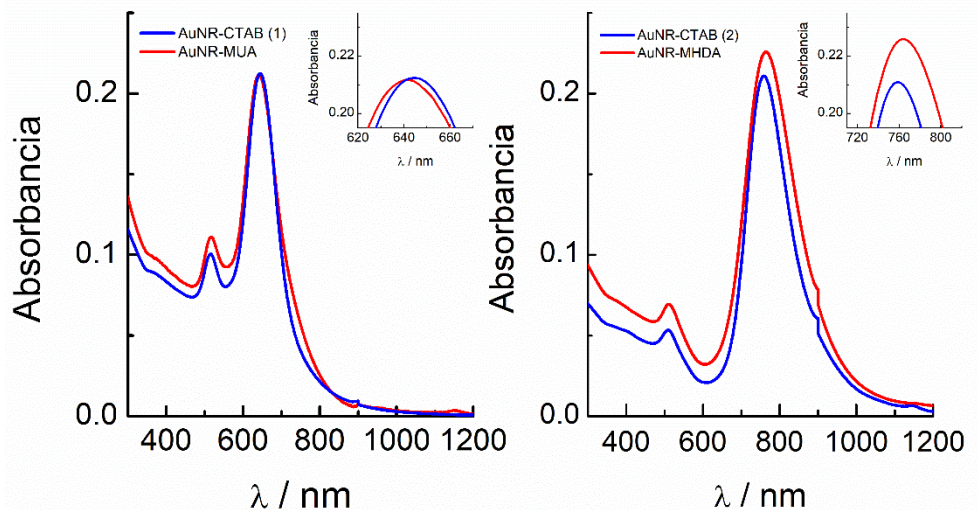


Figura 2. Espectro de absorción de CTAB-AuNRs (1) y (2) (—) y MUA- y MHDA-AuNRs (—); Inserts: vista ampliada de la región del máximo de las bandas longitudinales.

En cambio, el espectro de absorción de MHDA-AuNRs muestra un desplazamiento al rojo (desde 758 a 763 nm) así como un leve aumento de la absorbancia. Aunque la molécula de MHDA no llega a formar una capa del mismo espesor que la de CTAB, el desplazamiento al rojo indicaría que el medio que rodea al AuNR tiene ahora un mayor índice de refracción.⁵⁰

4.3.3. Caracterización de AuNRs mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El tamaño y la forma de los AuNRs se evalúan mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y, a partir de la medida de un conjunto de imágenes se determinan el tamaño y distribución promedio de las nanopartículas obtenidas. La Figura 3 muestra las micrografías TEM de algunos de los AuNRs obtenidos. A través de las imágenes se determina que el tamaño promedio es de aproximadamente 46 x 11 nm (AR = 4) con una distribución homogénea de tamaño (alta monodispersidad).

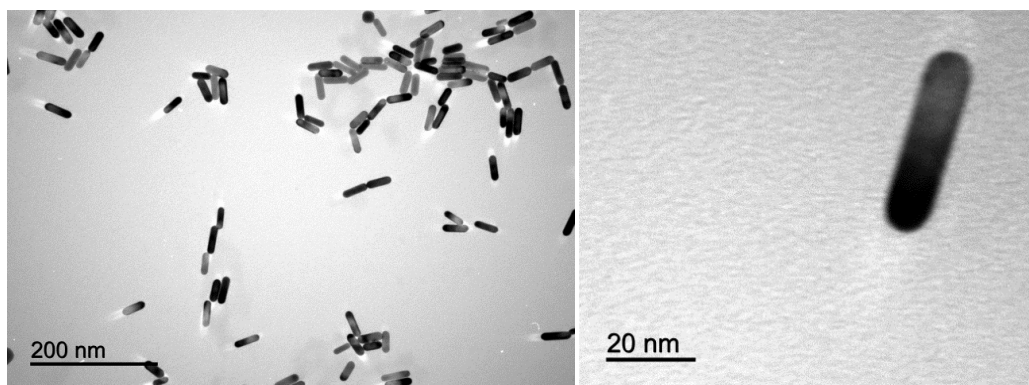


Figura 3. Micrografías TEM de los CTAB-AuNRs.

4.3.4. Caracterización por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).

La espectroscopia XPS es una técnica de análisis superficial que permite conocer la naturaleza de los átomos que se encuentran en la superficie de los materiales (penetración en torno a 10 nm) e informa sobre el entorno molecular de los mismos. En el presente trabajo se ha utilizado para caracterizar los nanomateriales preparados y comprobar la efectividad de las reacciones de intercambio. Para llevar a cabo el análisis se depositan sucesivamente unas gotas de AuNRs sobre un sustrato de cuarzo y se dejan secar hasta que se forma una película de un cierto espesor. La elección del material de cuarzo como sustrato es para evitar interferencias dentro de lo posible. La Figura 4 muestra los espectros XPS obtenidos en un amplio intervalo de energías de unión (*binding energy*, BE) para un sustrato de cuarzo limpio, una lámina de oro y las muestras de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs depositadas en sustratos de cuarzo.

En estos espectros de baja resolución se observan los picos principales que pueden encontrarse en cada material. Como puede observarse, el sustrato de cuarzo presenta señales importantes a 102, 154, 285 y 533 eV que corresponden a los átomos de Si 2p, Si 2s, C 1s y O 1s, respectivamente. El espectro de este sustrato se ha registrado con el objeto de asegurar que los picos obtenidos en el resto de las muestras se deban únicamente a los AuNRs. Además, se ha registrado también el espectro de un sustrato de oro masivo que igualmente se muestra en la Figura 4 y en el que pueden observarse los diferentes picos correspondientes al oro, destacando entre ellos el doblete que se obtiene a 84 y 87 eV que corresponde a Au 4f, que son los que se utilizan normalmente en la evaluación de oro. Los espectros de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs muestran los

picos característicos de los diferentes componentes de las capas moleculares, como se describirá a continuación.

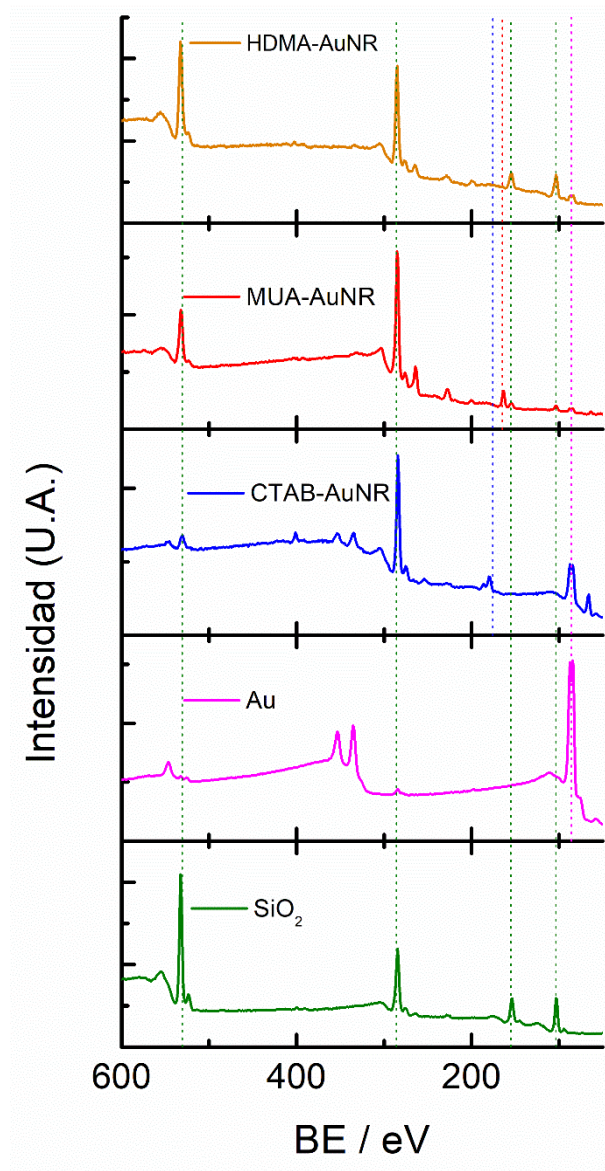


Figura 4. Espectros XPS de sustratos de cuarzo limpio y después de depositar CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs. Asimismo, se muestra el espectro XPS de un sustrato de oro masivo. Las líneas punteadas se han dibujado en el mismo color de los espectros para ayudar a detectar la presencia o ausencia de los diferentes elementos típicos de cada muestra: (—) Si 2p, Si 2s, C 1s y O 1s; (—) Au 4f; (—) Br 3p; (—) S 2p.

Con el objeto de profundizar en la composición de las capas moleculares y la efectividad de las reacciones de intercambio se han registrado espectros en la zona correspondiente a distintos elementos con mayor resolución. La presencia del pico con

forma de doblete correspondiente al Au 4f se ha encontrado tanto en el caso del oro masivo como en las muestras de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs (Figura 5).

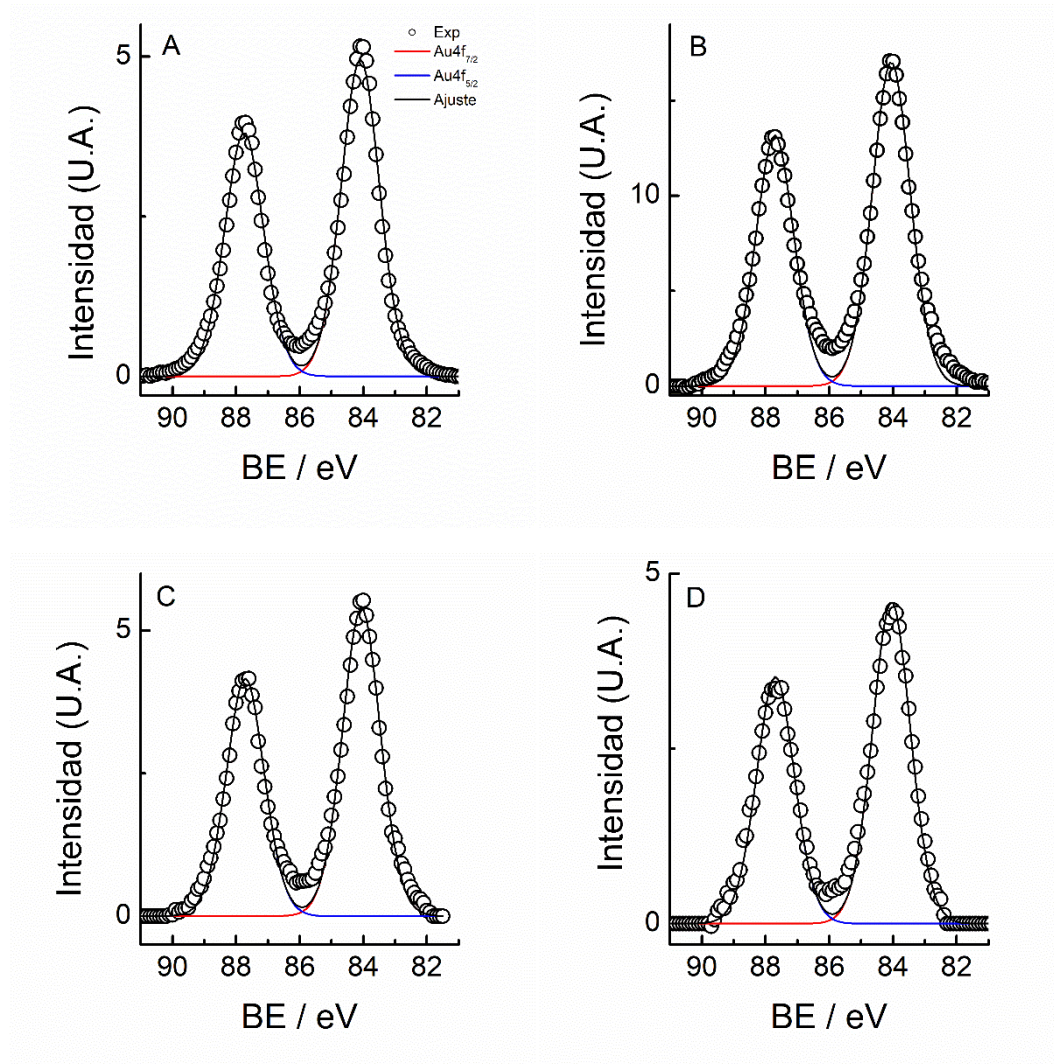


Figura 5. Espectros XPS de alta resolución de la región Au 4f, mostrando el doblete debido al acoplamiento spin-órbita típico, correspondientes a (A) Au masivo; (B) CTAB-AuNRs; (C) MUA-AuNRs; (D) MHDA-AuNRs. Las señales se han deconvolucionado usando funciones Gaussianas.

Los espectros obtenidos en todos los casos (Figura 5) muestran el doblete característico del nivel 4f que presenta una separación de 3.6 eV y una semianchura de pico de 1.6 eV. El pico Au 4f_{7/2} muestra una BE de 84.0 eV, que es el valor típico consistente con el estado de oxidación Au⁰. No se observan cambios entre las señales tomadas en cada sustrato, por lo que cabe pensar que los AuNRs contienen Au de la misma naturaleza que el oro masivo.

En el espectro de CTAB-AuNRs (Figura 4) se observan claramente los picos correspondientes al Br (Br 3p a 179/187 eV y Br 3d a 66 eV) así como a N 1s a 401 eV. A la vista de la dificultad ya mencionada de la eliminación total de CTAB de la superficie de los AuNRs, se ha llevado a cabo un barrido de alta resolución en la región correspondiente al Br 3p antes y una vez realizado el intercambio de ligandos. Esta señal se encuentra también con forma de doblete correspondiente a Br 3p_{1/2} y Br 3p_{3/2}, como se observa en la Figura 6 en el espectro obtenido para la muestra de CTAB-AuNRs.⁵¹ Asimismo, es evidente la ausencia de esta señal en la misma región de energía cuando se examinan MUA- y MHDA-AuNRs, de acuerdo con la práctica eliminación de estas moléculas. Hay que tener en cuenta que los átomos de Br se encuentran unidos a la superficie del Au sirviendo de andamio para el anclaje de la bicapa de CTA⁺, como se muestra en el Esquema 3.

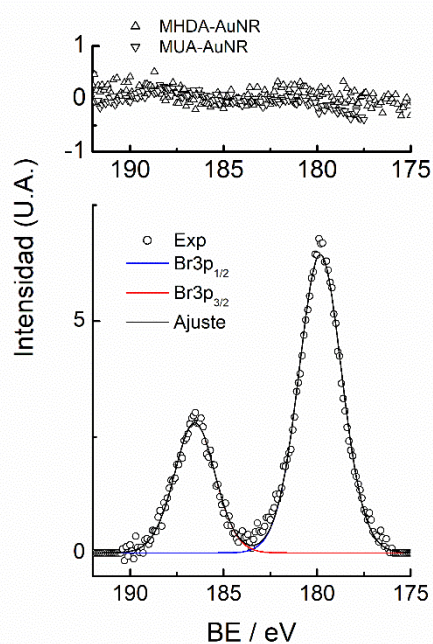


Figura 6. Espectro XPS de alta resolución de la región Br 3p, mostrando el doblete debido al acoplamiento spin-órbita típico, correspondientes a CTAB-AuNRs. En la parte superior se muestra el barrido en la misma región para las muestras de MUA- y MHDA-AuNRs.

Una prueba adicional de la modificación superficial de los AuNRs es la presencia de señales debidas al enlace S-Au. Los espectros S 2p presentan una estructura de doblete debido a la presencia de los niveles S 2p_{3/2} y S 2p_{1/2} (desdoblamiento spin-órbita de 1.18 eV y relación de área de 1:2). El pico correspondiente a los niveles 2p_{3/2} se sitúa a 161.8

eV el $2p_{1/2}$ a 163.0 eV. Estas energías de unión son características de especies tiolato y evidencian la existencia de un enlace Au-S. Para un tiol libre, el pico $2p_{3/2}$ se espera que aparezca a 163.8 eV y el $2p_{1/2}$ a 165 eV y se ha visto que aparecen en SAMs que no se han lavado con el disolvente apropiado, de manera que quedan moléculas de tiol atrapadas en la monocapa, además de las que interaccionan con la superficie.⁵²

Los espectros obtenidos en la región S 2p consisten en picos anchos y ligeramente asimétricos centrados a BE de 162.4 eV y 163.5 eV, para MUA y MHDA, respectivamente (Figura 7). De hecho, estas señales se observan de forma más o menos nítida en los espectros de baja resolución (Figura 4). Se ha llevado a cabo el barrido de alta resolución en la región correspondiente para averiguar la forma de unión de las moléculas de MUA y MHDA a la superficie del oro. En el caso de MUA-AuNRs, el pico observado a 162.4 eV se puede deconvolucionar con un doblete de las características mencionadas con máximos 162.2 y 163.4 eV para los niveles S $2p_{3/2}$ y S $2p_{1/2}$, respectivamente. Estos valores son del orden de los encontrados en tioles que interaccionan fuertemente con Au en SAMs 2D y 3D.⁵³⁻⁵⁶

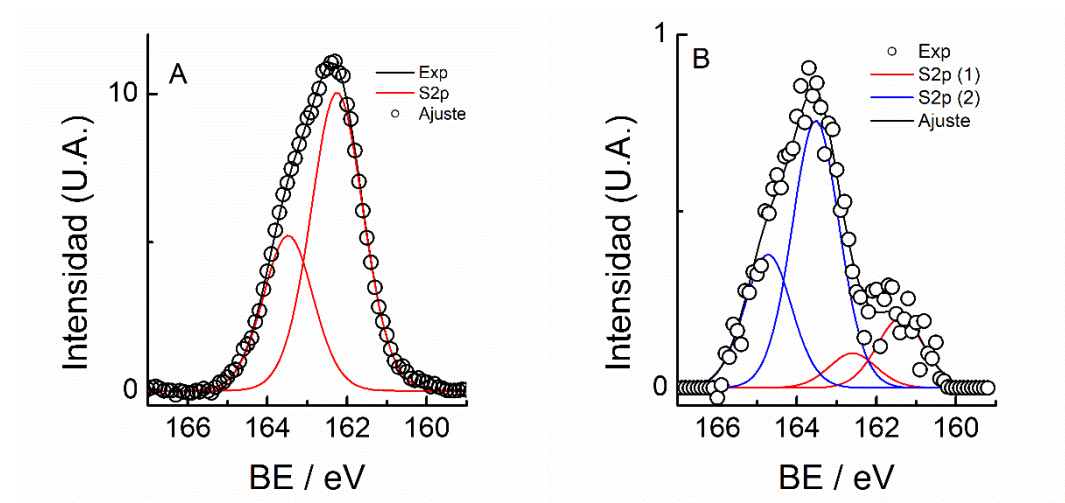


Figura 7. Espectro XPS de alta resolución de la región S 2p, mostrando el doblete debido al acoplamiento spin-órbita típico, correspondientes a (A) MUA-AuNRs y (B) MHDA-AuNRs.

En contraste, el espectro correspondiente a MHDA-AuNRs muestra una estructura algo más compleja con un hombro en la región de menor energía. Para llevar a cabo la deconvolución del pico es necesario introducir dos dobletes con las características mencionadas para este tipo de sistemas. Así, se obtiene un primer doblete a 161.3 y

162.6 eV y un segundo doblete, de mucha mayor intensidad, a 163.5 y 164.7 eV. El primer doblete debe corresponder al enlace S-Au, mientras que el segundo se debería a grupos tiol no enlazados a Au. La relación de intensidad entre estos dobletes es aproximadamente de 1:4, lo que indica que los MHDA-AuNRs llevan adheridos una cantidad importante de moléculas de MHDA. Se ha llevado a cabo un estudio sistemático de limpieza de los MHDA-AuNRs después de completar la reacción de intercambio de ligandos tratando de eliminar el MHDA libre utilizando diferentes procedimientos que incluyen la diálisis frente a disoluciones alcalinas y la centrifugación en ciclos sucesivos y re-dispersión en diferentes disolventes que permitieran eliminar en lo posible el MHDA no enlazado a la superficie del oro. Sin embargo, no se ha encontrado un método apropiado para ello y debe asumirse que los MHDA-AuNRs llevan las moléculas de MHDA interdigitadas de forma estable y en mayor o menor medida, en la monocapa protectora.

En este sentido, es interesante recordar el desplazamiento al rojo (~5 nm) observado en la banda longitudinal en el espectro UV-visible-NIR de los HMDA-AuNRs en comparación con el de CTAB-AuNRs. Este resultado contrastaba con el obtenido para los MUA-AuNRs y se explicó en base a un aumento en el índice de refracción de la capa que rodea a los NRs. Sin embargo, a la vista del resultado de XPS, indicando que existe una cantidad de MHDA unas 4 veces mayor que la correspondiente a una monocapa, hay que concluir que el cambio observado estaría de acuerdo con el mayor espesor de la capa protectora bajo esas condiciones.

En las Figuras 8 y 9 se muestran los espectros de C 1s y O1s para los tres sistemas CTAB, MUA- y MHDA-AuNRs. En el caso de C 1s, el componente a 284 eV se asigna a C metilénicos de las cadenas alquílicas que forman las capas protectoras. Los componentes a mayor BE se asignan a C unidos a átomos más electronegativos tales como N u O en CTAB y MUA o MHDA, respectivamente.⁵⁷ Así, en el caso de CTAB-AuNRs, se obtiene un componente a 284 eV (C 1s (1)) que se asignaría a los grupos metilénicos de las cadenas y el componente a 285.2 eV correspondería a los C unidos a los grupos C-N de las cabezas de amonio cuaternario (C1s (2)). En MUA- y MHDA-AuNRs, se obtienen 3 componentes a 284/285 eV, 285.6/286.3 eV y 287.5/288 eV que se asignan

a los átomos de C de las cadenas alquílicas (C 1s (1)), grupos CH₂-O (C 1s (2)) y carbonilos (C 1s (3)), respectivamente.

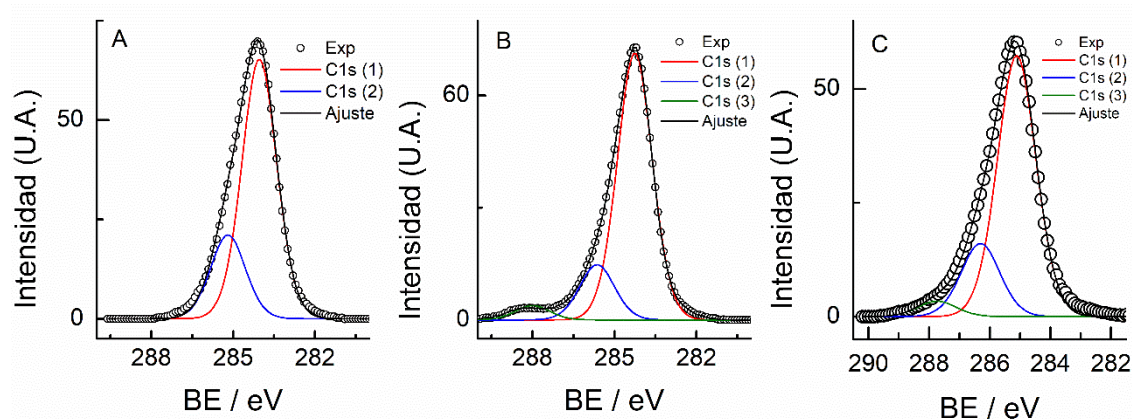


Figura 8. Espectros XPS de alta resolución de la región C 1s de (A) CTAB-AuNRs; (B) MUA-AuNRs; (C) MHDA-AuNRs. Las señales se han deconvolucionado usando funciones Gaussianas.

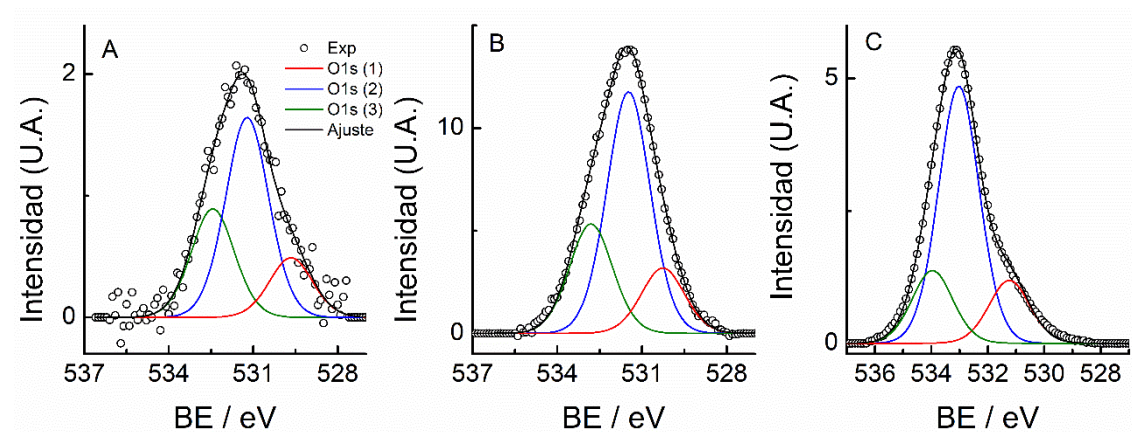


Figura 9. Espectros XPS de alta resolución de la región O 1s de (A) CTAB-AuNRs; (B) MUA-AuNRs; (C) MHDA-AuNRs. Las señales se han deconvolucionado usando funciones Gaussianas.

En los espectros de O 1s se obtienen 3 componentes en todos los casos, con valores comprendidos entre 529.7/531.2 eV, 531/533 eV y 532.4/533.8 eV para la primera, segunda y tercera componente, respectivamente. Las dos primeras componentes se asignan a O en grupos C-O y C=O, mientras que el que se encuentra a mayor BE se asigna a átomos de O de agua de hidratación, bien situada en la parte exterior de la capa o en el interior de la misma.⁵⁸ En el caso de CTAB-AuNRs, los dos primeros componentes deben relacionarse con impurezas en la bicapa, aunque no puede descartarse que estas

señales se deban a los átomos de O de los grupos SiO₂ del soporte de cuarzo que suelen observarse a 532.7 eV.⁵⁹ En comparación (ver Figura 4), el pico O 1s en el espectro a baja resolución de CTAB-AuNRs es mucho menor que el observado en MUA- y MHDA-AuNRs, de acuerdo con esta última hipótesis.

4.3.5. Caracterización de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs mediante espectroscopia Infrarroja.

La espectroscopía infrarroja es una técnica que permite conocer la composición y, en ciertos casos, la conformación u organización de las moléculas que se encuentran adsorbidas en la superficie de los materiales. En este sentido, se ha llevado a cabo un estudio de caracterización mediante esta técnica de todos los sistemas preparados. Se han estudiado tanto los AuNRs modificados con las diferentes capas moleculares como las moléculas de partida, con el objeto de establecer la presencia de las mismas y evaluar los posibles cambios estructurales que se producen después de la adsorción. En la Figura 10 se muestran los espectros obtenidos.

En el espectro de CTAB se observan bandas a 2850 y 2920 cm⁻¹ que se deben a la presencia de tensiones simétrica y asimétrica de los grupos C-H de la cadena hidrocarbonada. Asimismo, se observan dos pequeños picos, perceptibles en forma de hombro de las vibraciones anteriores (2946 y 2982 cm⁻¹) que se deben a las tensiones simétrica y asimétrica de los grupos -CH₃ de las cadenas de CTAB. En la región de bajas frecuencias cabe destacar los picos a 1473 y 1465 cm⁻¹ que se atribuyen a modos tijera y dan cuenta del empaquetamiento en paralelo de las cadenas metilénicas en forma *trans*. En CTAB-AuNRs, estas bandas permanecen sin cambios significativos. El pico a 1486 cm⁻¹ se adscribe a la vibración de flexión C-N del grupo CH₃-N⁺ y sugiere que el grupo amonio cuaternario de cabeza está fuertemente asociado a la superficie del AuNR.³⁹ El pico a 720 cm⁻¹ se asigna a una vibración *rocking* del grupo CH₂ de la cadena metilénica. Las bandas a 960, 938 y 908 cm⁻¹ se deben a las tensiones -C-N⁺ que se transforman en solo dos bandas a 960 y 911 cm⁻¹ en el espectro de los CTAB-AuNRs a la vez que aparecen nuevas bandas de menor intensidad a 1014 y 1040 cm⁻¹.² Se observa un cambio en las intensidades de las bandas a 960 y 911 cm⁻¹, favoreciéndose la segunda en detrimento de la primera, lo que también es una indicación de la unión de los grupos amonio cuaternarios con la superficie.

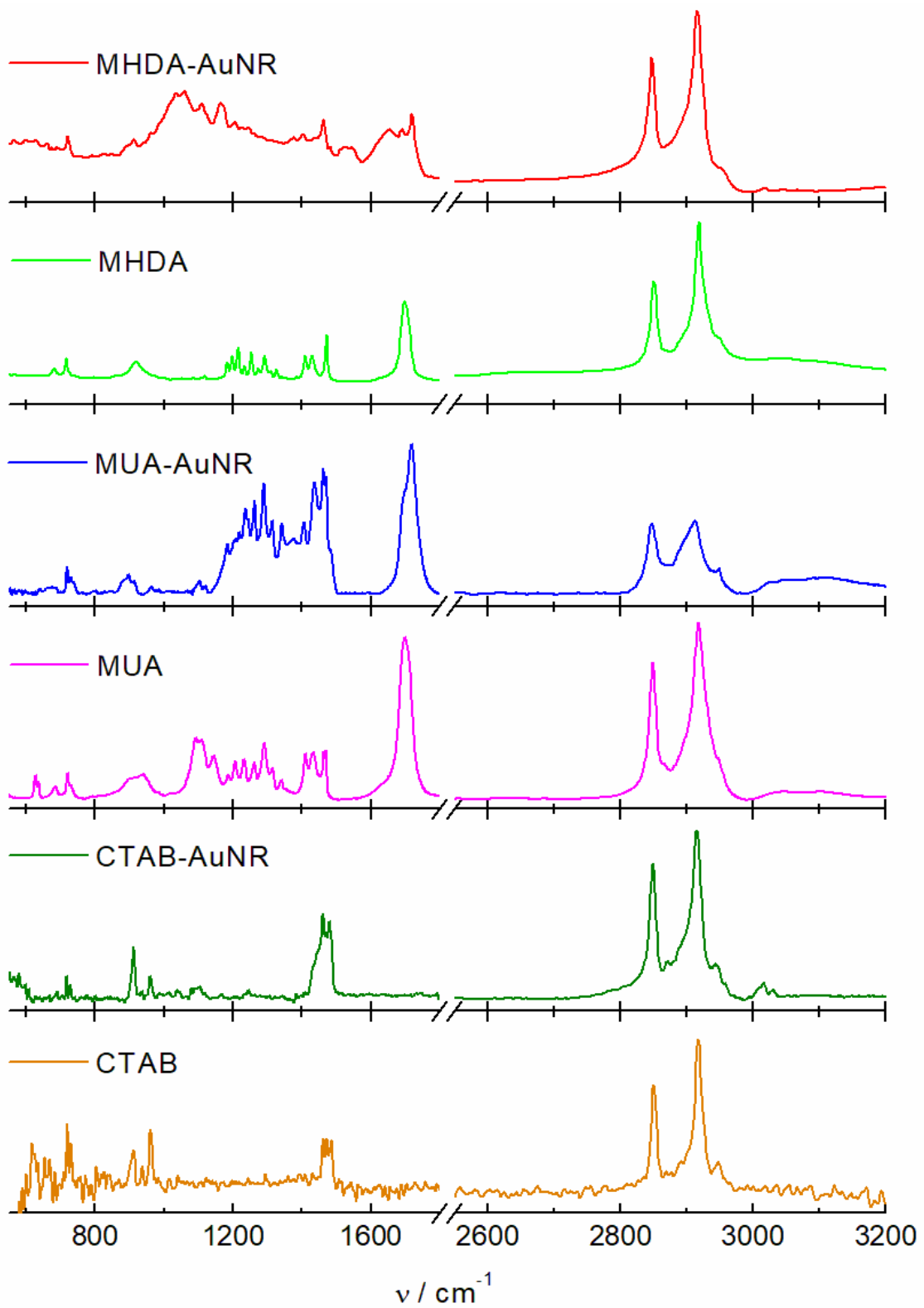


Figura 10. Espectros FT-IR de CTAB, CTAB-AuNR, MUA, MUA-AuNRs, MHDA y MHDA-AuNRs.

En el caso de MUA y MHDA, se observa un comportamiento similar al de CTAB, en la región de altas frecuencias, a excepción de la falta de los picos debido a $-CH_3$ que no

existen en este caso. Cabe destacar la presencia en estos casos del pico a 1700 cm^{-1} que daría cuenta de la presencia del grupo -C=O en estas moléculas, tanto en su forma libre como cuando se encuentran unidos a la superficie del AuNR. Hay que destacar el hecho de que, en los MHDA-AuNRs, este último pico disminuye proporcionalmente en intensidad mientras que aparece un pico de similar magnitud a 1687 cm^{-1} que debería asignarse a grupos -C=O formando enlaces de H. Este hecho, sin embargo, no se observa en MUA libre o unido al NR ni en MHDA libre, lo que estaría de acuerdo con la formación de estos puentes de H solo en el caso de MHDA-AuNRs y con la presencia de MHDA formando una multicapa como se ha observado en los espectros XPS (Figura 7B). En la región de bajas frecuencias, se observa que los picos que aparecen de forma nítida en el caso de MUA y MHDA, muestran un alto grado de solapamiento que impide un análisis más profundo de los mismos.

4.3.6. Caracterización de CTAB- y MUA-AuNRs mediante espectroscopia Raman.

La conformación de la capa protectora de los AuNRs se ha evaluado mediante espectroscopía Raman. En la Figura 11, se recogen los espectros obtenidos para CTAB y CTAB-AuNRs. La presencia de sustratos nanoestructurados, como es el caso de los AuNRs, proporciona señales aumentadas debido al efecto SERS. Por tanto, el espectro de CTAB libre ha debido multiplicarse por una cantidad para que sea comparable en intensidad al obtenido con la muestra CTAB-AuNRs.

Es interesante destacar la aparición de la banda a 170 cm^{-1} en el espectro de los AuNRs, que está ausente en el de CTAB libre.³¹ Esta banda corresponde a la vibración del enlace Au-Br ,⁶⁰ lo que indicaría la interacción de las cadenas de CTAB a través del grupo de cabeza. Esta asignación se ha confirmado en estudios previos que han reemplazado el ion Br^- por Cl^- , cambiando la banda a 250 cm^{-1} , como cabe esperar para el enlace de un átomo más ligero como es Cl a la superficie del oro.⁴⁹

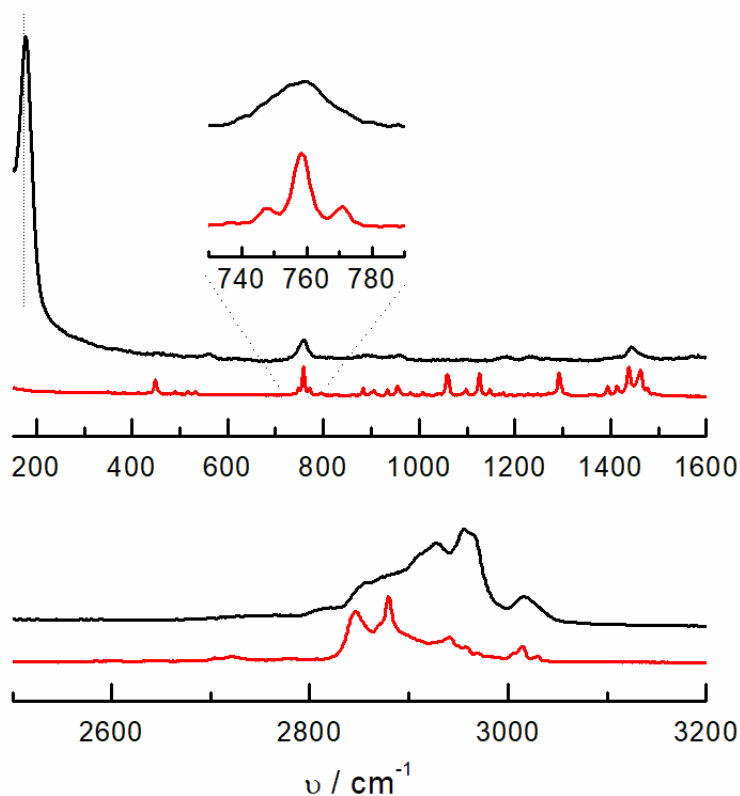


Figura 11. Espectros Raman de CTAB (—) y CTAB-AuNRs (—). La señal de CTAB se ha multiplicado por 6 para hacerla comparable.

Mientras que en el espectro Raman de CTAB aparecen tres bandas a 748, 758 y 770 cm^{-1} que corresponden a tensiones del grupo de cabeza trimetilamonio, en el espectro de los AuNRs se observa una única banda menos definida a 760 cm^{-1} . Se observan también bandas características de cadenas alquílicas largas como son las vibraciones de esqueleto C-C a 1070 y 1144 cm^{-1} , las debidas a los grupos CH_2 , a 1295, 1393, 1447, 1464 y 1481 cm^{-1} . En el caso de CTAB-AuNRs aparecen menos bandas y las que se observan son más anchas, a veces por el solapamiento de algunas y por la falta de resolución. Así, se observan los modos a 1144 y 1232 y 1450 cm^{-1} , la región de huella digital de las vibraciones C-H, las tensiones simétrica y antisimétrica de CH_2 a 2850 y 2880 cm^{-1} , así como las simétricas y antisimétricas de CH_3 a 2930 y 2960, respectivamente. La forma de estas bandas refleja el orden/desorden y la polaridad del entorno de las cadenas de alcano, mediante las relaciones de intensidad 2850/2880 y 2930/2850, respectivamente. Como puede observarse en el espectro, estas relaciones cambian significativamente al pasar desde el CTAB libre al unido a los AuNRs, lo que da cuenta de la diferente conformación y entorno de las cadenas en cada caso. Por último, se observa

también la banda a 3040 cm^{-1} que surge de la tensión asimétrica NCH de las cadenas de los grupos trimetilamonio.⁶¹

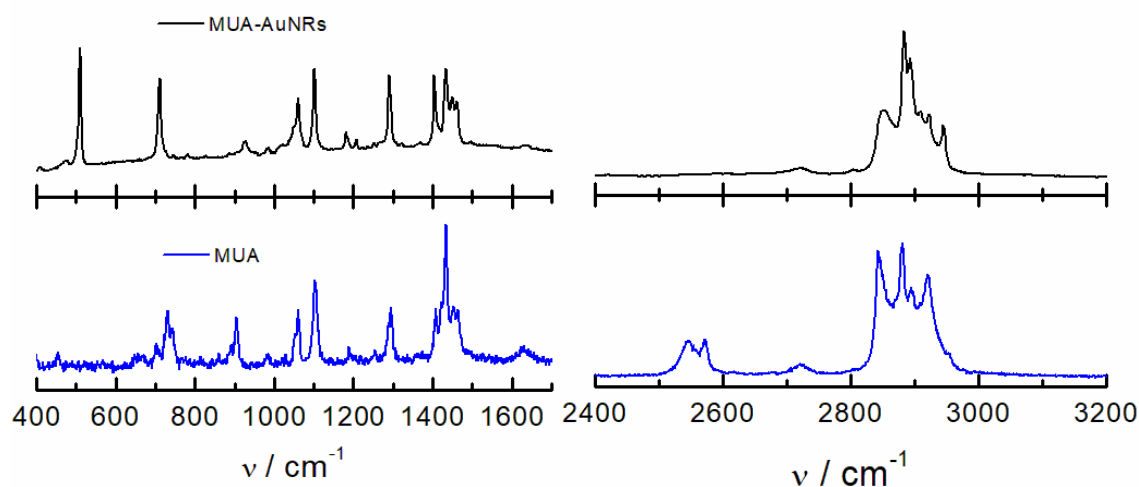


Figura 12. Espectros Raman de MUA y MUA-AuNRs. La señal de MUA se ha multiplicado por 6 para hacerla comparable.

El espectro Raman convencional de MUA se ha llevado a cabo utilizando una muestra sólida y se usa para comparar con el espectro SERS obtenido para la muestra de MUA-AuNRs. Los espectros muestran algunas diferencias que pasamos a comentar. Las bandas que son sensibles a la adsorción de la molécula a la superficie del metal son $\nu(\text{C-S})_{\text{T}}$ a 630 cm^{-1} , $\nu(\text{C-C})_{\text{T}}$ a 1099 cm^{-1} que pueden usarse para caracterizar el proceso de adsorción. Ambas bandas dan información sobre el estado conformacional de las moléculas adsorbidas a la superficie y, además, sobre el carácter trans del esqueleto de las moléculas. Por otra parte, el espectro Raman de MUA libre muestra la presencia de bandas a 2549 y 2575 cm^{-1} que se asignan a la tensión S-H.⁶² Estas bandas desaparecen completamente en el espectro SERS indicando que la molécula de MUA tiene preferencia por la unión a través del grupo tiol.

La banda asignada a $\nu(\text{COOH})$ del ácido carboxílico se observa en el espectro Raman a 908 cm^{-1} y esta banda disminuye proporcionalmente y cambia a 926 cm^{-1} correspondiendo al grupo carboxilato ($\nu(\text{COO})$). Así, hay que concluir que en los AuNRs el grupo carboxílico está disociado. En cuanto a la banda a 1631 cm^{-1} que corresponde al grupo C=O, no se observa en el espectro SERS. Se ha descrito que la lejanía de este

grupo con respecto a la superficie que provoca el efecto SERS junto con el hecho de que la banda muestra muy baja intensidad, hacen que ésta no se observe.⁶³

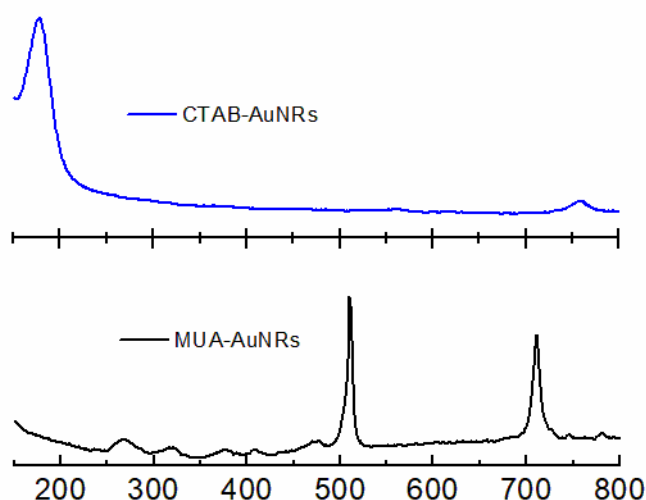


Figura 13. Detalle de los espectros SERS de AuNRs que evidencia el intercambio de CTAB por MUA en la superficie.

Por otra parte, la banda a 175 cm^{-1} debida a la interacción Au-Br no se observa en el caso de MUA-AuNRs lo que, junto con la ausencia de la banda a 760 cm^{-1} debida al grupo trimetilamonio del CTAB, indica que se ha producido un intercambio completo de la bicapa de CTAB por MUA (Figura 13).

4.3.7. Caracterización de CTAB- y MUA-AuNRs mediante técnicas Electroquímicas

Una técnica de caracterización interesante que permite obtener información sobre los CTAB-AuNRs es la voltamperometría cíclica. Para ello se recurre a la técnica de “*drop casting*” y se depositan unas gotas del nanomaterial sobre la superficie de un electrodo de carbón vitrificado (GC) que se usa como electrodo de trabajo.

El uso de este electrodo es apropiado debido a que exhibe un amplio intervalo de potencial útil y de estabilidad bajo diferentes condiciones experimentales. De esta manera, se puede observar la presencia de los AuNRs ya que su perfil electroquímico queda incluido dentro de este intervalo de potencial.

Bajo estas condiciones, se lleva a cabo el experimento de voltamperometría cíclica en un intervalo de potencial que incluya los procesos de doble capa eléctrica y oxidación

y reducción de la superficie del oro. En la Figura 14 se recoge el voltamperograma cíclico (VC) del electrodo modificado que, como puede verse, queda incluido en el intervalo útil del electrodo de GC. El perfil obtenido muestra los picos típicos de oxidación y reducción de la superficie del oro poniendo en evidencia la presencia de los AuNRs sobre la superficie del electrodo de GC y que la presencia de la capa de CTAB no bloquea la superficie del electrodo.

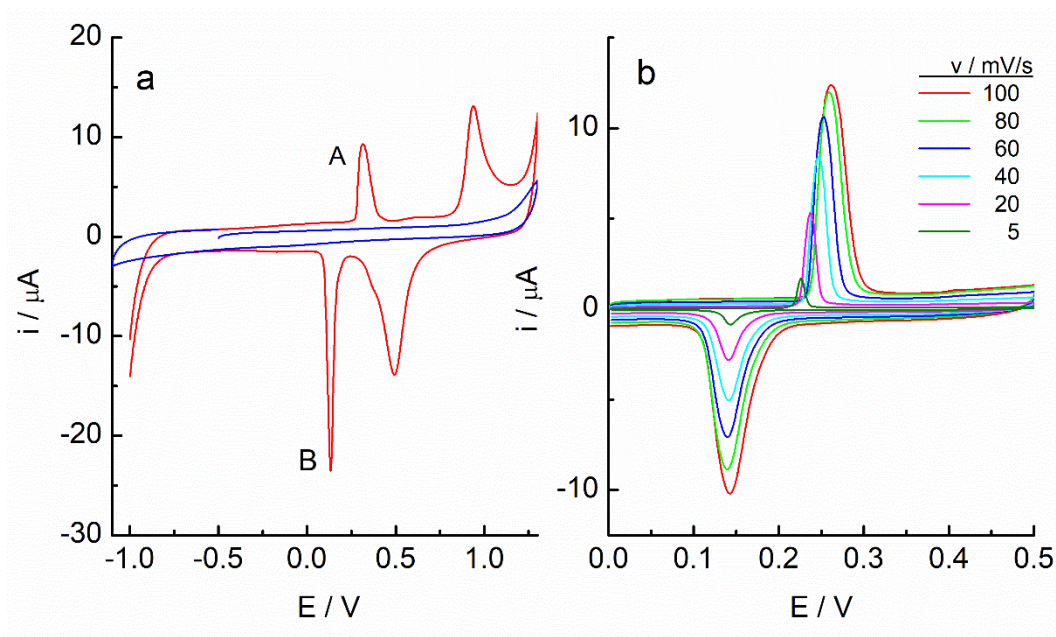


Figura 14. (a) VCs de un electrodo de GC desnudo (—) y modificado con CTAB-AuNRs (—) en disolución fosfato 50 mM a pH 7,4. (b) VCs en la región de los picos A y B a diferentes velocidades de barrido.

Sin embargo, en el voltamperograma aparecen además dos picos estrechos a +0.26 V y +0.13 V (picos A y B), que aparecen en los barridos anódico y catódico, respectivamente, en la zona de potenciales de la doble capa. Estos picos no se observan cuando se usa una superficie limpia de oro por lo que cabe pensar que se deben a la presencia de CTAB en la superficie de los AuNRs. Un estudio restringido en la región de potenciales que comprenden ambos picos y en función de la velocidad de barrido (Figura 14b), permite adscribirlos a la existencia de una transición de fase bidimensional en la superficie del electrodo. Este tipo de proceso ocurre cuando las moléculas depositadas en una superficie adoptan un cambio de conformación probablemente desde una fase ordenada a otra desordenada. Esta transición de fase puede tener su origen en la bicapa

de CTAB que protege la superficie de los AuNRs. Para verificar esta hipótesis, se han llevado a cabo experimentos de adsorción de CTAB en electrodos de oro en presencia de diferentes concentraciones del surfactante y se han observado picos de estas características, lo que permite concluir que las señales obtenidas con los AuNRs corresponden a una transición de fase en la bicapa de CTAB que protege a la superficie.

El análisis de los picos en función de la velocidad de barrido muestra un comportamiento que permite concluir que se trata de una transición de fase de características próximas al comportamiento ideal. Teniendo en cuenta las predicciones teóricas para este tipo de procesos, la intensidad de pico, i_p , debe ser una función de v^x ($x = 0.6$), mientras que la anchura a la mitad de la altura, w , y la diferencia entre los picos anódico y catódico, ΔE , serían ambas funciones de v^{1-x} .⁶⁴ Los valores que se obtienen para las variaciones de $\log i_a$, $\log w$ y $\log \Delta E$ vs. la velocidad de barrido muestran una variación lineal con pendientes de 0.71, 0.27 y 0.2 respectivamente (Figura 15). Estos valores están bastante cercanos a los teóricos, lo que permite concluir sobre la existencia de dicha transición de fase sobre la superficie de los AuNRs.

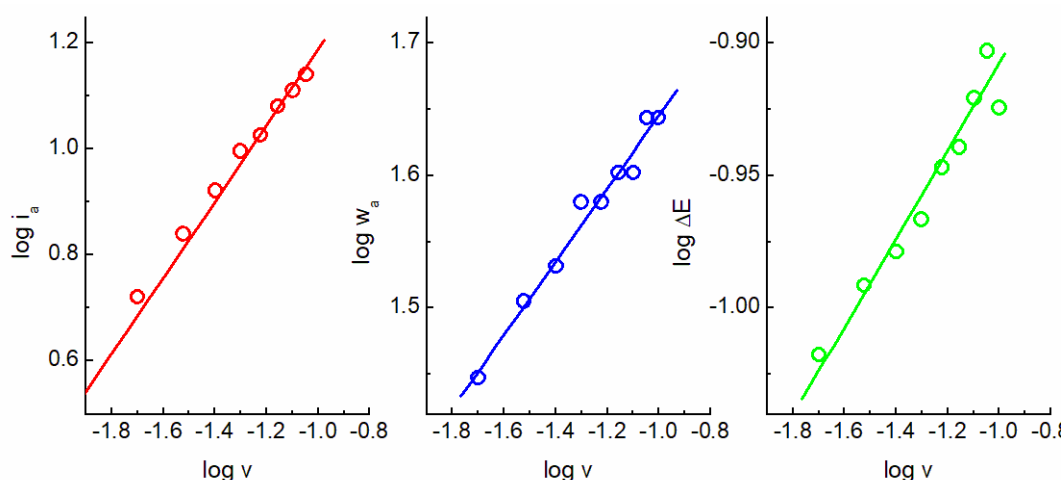


Figura 15. Representaciones logarítmicas de la intensidad anódica (i_a), la semianchura de pico (w_a) y la separación de los potenciales de los picos catódicos y anódicos (ΔE) frente a la velocidad de barrido.

Un estudio reciente de CTAB-AuNRs mediante espectroscopia Raman⁴⁹ ha puesto de manifiesto que las moléculas de CTAB forman una bicapa de surfactante perpendicular a la superficie. Se observa que, conforme la concentración en disolución disminuye, se produce una transición estructural en la capa de surfactante desde una

forma ordenada a altas concentraciones a una estructura desordenada en la que las cadenas alquílicas de CTAB interaccionan con la superficie del oro, a bajas concentraciones. Se establece que la bicapa de CTAB es estable en tanto la concentración en disolución es suficientemente alta como para que las micelas de CTAB sean abundantes y se mantenga el equilibrio dinámico. Cuando la concentración en disolución se encuentra por debajo de 2 mM, las moléculas de CTA^+ abandonan la bicapa y ésta pierde su integridad. Bajo todas las condiciones de concentraciones estudiadas, se observa la señal debida al enlace Au-Br^- , lo que indica que éste resiste a la pérdida de moléculas en la interfase. En las condiciones experimentales del presente estudio, la concentración de CTAB no cambia ya que el material depositado queda atrapado bajo la membrana de Nafion. Cabe pensar por tanto que, al comienzo del experimento electroquímico, a potenciales negativos, el electrodo mantiene su carga negativa y las moléculas de CTA^+ son atraídas y permanecen unidas en forma ordenada hasta que se alcanza el potencial de carga cero del electrodo, bajo las condiciones experimentales en que se realiza el voltamperograma. A partir de este potencial, la interfase adquiere carga positiva y las moléculas de CTA^+ son repelidas, dando lugar a una fase más desordenada que la inicial. El par de picos observado, por tanto, muestra la transición estructural entre ambas fases ordenada y desordenada.

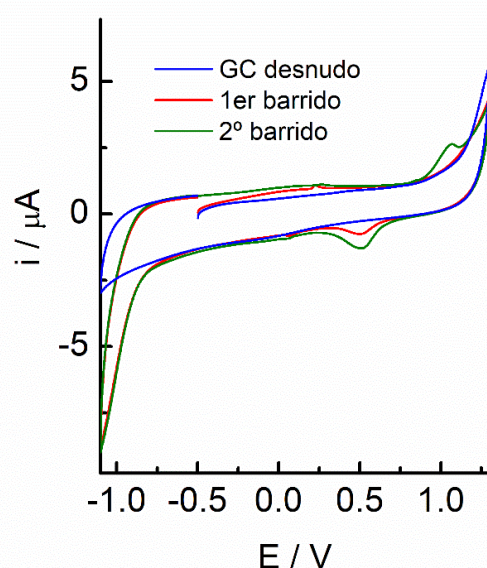


Figura 16. VCs de un electrodo de GC desnudo y modificado con MUA-AuNRs en disolución fosfato 50 mM a pH 7,4.

El perfil electroquímico de los MUA-AuNRs depositados en el electrodo GC muestra los típicos picos de oxidación y reducción del oro (Figura 16). Sin embargo, estos picos son más difíciles de observar que los de CTAB-AuNR, probablemente porque es necesario eliminar la monocapa autoensamblada de MUA en el primer barrido para acceder a la oxidación y reducción de la superficie de oro. De hecho, el primer barrido no muestra la señal de oxidación correspondiente, pero en el barrido inverso aparece una pequeña señal de reducción. Después de varios barridos, el perfil electroquímico no cambia, lo que indica que la mayoría de las moléculas de MUA se han eliminado de la superficie del AuNR.

4.3.8. Estabilidad de CTAB-, MUA- y MHDA-AuNRs en disoluciones acuosas.

El estudio del comportamiento de los nanomateriales en disoluciones acuosas es de gran interés debido a la posible utilización de los mismos en el campo de la Biomedicina. Este aspecto se relaciona directamente con la estabilidad de las suspensiones en disoluciones de diferente composición y en función de las variables de interés.

Se ha llevado a cabo un estudio de las suspensiones de CTAB-AuNRs en función del pH del medio. Para ello, se ha eliminado el exceso de CTAB que existe debido al procedimiento de síntesis, manteniendo la preparación en equilibrio con una concentración 2 mM del surfactante. En la Figura 17 se muestran los espectros obtenidos a diferentes pH. En el intervalo de $3 < \text{pH} < 9$ no se observan cambios en el espectro en las bandas longitudinal y transversa que se encuentran a 658 y 514 nm respectivamente. A partir de pH 9, se produce una disminución importante de la intensidad de la banda longitudinal con una inflexión aproximadamente a pH 11 acompañada de un desplazamiento al azul de unos 15 nm (Figura 18). En cuanto a la banda transversa, al ser ésta de menor intensidad, parece presentar un cambio menor. De la misma forma, en el intervalo de pH ácido, neutro y ligeramente alcalino, no se observan cambios en esta banda. Sin embargo, al igual que con la banda longitudinal, se observa una disminución drástica de la absorbancia, así como un desplazamiento al rojo en torno a unos 20 nm mostrando la inflexión también a aproximadamente pH 11.⁶⁵

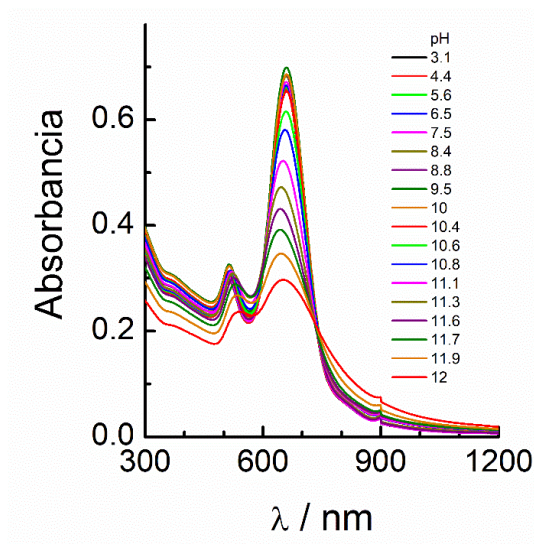


Figura 17. Espectros UV-Visibles de CTAB-AuNR a diferentes pH.

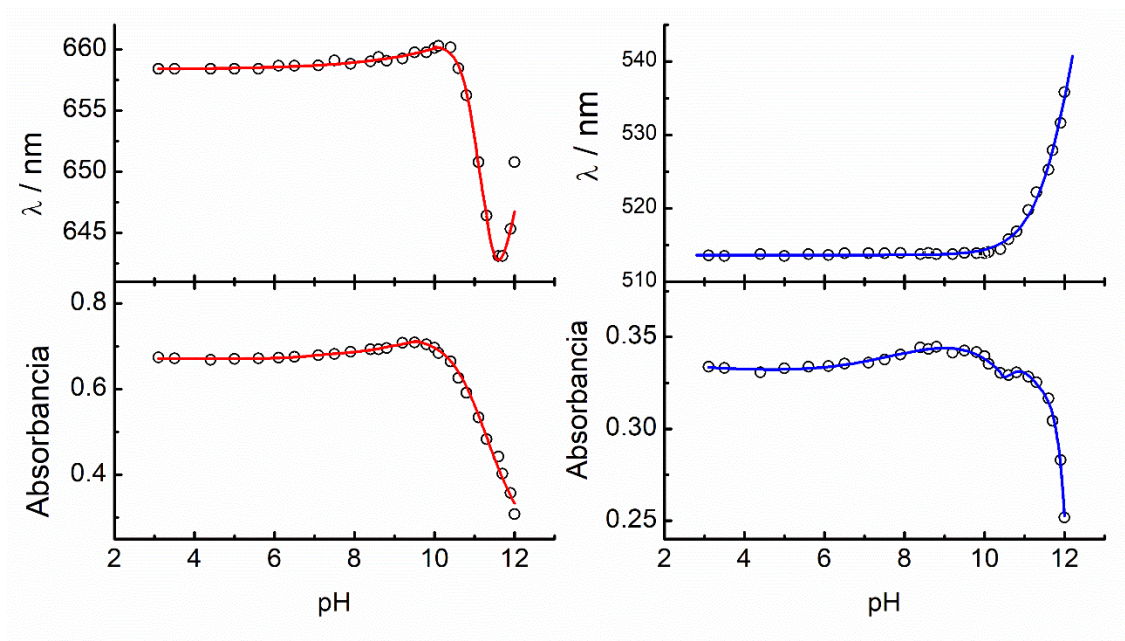


Figura 18. Variación de la longitud de onda y de la absorbancia de las bandas LSPR de CTAB-AuNRs en función del pH.

A partir de estos resultados se puede concluir que los CTAB-AuNRs en disoluciones acuosas que contienen 2 mM de CTAB son estables en un amplio intervalo de pH, volviéndose inestables a $\text{pH} > 10$.

El comportamiento de los MUA-AuNRs en disolución acuosa resulta muy interesante (Figura 19). Como se ha indicado en la sección experimental, el intercambio de ligandos (de CTAB a MUA) se lleva a cabo en medio alcalino que es donde se presume

que los MUA-AuNRs son estables ya que se producirá una interacción repulsiva estabilizante debido a la carga negativa de los grupos carboxilato en la superficie. Así, partiendo de pH 11 donde se observan las bandas longitudinal y transversa a 643 y 511 nm, la forma del espectro no cambia hasta alcanzar un pH < 9, valor a partir del cual se produce un aumento importante de absorbancia que se acompaña de un aumento del scattering en la región de longitudes de onda del NIR. Este aumento de absorbancia, sin embargo, no es homogéneo, obteniéndose una cierta estabilización en el intervalo de pH entre 8 y 6, a partir del cual comienza otra nueva tendencia al aumento, llegando a estabilizarse a pH ácidos. En la Figura 19 B se ha representado el cambio de absorbancia en función del pH y se ha realizado el ajuste de los datos utilizando una curva sigmoideal.

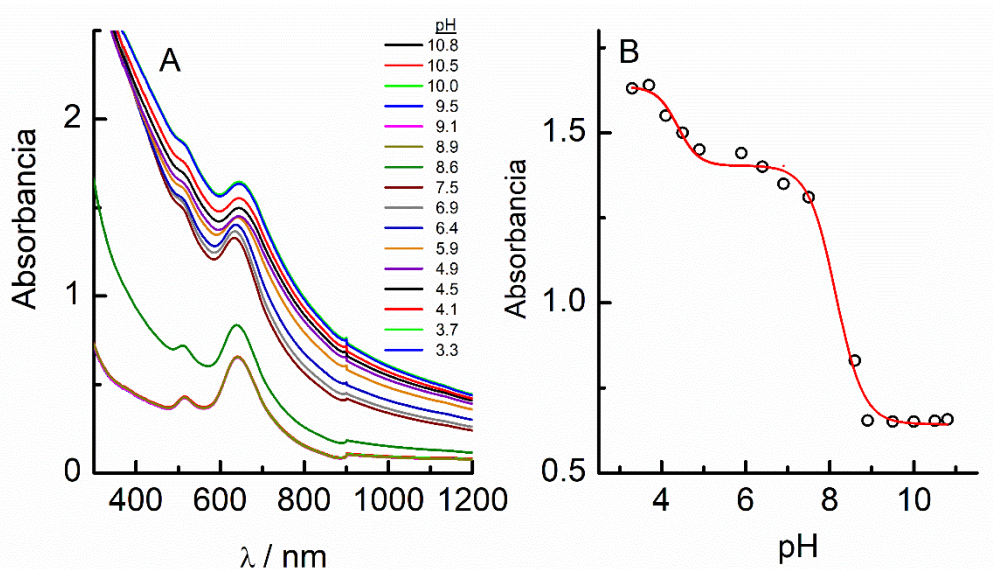
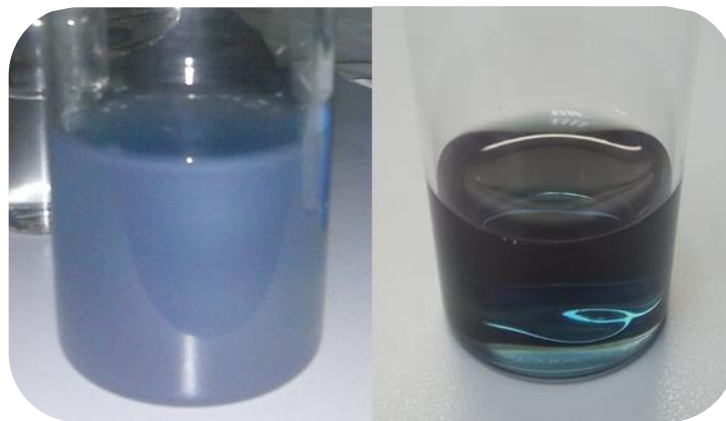


Figura 19. (A) Espectros UV-Visible-NIR de MUA-AuNRs a diferentes pHs. (B) Evolución de la absorbancia a 640 nm en función del pH.

Como puede observarse, el mejor ajuste se obtiene incluyendo una doble curva sigmoideal con inflexiones a pH 4.4 y 8.1. Naturalmente, los cambios observados se deberán al aumento del tamaño de partículas en la dispersión, lo que daría lugar a la formación de agregados que producen este efecto en la absorción de radiación. No obstante, es bien conocido que la formación de agregados de nanopartículas de oro de mayor tamaño produciría un cambio importante en la longitud de onda de las bandas LSPR, lo que no es el caso. Por otra parte, hay que tener en cuenta que las inflexiones que se observan están relacionadas con el pK de los grupos carboxílicos de las moléculas

de MUA. Bajo estas condiciones, podría pensarse que los cambios en absorbancia estarían relacionados con aumentos de tamaño de las nanopartículas, pero no en lo que respecta al núcleo de oro. Probablemente, en la disolución se mantienen algunas moléculas de MUA libres que no se han eliminado en el proceso de limpieza y que pueden formar enlaces de H con las que forman parte de la monocapa protectora, produciendo el aumento en la señal de scattering. En este sentido, puede deducirse que la primera inflexión corresponde al pK del grupo carboxílico de moléculas de MUA poco empaquetadas, como se encontrarían en los extremos de los AuNRs. En cambio, el pK que representaría la segunda inflexión correspondería a las moléculas de MUA bien organizadas situadas sobre los lados del AuNR que, como ocurre en las monocapas autoensambladas de MUA formadas en superficies macroscópicas, muestran pKs aparentes con valores mayores que los encontrados en disolución y películas poco organizadas.^{66, 67} Así, conforme los grupos carboxílicos se protonan, las moléculas de MUA en disolución interaccionarían con las que se encuentran ancladas en los NRs y el tamaño aumentaría drásticamente, produciéndose el aumento de scattering. De esta manera, las moléculas de MUA ensambladas en las esferas deberían tener un pK de disociación muy cercano al de las moléculas de MUA libres, ya que los grupos carboxílicos están lejos los unos de los otros y no interactúan. Sin embargo, las moléculas de MUA ensambladas en la superficie del cilindro deben encontrarse estrechamente empaquetadas y los grupos carboxílicos vecinos pueden formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, por lo que la disociación de los grupos -COOH se ve impedida incluso a un pH más alto que el pK de disociación de los grupos -COOH libres. Un detalle interesante que nos ayuda a adoptar esta idea es el aspecto de la disolución. A pH alcalino, la dispersión de MUA-AuNR es de color azul verdoso transparente y, cuando el pH es más bajo, se vuelve opaco (Esquema 2). Sin embargo, la disolución transparente se recupera completamente al cambiar el pH de la solución. Por lo tanto, los fenómenos ópticos observados deben ser debidos a la formación de agregados transitorios que deberían intercambiarse muy rápido.



Esquema 2. Imágenes de las dispersiones de MUA-AuNRs a pH ácido y alcalino.

Partiendo de esta premisa, se ha llevado a cabo un estudio de MUA-AuNRs que han sido sometidos a una limpieza exhaustiva, con el objeto de eliminar en lo posible todas las moléculas de MUA libres en disolución. El estudio en función del pH que se ha obtenido bajo estas condiciones experimentales se muestra en la Figura 20. Como puede observarse, al disminuir el pH se obtiene una pequeña disminución de absorbancia sin que haya un cambio perceptible en la longitud de onda de la banda longitudinal. Al alcanzar el medio un pH en torno a 7 se produce un desplazamiento de esta banda hacia el rojo que, a $\text{pH} < 6$ se hace muy importante ocurriendo en paralelo con una disminución de la absorbancia (Figura 21). La banda transversa sufre cambios similares pero de mucha menor magnitud. Los cambios en la banda longitudinal hacia el rojo a la vez que se produce una disminución de amplitud se ha descrito que se deben un ensamblado *end-to-end*, mientras que los cambios al azul de la banda longitudinal en paralelo con desplazamientos hacia el rojo de la banda transversa, disminuyendo la amplitud de la primera y aumentando la de la segunda, se deben a ensamblado *side-by-side*.⁶⁸ Este hecho puede compararse con lo obtenido para CTAB-AuNRs que implicaría un cambio del mismo tipo cuando se produce la desestabilización de la dispersión.

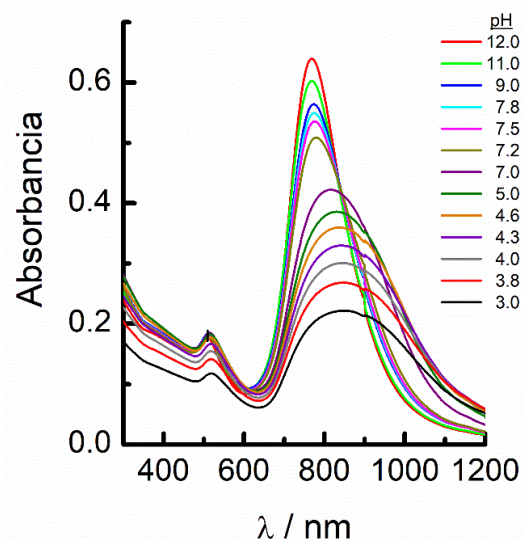


Figura 20. Espectros UV-Visibles de MUA-AuNR a diferentes pH.

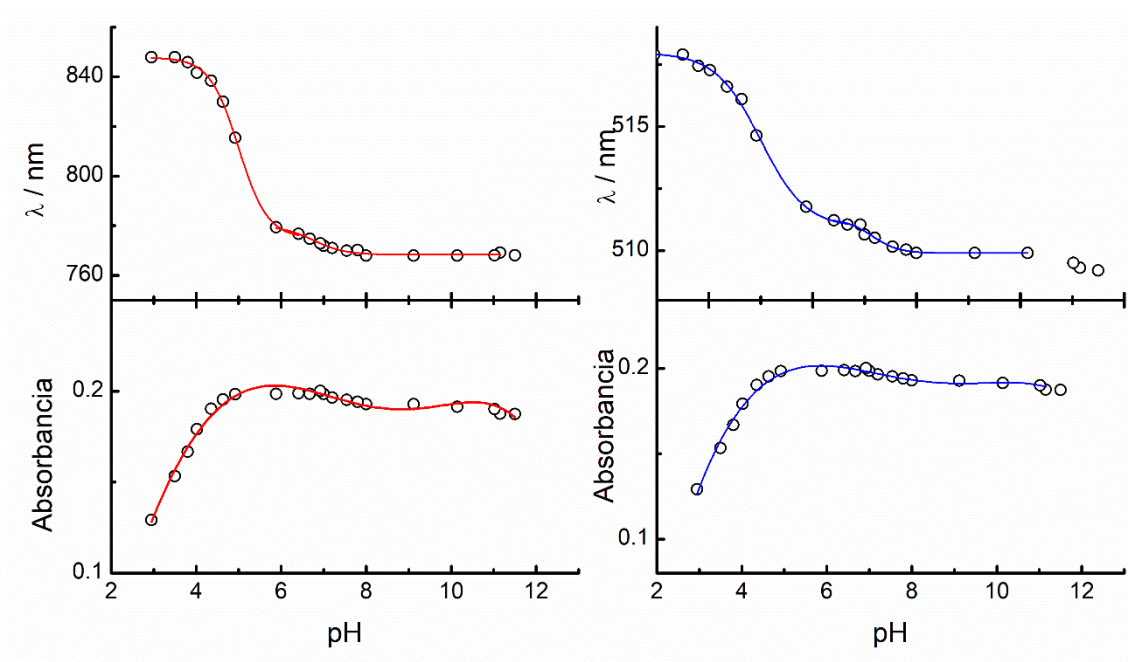


Figura 21. Variación de la longitud de onda y de la absorbancia de las bandas LSPR de MUA-AuNRs en función del pH.

Para averiguar si los cambios observados obedecen a lo expuesto, se ha llevado a cabo un estudio mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) preparando las muestras a diferentes pH (Figura 22).

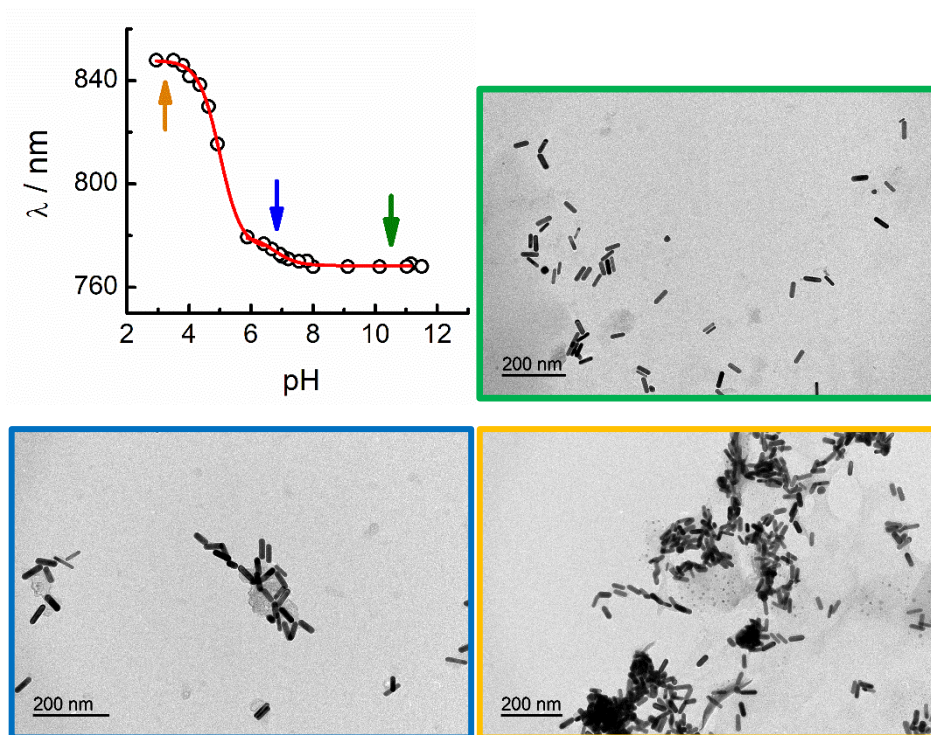


Figura 22. Micrografías TEM de los MUA-AuNRs depositados a los pHs que se señalan en la curva de λ vs pH con flechas de colores que coinciden con los de los marcos.

Puede observarse que, a pH alcalino, los MUA-AuNRs se encuentran dispersos. Al disminuir el pH hasta los valores próximos a 6-7, se obtiene un ensamblaje *end-to-end*, como se ha descrito más arriba, que provoca el desplazamiento de la longitud de onda hacia el rojo y la disminución de la amplitud del pico. Finalmente, cuando se depositan los MUA-AuNRs desde medio ácido, se obtiene una combinación de ensamblados *end-to-end* con agregados de un cierto tamaño.

Estos resultados indican que, bajo estas condiciones de extrema limpieza, se obtiene un comportamiento que puede estar originado por las propiedades de la monocapa protectora de MUA. Así, los MUA-AuNRs se encontrarían dispersos en medio alcalino debido a la repulsión de las cargas negativas de los grupos carboxilato. Al disminuir el pH hasta medio neutro empiezan a protonarse algunos grupos carboxilato. Es posible que los primeros grupos que se protonen sean los que se encuentran en los extremos del NR dando lugar al ensamblaje *end-to-end* a través de la formación de enlaces de H, que se observa en las micrografías de la Figura 22.

Por último, se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad de los MHDA-AuNRs. En la Figura 23 se muestran los espectros registrados en la región UV-visible-NIR a diferentes pH. De nuevo, se parte de disoluciones alcalinas ya que, en este caso, el procedimiento de intercambio de ligandos también se lleva a cabo en este medio. Bajo estas condiciones, el espectro obtenido muestra bandas a 768 y 510 nm para el modo longitudinal y transversal, respectivamente. Al disminuir el pH hasta un valor en torno a 10, no se obtienen cambios en las bandas como consecuencia de que los grupos carboxilo terminales de la capa protectora no cambian bajo estas condiciones. A pH < 10 se produce un drástico cambio en la banda longitudinal hacia el azul, en paralelo con una disminución de la absorbancia, con una inflexión en torno a pH 8.5-9.0. Al mismo tiempo, la banda transversal muestra un desplazamiento al rojo que coincide con el observado para la banda longitudinal. Estos cambios, como se ha mencionado más arriba, se cree que se producen por el ensamblaje de los NRs en configuración *side-by-side*. A continuación, y en el intervalo $8.5 > \text{pH} > 6.5$, se observa que la absorbancia permanece constante a la vez que la banda LSPR se desplaza al rojo. A pH < 6.5 se produce una meseta de absorbancia y un valor constante de longitud de onda después de sufrir una pequeña disminución de la absorbancia (Figura 24).

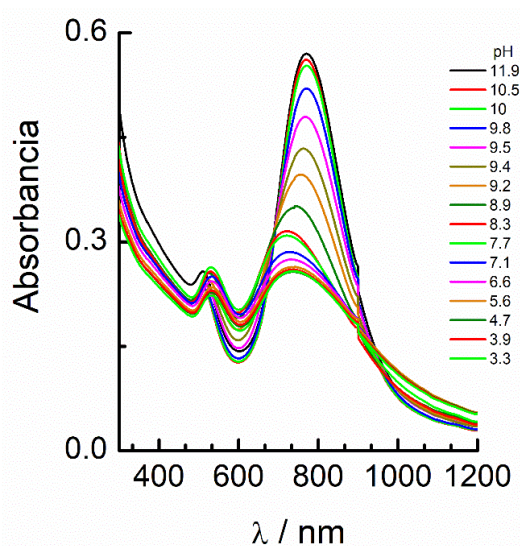


Figura 23. Espectros UV-VisibleNIR de MHDA-AuNR a diferentes pH.

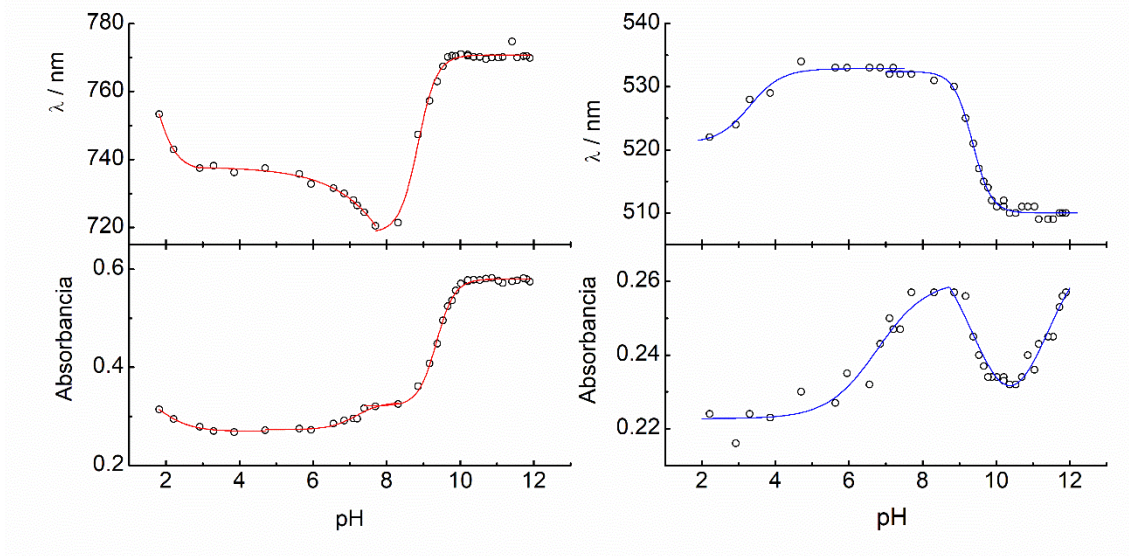


Figura 24. Evolución de la λ_{LSPR} de las bandas longitudinal y transversa y de la absorbancia a estas λ_{LSPR} en función del pH.

Para comprobar si los cambios en los espectros están relacionados con los ensamblajes descritos, se ha llevado a cabo un estudio mediante TEM, eligiendo algunos de los valores de pH para los que se producen los cambios importantes en las bandas, según se muestra en la Figura 25.

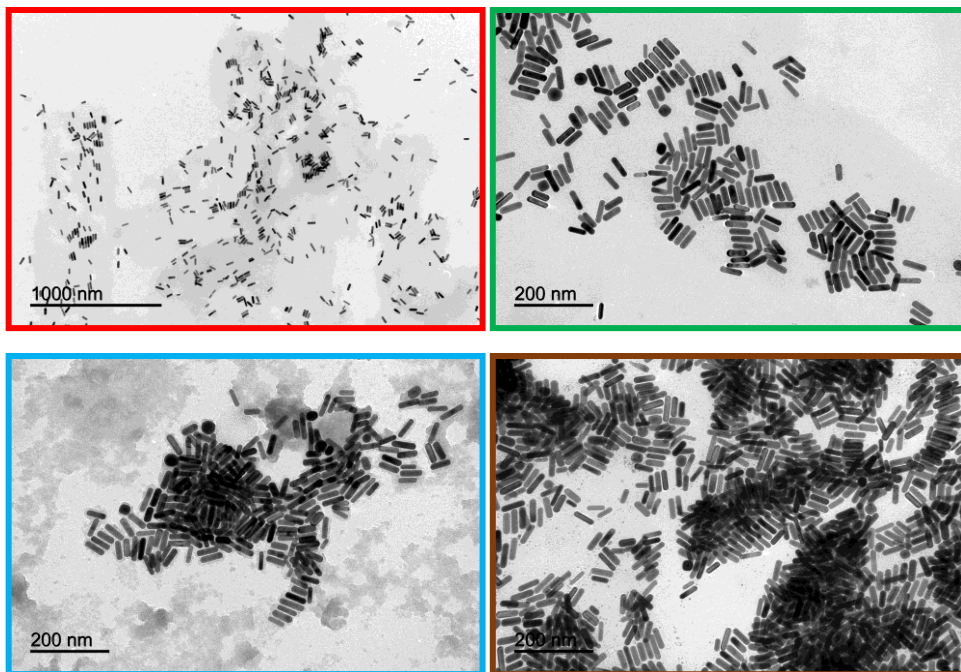


Figura 25. Micrografías de MHA-AuNRs depositadas desde disoluciones a diferentes pH: 11.8, 8.5, 7.5 y 3.3.

En efecto, las micrografías obtenidas (Figura 25) muestran los fenómenos descritos, encontrándose un ensamblaje fundamentalmente *side-by-side* que forma agregados de mayor tamaño conforme disminuye el pH. Este resultado es algo sorprendente si se compara con el obtenido con MUA-AuNRs. Cabe pensar que este comportamiento distinto se debe a una organización diferente de la monocapa autoensamblada formada sobre la superficie.

4.3.9. Interacción de AuNRs con la proteína Hemoglobina. Caracterización mediante espectroscopia UV-visible-NIR.

Las proteínas hémicas se identifican a partir de sus bandas características en los espectros UV-visible (bandas δ , Soret, Q_0 y Q_1). Los detalles espectrales dependen del estado de oxidación, los sustituyentes periféricos, ligandos axiales, estado de coordinación, estado de espín y aminoácidos próximos al átomo de hierro.

En esta sección se describe el estudio de la formación, caracterización y estabilidad de los Nanobioconjugados formados entre los AuNRs y la proteína Hb. Las propiedades de la proteína Hb han sido ya descritas en el Capítulo 3. Para formar el bioconjugado se mezclan cantidades diferentes de AuNRs y proteína y se estudian los cambios en el espectro UV-visible-NIR. En la Figura 26 se muestran los espectros obtenidos al añadir diferentes concentraciones de Hb a una disolución de concentración fija de CTAB-AuNRs. En los espectros se observan los picos correspondientes tanto a los AuNRs como a la proteína, no produciéndose cambios significativos en las longitudes de onda de los mismos, indicando que no se producen cambios en la conformación de la proteína ni agregación de los AuNRs. Sin embargo, se observa un pequeño cambio en la longitud de onda de la banda longitudinal por 3-4 nm hacia el azul, cuando la concentración de Hb está por encima de 2 μ M, lo que sería debido a los cambios en la constante dieléctrica del medio que rodea al NR.

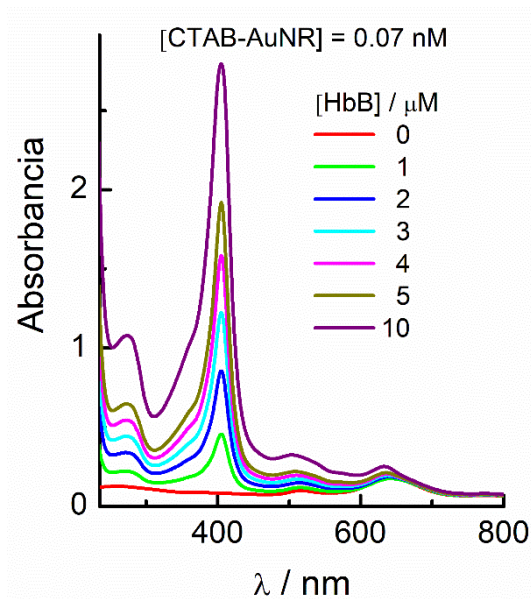


Figura 26. Espectros UV-visible-NIR de CTAB-AuNRs en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Hb.

Para estudiar los cambios que pueden producirse en el bioconjugado en función del pH, se prepara el bioconjugado en tampón fosfato 10 mM a pH 7 y se realiza una valoración cambiando el pH por adición de NaOH o HCl. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 27. El bioconjugado se forma en medio neutro para, de esta manera, evitar la posible desnaturalización de la proteína en medio ácido o alcalino, hecho que pudiera alterar las condiciones del experimento.

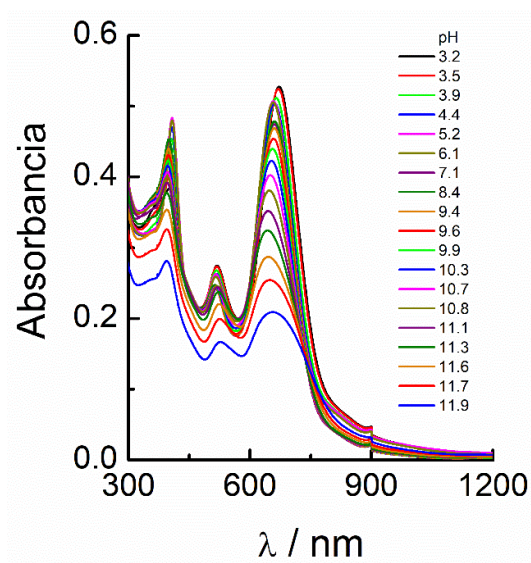


Figura 27. Espectros UV-Visible-NIR de CTAB-AuNR-Hb a diferentes pH. [CTAB-AuNRs] = 0.07 nM; [Hb] = 2 μM .

Cuando el pH cambia hacia medio ácido o alcalino, partiendo de medio neutro, no se producen cambios importantes en el intervalo $5 < \text{pH} < 10$. En cambio, al disminuir el pH por debajo de 5, se observa un desplazamiento de la banda longitudinal hacia el rojo mientras que la absorbancia no cambia. En el otro extremo, al aumentar el pH por encima de 10, se produce una disminución de la longitud de onda de la banda longitudinal a la vez que disminuye la absorbancia. Este cambio se produce en paralelo con el desplazamiento de la banda Soret hacia valores propios de la proteína desnaturada (396 nm). Asimismo, se produce una disminución de la absorbancia de esta banda, lo que está de acuerdo con lo que ocurre en la proteína en ausencia de los AuNRs.

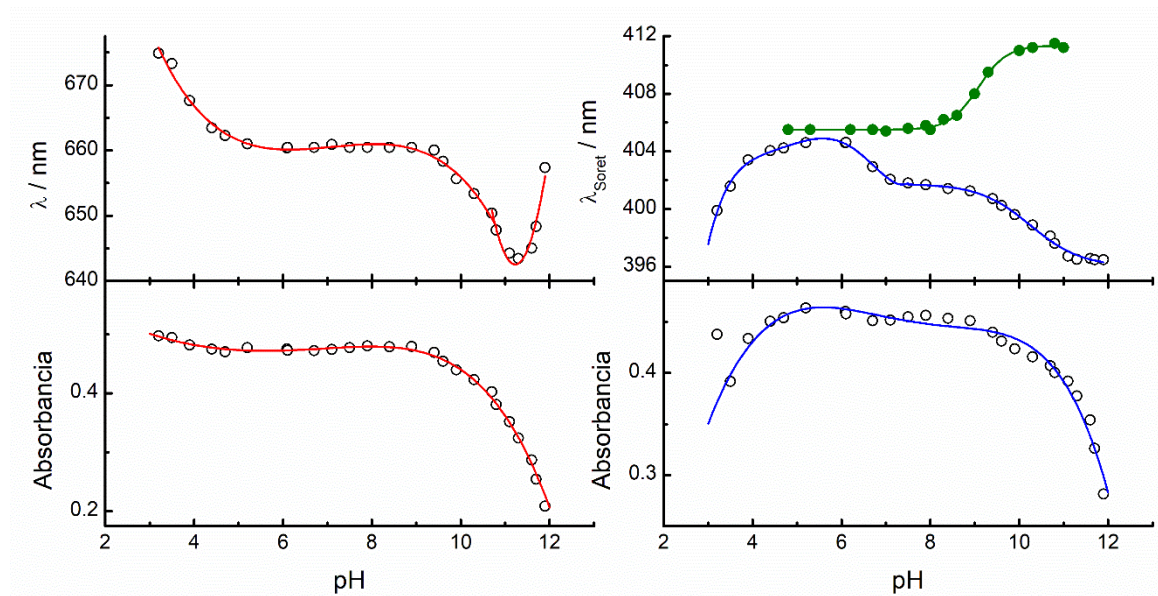


Figura 28. Evolución de la longitud de onda y absorbancias de las bandas longitudinal y Soret en función del pH. Los resultados en verde corresponden a Hb libre.

Comparando con el comportamiento de los CTAB-AuNRs en ausencia de Hb se observa que, en medio ácido, la presencia de la proteína induce un cambio de la banda longitudinal hacia el rojo que no se producía en su ausencia. Este cambio se produce sin pérdida de absorbancia lo que indica la posibilidad de una pequeña tendencia al ensamblaje *end-to-end* bajo estas condiciones. En la región de pH alcalino, los cambios que se observan son del mismo orden que los obtenidos en ausencia de proteína lo que indica que la presencia de ésta no proporciona estabilidad adicional a los AuNRs. Esto

puede explicarse por la desorción de la proteína o bien porque al cambiar su conformación no produzca la estabilización que se espera para el nanobioconjugado.

La banda Soret mantiene un valor similar (~404 nm) que el de la Hb libre en el intervalo de estabilidad de pH y disminuye a pH ácido, al igual que la proteína libre. Sin embargo, a pH alcalino, la banda Soret está desplazada al azul, al contrario que la especie libre que lo hace hacia el rojo llegando a alcanzar un valor de 411 nm. De esta manera, la formación de la especie hemicromo se evita en presencia de los CTAB-AuNRs. Este cambio de 405 nm a 411 nm para la banda Soret se ha descrito en la bibliografía para Hb en presencia de concentraciones de CTAB más bajas que la concentración micelar crítica (cmc) y se acompaña de la disminución de la banda de 630 nm y el aumento de la de 537 nm. Dichas bandas Q de Hb pueden proporcionar información valiosa sobre el cambio de la conformación de Hb. Se concluyó que estos cambios estaban causados por la interacción del monómero de CTAB con la Hb.⁶⁹ Las bandas a 411 nm y 537 nm se consideran características del hemicromo.⁷⁰ Se ha informado que el CTAB puede inducir a Met-Hb a convertirse en hemicromo. Como se ha indicado, la Hb consta de dos subunidades α y dos β y cada una posee un grupo hemo ubicado en la cavidad hidrofóbica. El ion Fe (III) en el hemo se coordina con cuatro átomos de N en la porfirina y la histidina proximal en la cadena peptídica. El sexto ligando del ion Fe (III) es H₂O o el ion OH⁻.⁷¹ La aparición de los picos de absorción para el hemicromo (411 y 537 nm) y la desaparición de los de Hb (405 y 630 nm) muestran que el monómero de CTAB cambia el microambiente alrededor del grupo hemo e induce a la His distal a reemplazar el H₂O o el ion OH, es decir, que es el sexto ligando de Fe (III).

Kaca et al.⁷⁰ estudiaron la interacción de los ácidos grasos libres con la Hb y concluyeron que la cadena hidrofóbica larga en los ácidos grasos puede convertir oxi-Hb en Met-Hb y hemicromo simplemente por la interacción hidrofóbica entre el ácido graso y la Hb. Sin embargo, cuando la concentración de CTAB es mayor que la CMC, la banda Soret de la Hb se desplaza de 411 a 405 nm, mientras que los picos de absorción a 537 y 565 nm desaparecen, y se observa una nueva banda a 600 nm característica del monómero de Hb, por lo tanto, la micela de CTAB puede inducir la liberación del hemo desde la cavidad hidrofóbica de Hb.⁷² A partir de estos resultados, puede concluirse que el exceso de CTAB, al menos en cantidades superiores a su cmc, provoca la

desnaturalización de la proteína y, probablemente, la salida del grupo hemo de la cavidad hidrofóbica, produciendo el cambio de la banda Soret hacia el azul. Estos cambios tienen una dependencia con el pH que indicarían que solo en la región de pH neutro, se podría obtener un bioconjugado con proteína nativa adsorbida.

En el caso de la formación del nanobioconjugado a partir de MUA-AuNRs, se obtienen los espectros UV-visible que se recogen en la Figura 29 en presencia de diferentes concentraciones de Hb. En una primera aproximación, el comportamiento observado es similar al de los CTAB-AuNR. Sin embargo, existe una diferencia importante en la banda Soret que ahora se encuentra a 411 nm.

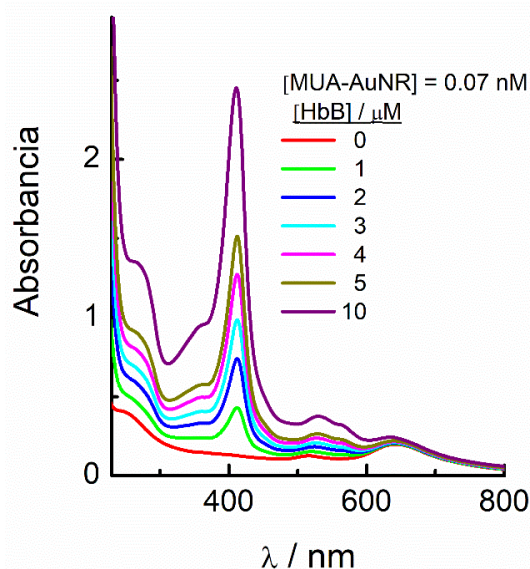


Figura 29. Espectros UV-Visible de los bioconjugados formados con las nanovarillas de oro cubiertas por MUA y concentraciones crecientes de Hb.

Además del cambio en la banda Soret a 411 nm se observa que aparecen algunos nuevos detalles en los espectros en comparación con el CTAB-AuNR-Hb. Con el fin de eliminar la influencia de la Hb, se llevan a cabo espectros de diferencia (Figura 30), que se realizan poniendo en la cubeta de referencia la misma cantidad de Hb que en el bioconjugado o bien restando el espectro de Hb libre del del bioconjugado.

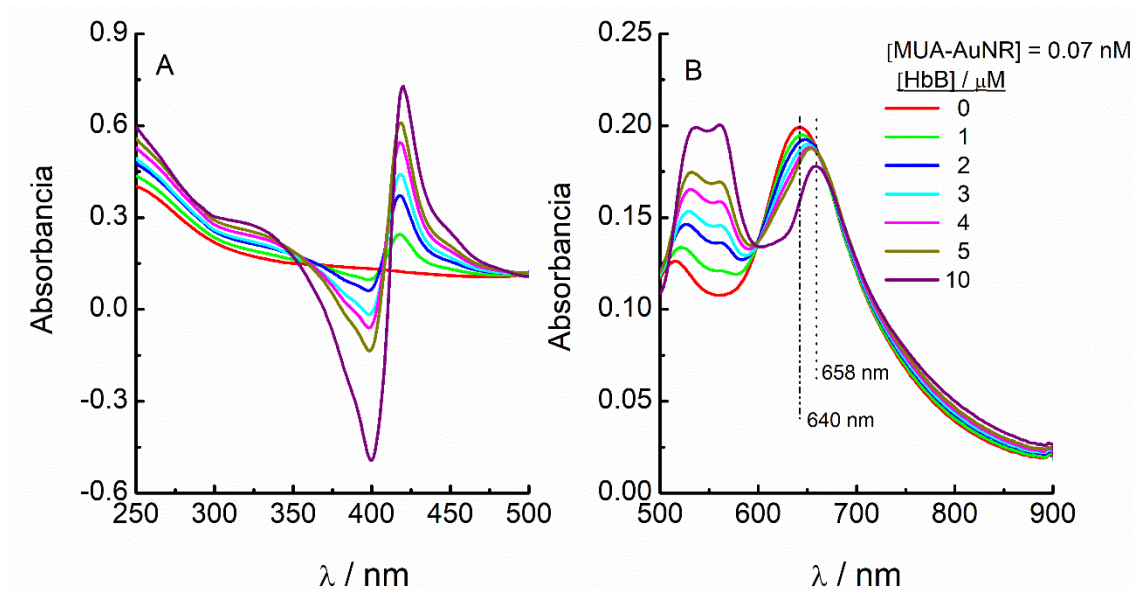


Figura 30. Espectros de diferencia UV-Visible de los bioconjugados MUA-AUNR-Hb a concentraciones crecientes de Hb. A) Región de la banda Soret (B) Región de las bandas LSPR.

En primer lugar, el cambio de longitud de onda en la banda Soret junto con el aumento de la absorbancia se reflejan en el intervalo de 350-450 nm. Esto se demuestra por las bandas positivas y negativas, donde las positivas se ubican en longitudes de onda más largas. En segundo lugar, la banda de plasmón longitudinal se desplaza a valores más altos, desde 640 nm en ausencia de Hb a 658 nm en presencia de 10 μM de Hb. Como se puede observar, este desplazamiento es linealmente dependiente de la concentración de Hb. Esta característica se puede interpretar como el recubrimiento de los MUA-AuNRs por capas de proteína que cambian la constante dieléctrica de la capa que rodea al MUA-AuNR.¹

En tercer lugar, dos bandas a 537 y 560 nm aparecen en el intervalo de longitud de onda correspondiente a las bandas Q. Estas bandas están, de alguna manera, superpuestas con la banda de plasmón transversal a 515 nm, pero como puede observarse en la Figura 30B, su absorbancia es mucho mayor. Por lo tanto, se puede decir que estas bandas aparecen tras la interacción de la Hb con MUA-AuNR y, deben estar adscritas a algún cambio conformacional en la proteína, en particular, en el entorno cercano a los grupos hemo.

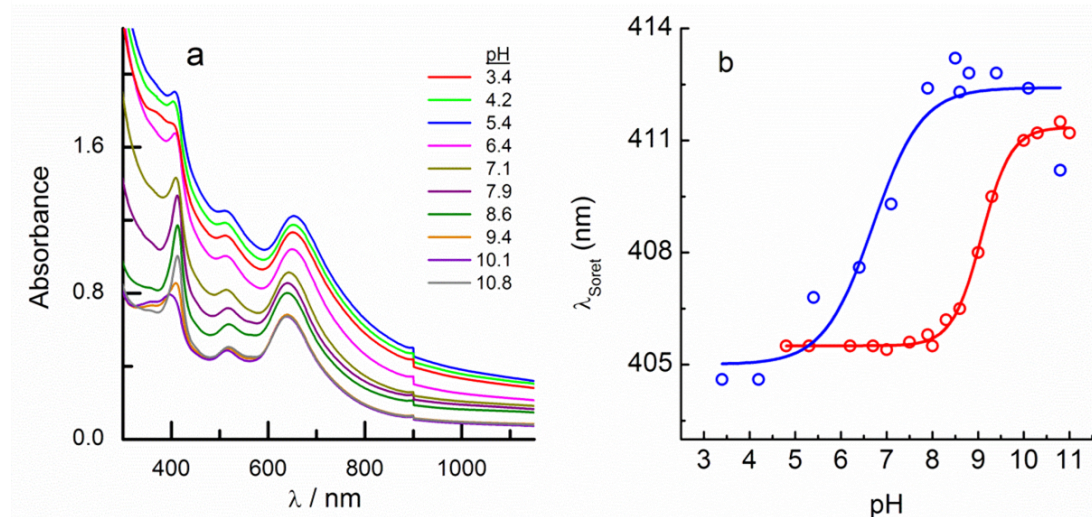


Figura 31. (a) Espectros UV-Visibles del bioconjugado Hb-MUA-AuNR a diferentes pH. (b) Evolución de la λ_{\max} de la banda Soret en función del pH (—) y de la proteína libre (—).

En el caso del bioconjugado MUA-AuNR-Hb, el comportamiento en función del pH es algo diferente comparado con el del bioconjugado con CTAB. En primer lugar, el fenómeno de agregación está ausente en todo el intervalo de pH estudiado (Figura 31).

Al igual que en el caso de la estabilidad de MUA-AuNR, aparecen algunos signos de scattering, pero en menor medida. La variación de la banda de Soret es similar a la observada para la proteína libre, aunque la variación de la longitud de onda que define a la conformación de hemicromo ocurre adelantada en dos unidades de pH. Parece probable, entonces, que la interacción con MUA-AuNRs provoque la formación de la especie hemicromo en una mayor extensión. La banda de plasmón longitudinal cambia a mayores longitudes de onda al disminuir el pH y este cambio ocurre en paralelo con un aumento de absorbancia (Figura 32). Ambos cambios siguen una variación sigmoideal con una inflexión próxima al pI de la proteína Hb.

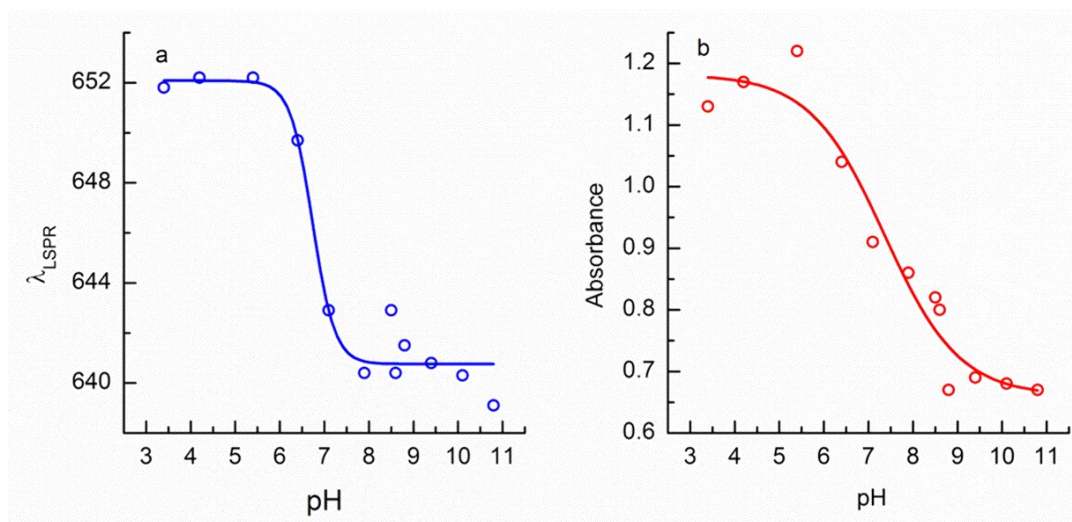


Figura 32. Evolución de la λ_{LSPR} de la banda longitudinal (a) y su absorbancia (b) frente al pH.

Es interesante destacar que los puntos medios de las transiciones que involucran tanto a la banda de Soret como a los de la banda LSPR longitudinal se encuentran cercanos a pH 7. De aquí que los cambios podrían explicar la existencia de dos tipos de bioconjugados correspondientes a medio ácido y alcalino, probablemente dependiendo del estado de ionización de los grupos terminales carboxílicos de las moléculas de MUA unidas a la superficie de AuNR.

4.3.10. Caracterización de los bioconjugados mediante espectroscopia Raman.

La caracterización de los bioconjugados AuNRs-Hb mediante espectroscopia Raman pueden involucrar los fenómenos de resonancia y SERS. Así, cuando los espectros Raman se obtienen por excitación a una frecuencia que coincide con las bandas de absorción permitidas del cromóforo, se espera que los modos vibracionales muestren un aumento de intensidad en las bandas que tienen origen en los mismos modos electrónicos que han servido para su excitación. Se dice que los modos resultantes son activos vibrónicamente. Estos modos pueden ser de dos tipos, A y B, en referencia a si conectan los estados fundamental y excitado a través de solapamiento Franck-Condon, cambiando la energía del estado resonante, o si mezclan la transición electrónica resonante con otra de energía más alta, respectivamente. La transición electrónica de energía más alta se asigna a la banda Soret que se observa en torno a 400 nm. La

transición de más baja energía se asigna a la banda Q y se observa en torno a 550 nm y es un orden de magnitud más débil que la Soret.

Se ha visto que los espectros Raman de proteínas hémicas muestran un conjunto de bandas que están en resonancia con las bandas mencionadas y éstos se han aplicado extensamente al estudio de la estructura, función, plegamiento y dinámica de las mismas. En la Figura 33 se recogen espectros RR realizados para la proteína Hb libre y formando los bioconjugados con CTAB- y MUA-AuNRs. Los espectros se han realizado por excitación a 532 nm, de manera que se excitan las transiciones correspondientes a las bandas de la porfirina, pudiendo producirse el efecto RR y, en parte, a las bandas LSPR de los AuNRs, con el consiguiente aumento en la intensidad debido al efecto SERS. Bajo estas condiciones se habla de efecto SERRS involucrando ambos procesos.

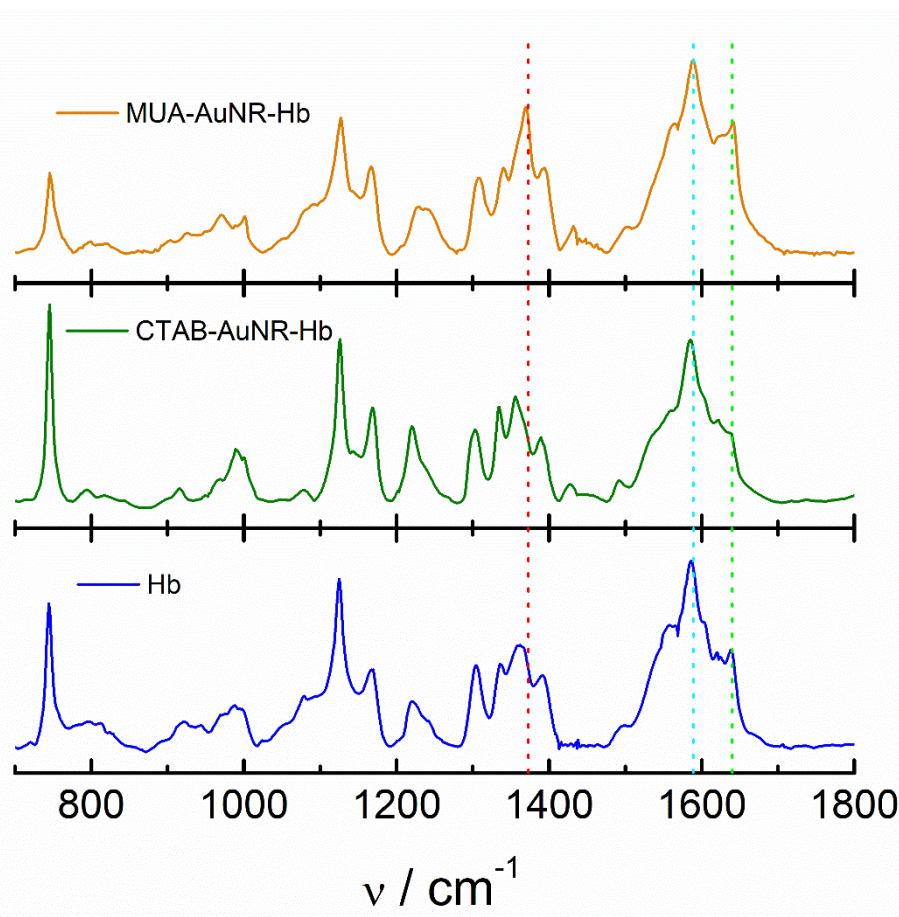


Figura 33. Espectros RR y SERRS. Las líneas verticales punteadas señalan las bandas marcadoras del estado de oxidación (—), estado de espín (—) y estados de oxidación y espín (—).

Como se observa en la Figura 33 todos los espectros muestran abundancia de bandas que, como se recoge en la Tabla 4 se pueden asignar a los diferentes grupos del anillo de porfirina.^{73, 74}

Tabla 4. Asignación de bandas Raman de Hb, CTAB- y MUA-AuNR-Hb.

Hb	CTAB-NR-HB	MUA-NR-Hb	Asignación	
671	672		δ (pirrol deformación) _{sim}	ν_7
741	745	746	$\nu(C_{\alpha}-C_{\beta})_{sim}$	ν_{15}
918	916	964	$\gamma(=C_bH_2)_{sim}$	
988	993	1000	$\gamma(C_aH=)$	
1078			$\delta(=C_bH_2)_{asim}$	ν_{23}
1122	1122	1126	$\nu(C_{\alpha}-C_{\beta})_{sym} + \nu(Fe-N)$	$\nu_6 + \nu_8$
1165	1165	1165	$\nu(\text{pirrol medio anillo})_{asim}$	ν_{30}
1220	1219	1234	prop CH2 twisting	
1301	1300	1307	$\delta(C_mH)]$, $\delta(C_aH=)$	ν_{21}
1333	1331	1340	$\nu(\text{pirrol medio anillo})_{sym}$	ν_{41}
1359 (deoxiHb II)	1357 (deoxiHb II)	1372 (MHb III)	$\nu(\text{pirrol medio anillo})_{sim}$	ν_4 (ferric) / ν_4 (ferrous)
1391	1388	1391	$\nu(\text{pirrol cuarto de anillo})$	ν_{29}
1554		1562	$\nu(C_{\beta}C_{\beta})$	ν_{11}
1586 (Is)	1585 (Is)	1588(Is)	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{as}$	ν_{37}
1639		1640	$\nu(C_{\alpha}C_m)_{as}$	ν_{10}

Las vibraciones de porfirina incluyen las bandas marcadoras del estado de oxidación a 1378 y 1355 cm^{-1} para hemos férricos y ferrosos, respectivamente, además de otros modos de esqueleto como son las de 1639, 1554, 1391, 1301 y 671 cm^{-1} . Las bandas marcadoras de oxidación aparecen en el espectro de Hb a 1359 cm^{-1} indicando que se encuentra en estado de Hb(FeII) y algo similar ocurre en el caso del bioconjugado CTAB-

AuNR-Hb. Sin embargo, el espectro de MUA-AuNR-Hb muestra un desplazamiento de esta banda hacia 1372 cm^{-1} , lo que indica que se encuentra en estado Hb(FeIII). Por otra parte, la banda a 1562 cm^{-1} se ha asignado también al estado oxidado, observándose un desplazamiento hacia valores más bajos de energía para el estado reducido. No obstante, esta banda es menos útil como marcador de estado de oxidación ya que se encuentra solapada con otra cercana a 1555 cm^{-1} en el caso de los derivados protohemo, como el que posee la Hb.⁷⁵

Las bandas marcadoras del estado de spin son las bandas a 1555 y 1585 cm^{-1} , siendo ésta última la que se asigna al estado de bajo espín (LS) que es la que se observa en todos los casos en los espectros. Por último, las bandas a 1500 y 1640 cm^{-1} son sensibles tanto al estado de oxidación como al estado de espín, aunque con mucha menos precisión que las anteriores. A partir de este análisis se puede concluir que la Hb libre y formando el bioconjugado con los CTAB-AuNRs se encuentra en estado reducido (probablemente deoxi-Hb) y cuando forma el bioconjugado con los MUA-AuNRs se oxidaría estando en ambos casos en estado de LS.

4.3.11. Estudio de la transferencia electrónica de los bioconjugados CTAB- y MUA-AuNR-Hb.

Como se ha comentado en los Capítulos 3 y 4, la presencia del grupo hemo en Hb, permite llevar a cabo una caracterización electroquímica del bioconjugado. En este sentido, parece interesante estudiar la posible influencia de la forma del nanomaterial en la respuesta electroquímica de estos sistemas.

Se ha seguido una estrategia experimental similar a la descrita para las AuNPs, formando el bioconjugado previamente a la deposición sobre el electrodo. Bajo estas condiciones experimentales se obtiene una respuesta electroquímica que está ausente en el caso de la deposición de proteína libre en ausencia de AuNRs. Las señales obtenidas se recogen en la Figura 34 para los bioconjugados formados con CTAB- y MUA-AuNR-Hb.

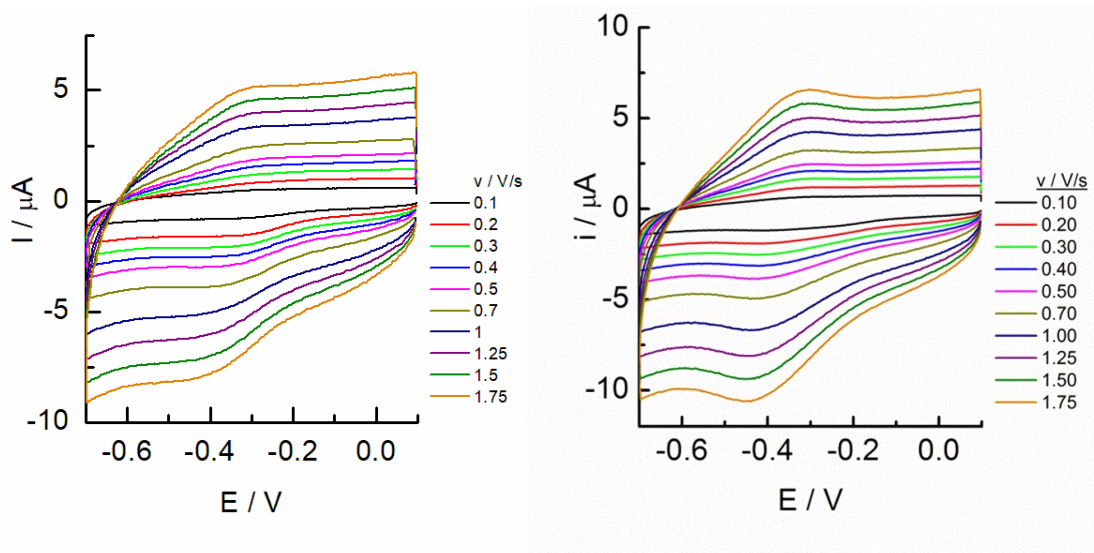


Figura 34. VCs de los bioconjugados CTAB- (izquierda) y MUA-AuNR-Hb (derecha) a diferentes velocidades de barrido.

Debido a la baja concentración de los AuNRs en disolución, la cantidad de bioconjugado que puede añadirse es pequeña. Esto hace que la forma de los VCs muestre una importante corriente de carga que hace difícil la detección de los picos. Se ha llevado a cabo la sustracción de la corriente de carga para la traza catódica y los resultados se recogen en la Figura 35. En el caso de la traza anódica, la línea base de la corriente que marca el fondo presenta cierta inclinación lo que no permite realizar esta operación de una forma apropiada.

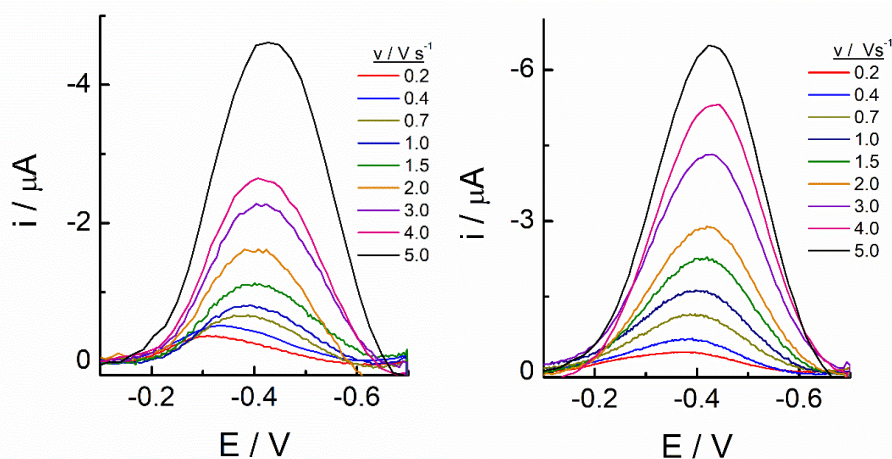


Figura 35. Señales voltamperométricas de la corriente catódica después de restar el fondo en los VCs de los bioconjugados CTAB- (izquierda) y MUA-AuNR-Hb (derecha) a diferentes velocidades de barrido.

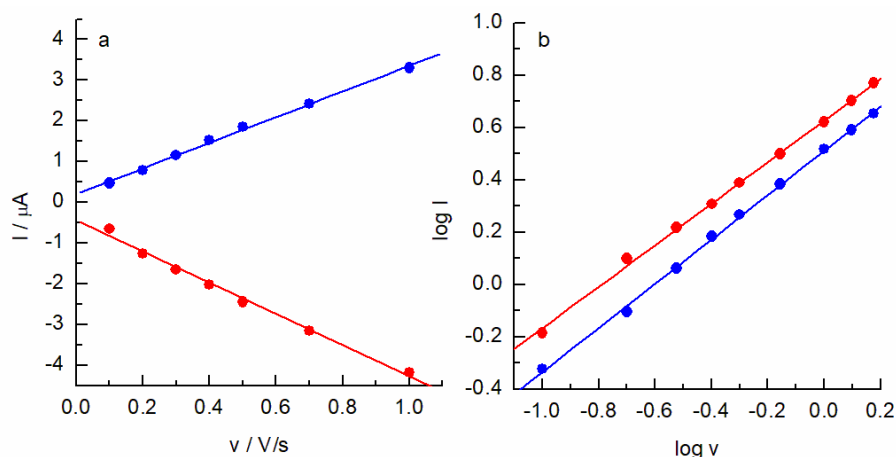


Figura 36. (a) Representación de la intensidad de los picos catódico y anódico frente a la velocidad de barrido (v) para el bioconjugado CTAB-AuNR-Hb. (b) Representación logarítmica.

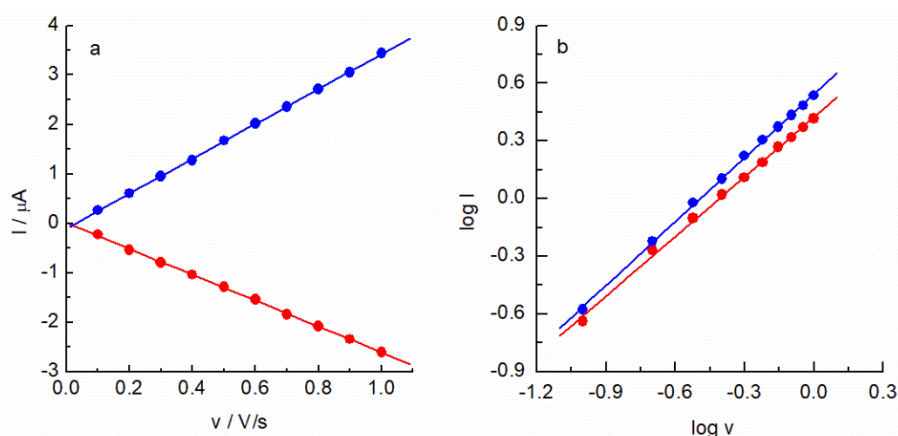


Figura 37. (a) Representación de la intensidad de los picos catódico y anódico frente a la velocidad de barrido (v) para el bioconjugado MUA-AuNR-Hb. (b) Representación logarítmica.

Se ha llevado a cabo un análisis del proceso electroquímico para evaluar las características de los picos catódico y anódico que, como se observan en las Figuras 36 y 37, muestran las características típicas de procesos confinados en la superficie, obteniéndose valores de $\partial \log I / \partial \log v$ muy próximas a la unidad. Además, la corriente de pico varía linealmente con la velocidad de barrido siguiendo el comportamiento dado por la ecuación (1) (Capítulo 3).⁷⁶

En este tipo de sistemas, la carga involucrada en el proceso de transferencia electrónica se puede determinar a partir de la integración de los picos de los CVs (Figura 35), una vez que se resta la corriente del fondo. Las cargas del pico catódico

determinadas junto con los valores de la anchura a la mitad de la altura se han representado en función de la velocidad de barrido en la Figura 38.

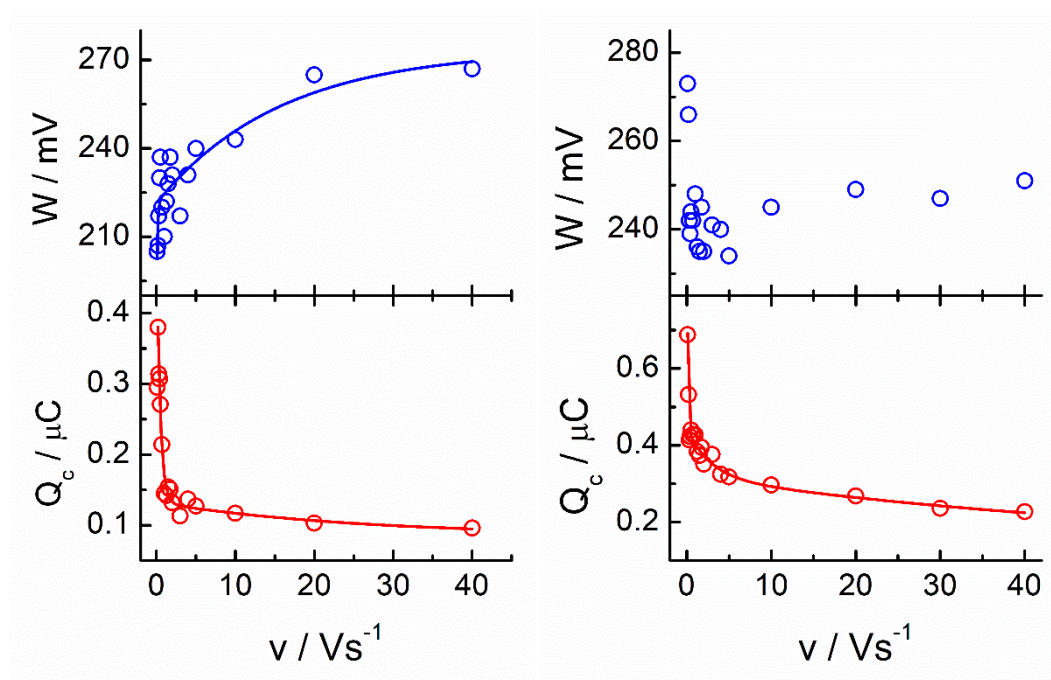


Figura 38. Representación de la anchura a la mitad de la altura (W) y la carga involucrada en el proceso catódico (Q_c) de las curvas voltamperométricas representadas en la Figura 34 para los bioconjugados CTAB- (izquierda) y MUA-AuNR-Hb (derecha) en función de la velocidad de barrido.

Los resultados del análisis, de nuevo, merecen algunos comentarios. En primer lugar, hay que tener en cuenta que el proceso es mono-electrónico, lo que para un sistema redox confinado en la superficie de un electrodo y que presente características reversibles, debe mostrar un valor de W próximo a $3.53 \cdot RT/nF$ (90.6 mV a 25 °C).

Aunque este comportamiento ideal es el que se desea para poder determinar algunos parámetros del sistema, esto se observa raras veces en los sistemas estudiados. Como se ha explicado en el Capítulo 3, la separación de la idealidad se ha explicado como consecuencia de la existencia de interacciones laterales entre especies electroactivas o por la existencia de una distribución espacial de centros redox en multicapas⁷⁷ y la presencia de sitios electroactivos no equivalentes.⁷⁸ Se ha considerado también el efecto de doble capa que puede tener lugar en el caso de que la caída de potencial no

tenga lugar dentro de la película de baja permitividad entre el electrodo y el plano redox. Por otra parte, se ha identificado una fuente de ensanchamiento de picos como consecuencia de una población heterogénea de proteínas adsorbidas debida a la falta de uniformidad en los microentornos de adsorción a través de la superficie, que puede dar lugar a una distribución de estados redox.⁷⁹⁻⁸¹ Los modelos electrostáticos iniciales de la distribución de potencial interfacial asumen que los centros redox están todos localizados en el mismo plano a una distancia dada desde la superficie del electrodo. Sin embargo, este no es siempre el caso. Así, cuando los centros redox se esparcen en una lámina tridimensional se obtienen voltamperogramas más anchos y asimétricos que reflejan una conversión redox *layer-by-layer*.⁸²

En el presente caso, la anchura de los picos sobrepasa con mucho el valor teórico esperado de 90.6 mV (Figura 38). La falta de idealidad en el sistema bajo estudio debe venir provocado por la presencia de diferentes microentornos en los nanomateriales que se encuentran rodeados de proteína Hb y que a su vez se encuentran empaquetados al depositarse sobre la superficie del electrodo, junto con el hecho de que la propia proteína Hb es un tetrámero que contiene 4 unidades (2 α y 2 β) y cada una de ellas incluye un grupo hemo que es la especie electroactiva.

Por otra parte, puede observarse (Figura 38) que la carga involucrada en el proceso catódico disminuye conforme aumenta la velocidad de barrido, encontrándose en ambos casos un comportamiento similar; se obtiene una disminución drástica de la carga a bajas velocidades de barrido y, por encima de 2 a 3 V/s se hace constante. Este comportamiento se ha explicado que se debe a la presencia de multicapas de proteínas adsorbidas en la superficie del electrodo y que, solo a bajas velocidades, pueden experimentar el proceso redox. Sin embargo, cuando se aumenta la velocidad de barrido, la densidad de carga disminuye hasta que se alcanza un valor constante, evidenciando que solo se produce el intercambio electrónico con la capa de proteína más próxima a la superficie del electrodo.⁸¹

Además de la forma de la curva de caída de la carga en función de la velocidad de barrido, que es más abrupta en el caso del bioconjugado formado con CTAB-AuNRs, se observa también que en este caso la carga máxima obtenida es menor que en el caso del bioconjugado MUA-AuNR-HB, aproximadamente 50 %. Hay que resaltar que la

cantidad de bioconjugado añadido en ambos casos es idéntica, por lo que la única diferencia en estos experimentos es la naturaleza de la capa protectora del AuNR. Por otra parte, la disminución de carga con respecto a la inicial es del 65 % en ambos casos. Si se realiza un balance de materia, teniendo en cuenta el número de AuNRs añadidos, el área superficial de los AuNRs y la cantidad de moléculas de Hb que pueden adsorberse en cada capa (se tiene en cuenta el aumento de área provocada por cada capa adicional de proteína, dando un número de moléculas de Hb de 55, 145, 270, 410, 610 y 840 para un ensamblaje compacto en las 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª y 6ª capa, respectivamente), se obtiene que en el caso de MUA-AuNR-Hb, el sistema es capaz de testear hasta la 6ª capa de proteínas, asumiendo que cada proteína intercambia 4 electrones. Al aumentar la velocidad de barrido y obtenerse el valor de carga constante, el equivalente de carga obtenido correspondería a las 4 primeras capas de proteína activa. En el caso del bioconjugado CTAB-AuNR-Hb, el sistema permitiría sensar las primeras 4 a 5 capas bajo condiciones de baja velocidad llegando a medir solo las 3 capas más próximas, a alta velocidad de barrido. Este balance implica un alto grado de actividad electroquímica de los bioconjugados formados con AuNRs, independientemente de la capa protectora.

La escala de tiempo que se requiere para cambiar el estado de oxidación de una especie redox confinada en la superficie involucra dos mecanismos complementarios. Por una parte, el mecanismo de transferencia de carga involucra la transferencia electrónica directa entre el electrodo y el sitio redox localizado a una distancia a la que, probablemente, debe actuar el efecto túnel. Por otra parte, la propagación de la reacción redox dentro de la película y más allá de la distancia túnel desde el electrodo requiere el intercambio de electrones entre sitios vecinos. Este proceso, conocido como transporte de carga, es de naturaleza difusiva y está asistido por los movimientos segmentales de la película polimérica y facilita que los sitios redox vecinos se acerquen lo suficiente como para que se produzca un evento de “*electron hopping*”.⁸³ Las velocidades de transporte y transferencia de carga y su dependencia con las variables experimentales se han estudiado y se ha encontrado que los resultados obtenidos en películas organizadas aleatoriamente no pueden extrapolarse al caso de multicapas ordenadas que exhiben la capacidad de controlar la naturaleza y la carga de las capas. El modelo de Laviron^{77, 84} trata centros redox localizados en planos bien definidos,

mientras que los casos reales tienen una distribución más homogénea. Un modelo más reciente⁸³ permite que el potencial varíe con la distancia del centro redox a la superficie del electrodo. La diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción (ΔE) a bajas velocidades de barrido aumenta al disminuir el coeficiente de difusión aparente D_{ap} . Este efecto se asocia con las limitaciones en el transporte de carga. En este caso, ΔE alcanza un valor constante a unos 58 mV, muy cerca del valor esperado para un sistema controlado por difusión. El modelo de Laviron que considera sitios redox localizados en planos paralelos al electrodo, predice una disminución de este valor al aumentar v . Esto ocurre cuando la difusión puede penetrar solo el primer plano y, por tanto, se restaura el comportamiento de capa delgada. Cuando la transferencia de carga es más lenta que el transporte de carga, el primer proceso enmascara la separación de picos y no permite observar el fenómeno difusivo.

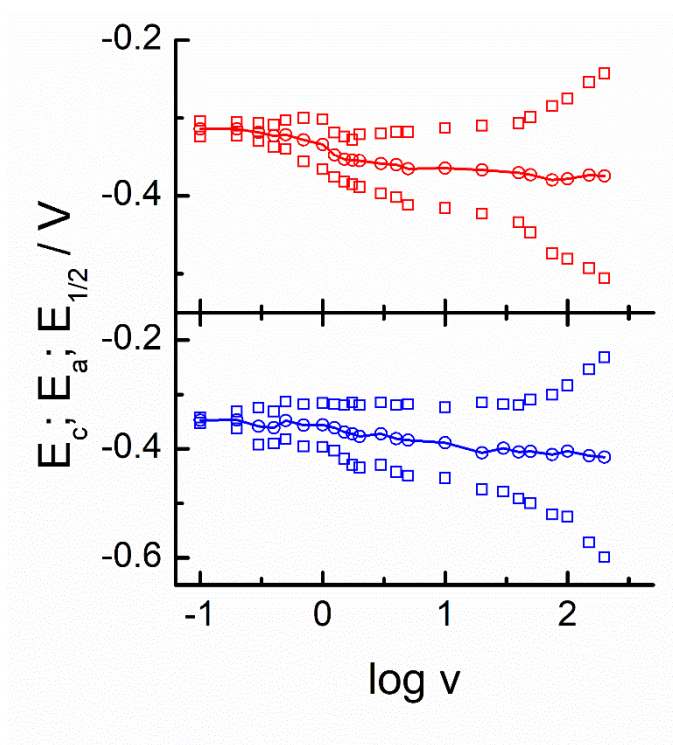


Figura 39. Variaciones de los potenciales de pico, E_c , E_a y del potencial de onda media, ($E_{1/2}$), en función del logaritmo de la velocidad de barrido. (—) CTAB- y (—) MUA-AuNR-HB.

La variación de los potenciales de pico con v significa que el comportamiento no es ideal. Se puede explicar asumiendo una distribución de entornos químicos (y de esta forma, una distribución de valores de E) en la dirección normal al electrodo. Esta

suposición está basada en el hecho de que, en el límite de baja velocidad de barrido, la técnica de voltamperometría sondea los sitios redox y, por tanto, da un potencial de pico que es el promedio de todos los valores de la película. En el límite de alta velocidad, solo se sondean los sitios adyacentes al electrodo y como consecuencia solo contribuyen los valores de E de esos sitios al potencial promedio. En la Figura 39 se muestran las variaciones de potencial obtenidas en el estudio con la velocidad de barrido (Figura 34). Como puede observarse, la variación de E_p en cada caso muestra un comportamiento errático al igual que la propia variación de $E_{1/2}$.

El método general de Laviron⁸⁵ para determinar la constante de transferencia de carga, k , de especies adsorbidas en un electrodo está basado en la aproximación de Butler-Volmer y usa los potenciales obtenidos en función de la velocidad de barrido. Este método se basa en la determinación del coeficiente de transferencia, α , que es una medida de la simetría de la barrera de energía para la reacción redox. En el caso ideal, $\alpha = 0.5$, para todos los sobrepotenciales aunque también hay casos en que se desvía de este valor. Por tanto, la determinación de α es crucial para poder determinar k . Así, a partir de la representación de E_p vs. $\log v$, se obtienen dos ramas que parecen guardar cierta simetría con respecto a los valores de los potenciales promedio (Figura 39). Para llevar a cabo las determinaciones, se realiza la sustracción de estos potenciales promedio a los potenciales para cada pico. Los resultados se recogen en la Figura 40. Como puede observarse, incluso a las más bajas velocidades de barrido estudiadas, se observa una cierta separación entre los picos anódico y catódico, que empieza a hacerse mayor al aumentar la velocidad. Este comportamiento estaría de acuerdo con el fenómeno de transporte de carga antes mencionado y que se ajustaría al modelo derivado por Calvo y col.⁸³ Bajo estas condiciones, se puede determinar tanto el valor de α como de k , a partir del método de Laviron.^{77,84}

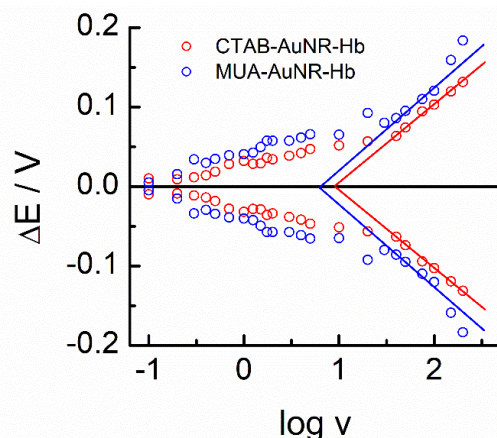


Figura 40. Variación de los potenciales de pico anódico y catódico, una vez que se ha sustraído el valor de $E_{1/2}$, en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

A altas velocidades, se observa que los valores de E_p varían linealmente con $\log v$ y, como estas ramas alcanzan valores de $\Delta E > 200$ mV, se pueden usar las ecuaciones apropiadas⁸⁶ para determinar los parámetros α y k .

Teniendo en cuenta las ecuaciones (4-6) (Capítulo 3), que relacionan los cambios en E_p con $\log v$ y que permiten α y k , se obtienen valores de α de 0.6 y 0.47 para CTAB- y MUA-AuNR-Hb, respectivamente, que están próximos al valor teórico para el caso de picos voltamperométricos simétricos que es de 0.5. A partir de este análisis se obtienen valores de k de 227 y 115 s^{-1} para los Nanobioconjugados CTAB- y MUA-AuNR-Hb, respectivamente. Estos valores son del orden de los encontrados con AuNPs descritos en el Capítulo 3.

Por último, se ha ensayado la actividad peroxidasa de los aductos. Para ello, se ha llevado a cabo el estudio de la actividad electrocatalítica de los nanobioconjugados formados frente a la reducción de H_2O_2 . Para ello, se parte de la misma estrategia usada para los estudios electroquímicos comentados más arriba. Una vez depositado el nanobioconjugado sobre el electrodo de grafito, se registra una curva VC en ausencia de H_2O_2 . A continuación se añaden alícuotas de este reactivo y se miden los VCs obteniéndose el comportamiento que se muestra en la Figura 41.

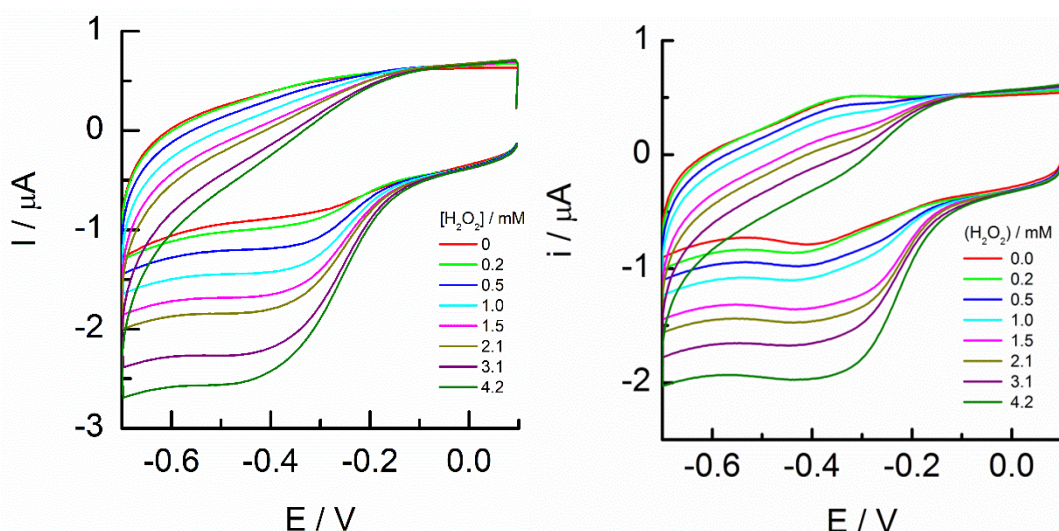


Figura 41. VCs de los Nanobioconjugados CTAB- (izquierda) y MUA-AuNR-Hb (derecha) en disolución de tampón PBS 0.1M a pH 7 en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂. V = 100 mV/s.

Como puede observarse en la Figura 41, el pico de reducción a -0,4 V aumenta con la adición de H₂O₂ mientras que el pico de oxidación disminuye hasta desaparecer. De nuevo, el comportamiento observado se puede explicar según el esquema de reacciones (a) – (e) descritos en el Capítulo 3.

Se determina que la sensibilidad de este electrodo para la reacción enzimática es de 53.8 y 31.6 mA·cm⁻²·M⁻¹, para los bioconjugados CTAB- y MUA-AuNR-Hb, respectivamente.

Si continúa aumentándose la concentración de H₂O₂ se obtiene un valor límite de corriente de reducción, un fenómeno que es característico de un comportamiento tipo Michaelis-Menten. A partir de estos datos, se puede determinar la constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk:⁸⁷

$$\frac{1}{I_{SS}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M^{app}}{I_{max}} \cdot \frac{1}{c}$$

donde I_{SS} es la corriente obtenida a diferentes concentraciones de sustrato, c es la concentración de sustrato e I_{max} es la corriente máxima medida en condiciones de saturación del sustrato. La K_M^{app} se puede obtener mediante el análisis de la pendiente y la intersección de la representación de las recíprocas de la corriente frente a la

concentración de H₂O₂. Los valores obtenidos también se recogen en la Tabla 3. Estos valores son del orden de los obtenidos con los bioconjugados AuNP-Hb.

Tabla 3. Parámetros electrocatalíticos determinados para H₂O₂ con los bioconjugados depositados en un electrodo GC.

Bioconjugado	I _{max} / μ A	K _M / mM	S / mA·cm ⁻² ·M ⁻¹
CTAB-AuNR-Hb	3.04	1.15	53.8
MUA-AuNR-Hb	2.36	1.27	31.6

Un pequeño valor de K_M^{app} implica buena afinidad entre la Hb inmovilizada y el H₂O₂, lo que favorece la reacción electroquímica.

4.4. Bibliografía

1. Perez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzan, L. M.; Mulvaney, P., Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17-18), 1870-1901.
2. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. *Langmuir* **2001**, *17* (20), 6368-6374.
3. Sau, T. K.; Murphy, C. J., Self-assembly patterns formed upon solvent evaporation of aqueous cetyltrimethylammonium bromide-coated gold nanoparticles of various shapes. *Langmuir* **2005**, *21* (7), 2923-2929.
4. Wang, L.; Jiang, X.; Ji, Y.; Bai, R.; Zhao, Y.; Wu, X.; Chen, C., Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity. *Nanoscale* **2013**, *5* (18), 8384-8391.
5. Betty, C. R.-K.; Bickford, L. R.; Payne, C. M.; Day, E. S.; Anderson, L. J. E.; Zhong, M.; Lee, S.; Mayer, K. M.; Zal, T.; Adam, L.; Dinney, C. P. N.; Drezek, R. A.; West, J. L.; Hafner, J. H., The stabilization and targeting of surfactant-synthesized gold nanorods. *Nanotechnology* **2009**, *20* (43), 434005.
6. Murphy, C. J.; Thompson, L. B.; Alkilany, A. M.; Sisco, P. N.; Boulos, S. P.; Sivapalan, S. T.; Yang, J. A.; Chernak, D. J.; Huang, J. Y., The Many Faces of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Letters* **2010**, *1* (19), 2867-2875.
7. Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J., Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2679-2724.
8. Nepal, D.; Park, K.; Vaia, R. A., High-Yield Assembly of Soluble and Stable Gold Nanorod Pairs for High-Temperature Plasmonics. *Small* **2012**, *8* (7), 1013-1020.

9. Nikoobakht, B.; Wang, J. P.; El-Sayed, M. A., Surface-enhanced Raman scattering of molecules adsorbed on gold nanorods: off-surface plasmon resonance condition. *Chem. Phys. Letters* **2002**, *366* (1-2), 17-23.
10. Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. A., Iodide in CTAB Prevents Gold Nanorod Formation. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 9518-9524.
11. Millstone, J. E.; Wei, W.; Jones, M. R.; Yoo, H.; Mirkin, C. A., Iodide Ions Control Seed-Mediated Growth of Anisotropic Gold Nanoparticles. *Nano Letters* **2008**, *8* (8), 2526-2529.
12. Garg, N.; Scholl, C.; Mohanty, A.; Jin, R., The Role of Bromide Ions in Seeding Growth of Au Nanorods. *Langmuir* **2010**, *26* (12), 10271-10276.
13. Gole, A.; Murphy, C. J., Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (19), 3633-3640.
14. Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T., Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (29), 13857-13870.
15. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (10), 1957-1962.
16. Sebastián, V.; Lee, S.-K.; Zhou, C.; Kraus, M. F.; Fujimoto, J. G.; Jensen, K. F., One-step continuous synthesis of biocompatible gold nanorods for optical coherence tomography. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (53), 6654-6656.
17. Grochola, G.; Snook, I. K.; Russo, S. P., Computational modeling of nanorod growth. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127* (19).
18. Park, K.; Drummy, L. F.; Wadams, R. C.; Koerner, H.; Nepal, D.; Fabris, L.; Vaia, R. A., Growth Mechanism of Gold Nanorods. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (4), 555-563.
19. Si, S.; Leduc, C.; Delville, M. H.; Lounis, B., Short Gold Nanorod Growth Revisited: The Critical Role of the Bromide Counterion. *Chemphyschem* **2012**, *13* (1), 193-202.
20. Ye, X.; Jin, L.; Caglayan, H.; Chen, J.; Xing, G.; Zheng, C.; Doan-Nguyen, V.; Kang, Y.; Engheta, N.; Kagan, C. R.; Murray, C. B., Improved Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Gold Nanorods through the Use of Aromatic Additives. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2804-2817.
21. Carbo-Argibay, E.; Rodriguez-Gonzalez, B.; Gomez-Grana, S.; Guerrero-Martinez, A.; Pastoriza-Santos, I.; Perez-Juste, J.; Liz-Marzan, L. M., The Crystalline Structure of Gold Nanorods Revisited: Evidence for Higher-Index Lateral Facets. *Angew. Chem.* **2010**, *49* (49), 9397-9400.
22. Vigderman, L.; Khanal, B. P.; Zubarev, E. R., Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (36), 4811-4841.
23. Giannici, F.; Placido, T.; Curri, M. L.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Comparelli, R., The fate of silver ions in the photochemical synthesis of gold nanorods: an Extended X-ray Absorption Fine Structure Analysis. *Dalton Trans.* **2009**, (46), 10367-10374.
24. Placido, T.; Comparelli, R.; Giannici, F.; Cozzoli, P. D.; Capitani, G.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Curri, M. L., Photochemical Synthesis of Water-Soluble Gold Nanorods: The Role of Silver in Assisting Anisotropic Growth. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (18), 4192-4202.

25. Liu, M.; Guyot-Sionnest, P., Mechanism of Silver(I)-Assisted Growth of Gold Nanorods and Bipyramids. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (47), 22192-22200.
26. Hubert, F.; Testard, F.; Spalla, O., Cetyltrimethylammonium Bromide Silver Bromide Complex as the Capping Agent of Gold Nanorods. *Langmuir* **2008**, *24* (17), 9219-9222.
27. Velegol, S. B.; Fleming, B. D.; Biggs, S.; Wanless, E. J.; Tilton, R. D., Counterion Effects on Hexadecyltrimethylammonium Surfactant Adsorption and Self-Assembly on Silica. *Langmuir* **2000**, *16* (6), 2548-2556.
28. Scaletti, F.; Kim, C. S.; Messori, L.; Rotello, V. M., Rapid purification of gold nanorods for biomedical applications. *MethodsX* **2014**, *1*, 118-123.
29. Su, L. J.; Hu, S.; Zhang, L.; Wang, Z. R.; Gao, W. P.; Yuan, J.; Liu, M. H., A Fast and Efficient Replacement of CTAB with MUA on the Surface of Gold Nanorods Assisted by a Water-Immiscible Ionic Liquid. *Small* **2017**, *13* (11).
30. Zhang, Z. J.; Wang, J.; Chen, C. Y., Gold Nanorods Based Platforms for Light-Mediated Theranostics. *Theranostics* **2013**, *3* (3), 223-238.
31. He, J.; Unser, S.; Bruzas, I.; Cary, R.; Shi, Z. W.; Mehra, R.; Aron, K.; Sagle, L., The facile removal of CTAB from the surface of gold nanorods. *Colloids Surf. B* **2018**, *163*, 140-145.
32. Hauck, T. S.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W., Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small* **2008**, *4* (1), 153-159.
33. Gole, A.; Murphy, C. J., Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (6), 1325-1330.
34. Wilson, C. G.; Sisco, P. N.; Gadala-Maria, F. A.; Murphy, C. J.; Goldsmith, E. C., Polyelectrolyte-coated gold nanorods and their interactions with type I collagen. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5639-5648.
35. Li, X.; Qian, J.; He, S. L., Impact of the self-assembly of multilayer polyelectrolyte functionalized gold nanorods and its application to biosensing. *Nanotechnology* **2008**, *19* (35).
36. Lee, S. E.; Sasaki, D. Y.; Perroud, T. D.; Yoo, D.; Patel, K. D.; Lee, L. P., Biologically Functional Cationic Phospholipid-Gold Nanoplasmonic Carriers of RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (39), 14066-14074.
37. Takahashi, H.; Niidome, Y.; Niidome, T.; Kaneko, K.; Kawasaki, H.; Yamada, S., Modification of Gold Nanorods Using Phosphatidylcholine to Reduce Cytotoxicity. *Langmuir* **2006**, *22* (1), 2-5.
38. Nakashima, H.; Furukawa, K.; Kashimura, Y.; Torimitsu, K., Self-Assembly of Gold Nanorods Induced by Intermolecular Interactions of Surface-Anchored Lipids. *Langmuir* **2008**, *24* (11), 5654-5658.
39. Orendorff, C. J.; Alam, T. M.; Sasaki, D. Y.; Bunker, B. C.; Voigt, J. A., Phospholipid-Gold Nanorod Composites. *ACS Nano* **2009**, *3* (4), 971-983.

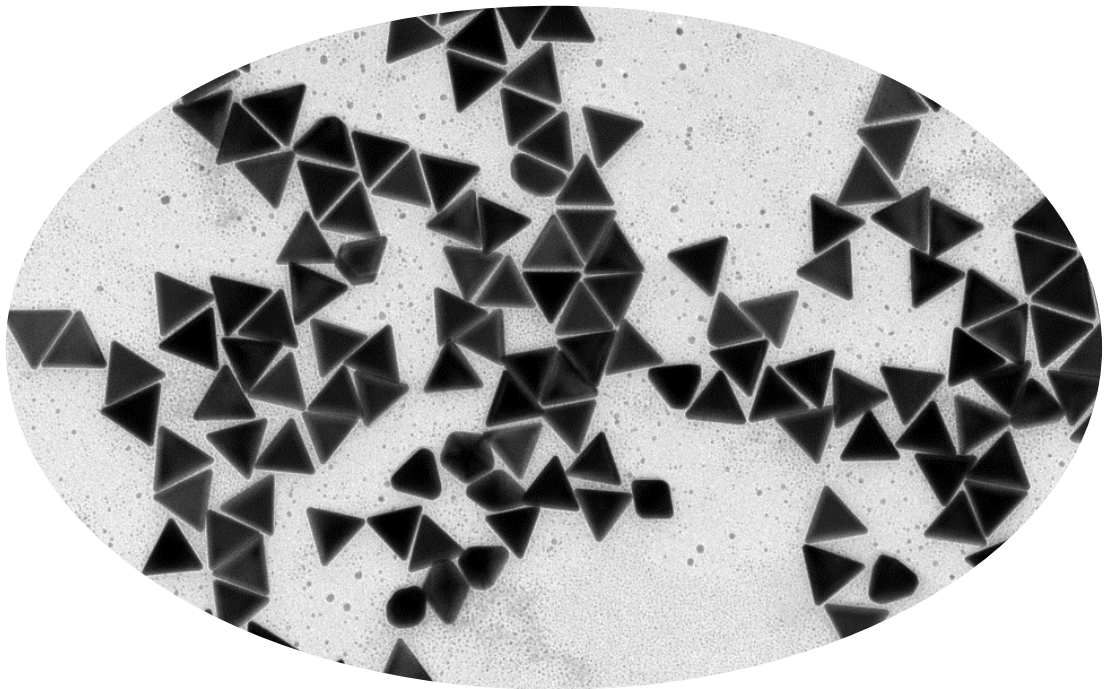
40. Alkilany, A. M.; Shatanawi, A.; Kurtz, T.; Caldwell, R. B.; Caldwell, R. W., Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanorods in Vascular Endothelium and Smooth Muscles of Isolated Rat Blood Vessel: Importance of Surface Modification. *Small* **2012**, *8* (8), 1270-1278.
41. Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G., Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu. Rev. Phys. Chem* **1992**, *43* (1), 437-463.
42. Wijaya, A.; Hamad-Schifferli, K., Ligand Customization and DNA Functionalization of Gold Nanorods via Round-Trip Phase Transfer Ligand Exchange. *Langmuir* **2008**, *24* (18), 9966-9969.
43. Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W., Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir* **1999**, *15* (11), 3782-3789.
44. Vigderman, L.; Manna, P.; Zubarev, E. R., Quantitative Replacement of Cetyl Trimethylammonium Bromide by Cationic Thiol Ligands on the Surface of Gold Nanorods and Their Extremely Large Uptake by Cancer Cells. *Angew. Chem.* **2012**, *51* (3), 636-641.
45. Kinnear, C.; Dietsch, H.; Clift, M. J. D.; Endes, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A., Gold Nanorods: Controlling Their Surface Chemistry and Complete Detoxification by a Two-Step Place Exchange. *Angew. Chem.* **2013**, *52* (7), 1934-1938.
46. Gentili, D.; Ori, G.; Comes Franchini, M., Double phase transfer of gold nanorods for surface functionalization and entrapment into PEG-based nanocarriers. *Chem. Commun.* **2009**, (39), 5874-5876.
47. Dai, Q.; Coutts, J.; Zou, J.; Huo, Q., Surface modification of gold nanorods through a place exchange reaction inside an ionic exchange resin. *Chem. Commun.* **2008**, (25), 2858-2860.
48. Wang, S.; Xi, W.; Cai, F.; Zhao, X.; Xu, Z.; Qian, J.; He, S., Three-photon luminescence of gold nanorods and its applications for high contrast tissue and deep in vivo brain imaging. *Theranostics* **2015**, *5* (3), 251-266.
49. Lee, S.; Anderson, L. J. E.; Payne, C. M.; Hafner, J. H., Structural Transition in the Surfactant Layer that Surrounds Gold Nanorods as Observed by Analytical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Langmuir* **2011**, *27* (24), 14748-14756.
50. Templeton, A. C.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Mulvaney, P., Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (3), 564-570.
51. Cao, J.; Galbraith, E. K.; Sun, T.; Grattan, K. T. V., Effective surface modification of gold nanorods for localized surface plasmon resonance-based biosensors. *Sens Actuators B Chem.* **2012**, *169*, 360-367.
52. Duwez, A. S., Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers: a review. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **2004**, *134*, 97-138.
53. Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C. J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W., Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir* **1998**, *14* (1), 17-30.

54. Bourg, M.-C.; Badia, A.; Lennox, R. B., Gold–Sulfur Bonding in 2D and 3D Self-Assembled Monolayers: XPS Characterization. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (28), 6562-6567.
55. Heister, K.; Zharnikov, M.; Grunze, M.; Johansson, L. S. O., Adsorption of Alkanethiols and Biphenylthiols on Au and Ag Substrates: A High-Resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy Study. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (19), 4058-4061.
56. Joseph, Y.; Besnard, I.; Rosenberger, M.; Guse, B.; Nothofer, H.-G.; Wessels, J. M.; Wild, U.; Knop-Gericke, A.; Su, D.; Schlögl, R.; Yasuda, A.; Vossmeier, T., Self-Assembled Gold Nanoparticle/Alkanedithiol Films: Preparation, Electron Microscopy, XPS-Analysis, Charge Transport, and Vapor-Sensing Properties. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (30), 7406-7413.
57. Costelle, L.; Räisänen, M. T.; Joyce, J. T.; Silien, C.; Johansson, L.-S.; Campbell, J. M.; Räisänen, J., Structural Evolution of Gas-Phase Coinage Metal Clusters in Thiolate Self-Assembled Monolayers on Au. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (42), 22602-22607.
58. He, X.-P.; Wang, X.-W.; Jin, X.-P.; Zhou, H.; Shi, X.-X.; Chen, G.-R.; Long, Y.-T., Epimeric Monosaccharide–Quinone Hybrids on Gold Electrodes toward the Electrochemical Probing of Specific Carbohydrate–Protein Recognitions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (10), 3649-3657.
59. Francis, S. M.; Stephens, W. E.; Richardson, N. V., X-ray photoelectron and infrared spectroscopies of quartz samples of contrasting toxicity. *Environ. Health* **2009**, *8* (1), S4.
60. Koglin, E.; Tarazona, A.; Kreisig, S.; Schwuger, M. J., In-situ investigations of coadsorbed cationic surfactants on charged surfaces: a SERS microprobe study. *Colloids Surf. A* **1997**, *123-124*, 523-542.
61. Tebbe, M.; Kuttner, C.; Männel, M.; Fery, A.; Chanana, M., Colloidally Stable and Surfactant-Free Protein-Coated Gold Nanorods in Biological Media. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (10), 5984-5991.
62. Tripathy, S. K.; Yu, Y.-T., Spectroscopic investigation of S–Ag interaction in ω -mercaptoundecanoic acid capped silver nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2009**, *72* (4), 841-844.
63. Marques, F. C.; Oliveira, G. P.; Teixeira, R. A. R.; Justo, R. M. S.; Neves, T. B. V.; Andrade, G. F. S., Characterization of 11-mercaptoundecanoic and 3-mercaptopropionic acids adsorbed on silver by surface-enhanced Raman scattering. *Vib. Spectrosc.* **2018**, *98*, 139-144.
64. Maestre, M. S.; Rodriguezamaro, R.; Munoz, E.; Ruiz, J. J.; Camacho, L., Use of Cyclic Voltammetry for Studying 2-Dimensional Phase-Transitions - Behavior at Low Scan Rates. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373* (1-2), 31-37.
65. Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Plasmon coupling in nanorod assemblies: Optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (37), 18243-18253.
66. Kakiuchi, T.; Iida, M.; Imabayashi, S.; Niki, K., Double-layer-capacitance titration of self-assembled monolayers of omega-functionalized alkanethiols on Au(111) surface. *Langmuir* **2000**, *16* (12), 5397-5401.
67. Gonzalez-Granados, Z.; Sanchez-Obrero, G.; Madueño, R.; Sevilla, J. M.; Blazquez, M.; Pineda, T., Formation of Mixed Mono layers from 11-Mercaptoundecanoic Acid and Octanethiol

- on Au(111) Single Crystal Electrode under Electrochemical Control. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117* (46), 24307-24316.
68. Park, H.-S.; Agarwal, A.; Kotov, N. A.; Lavrentovich, O. D., Controllable Side-by-Side and End-to-End Assembly of Au Nanorods by Lyotropic Chromonic Materials. *Langmuir* **2008**, *24* (24), 13833-13837.
69. Liu, W. J.; Guo, X.; Guo, R., The interaction of hemoglobin with hexadecyltrimethylammonium bromide. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *37* (5), 232-238.
70. Kaca, W.; Roth, R. I.; Vandegriff, K. D.; Chen, G. C.; Kuypers, F. A.; Winslow, R. M.; Levin, J., Effects of Bacterial-Endotoxin on Human Cross-Linked and Native Hemoglobins. *Biochemistry* **1995**, *34* (35), 11176-11185.
71. Baldwin, J.; Chothia, C., Haemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.* **1979**, *129* (2), 175-220.
72. Boffi, A.; Das, T. K.; della Longa, S.; Spagnuolo, C.; Rousseau, D. L., Pentacoordinate heme derivatives in sodium dodecyl sulfate micelles: Model systems for the assignment of the fifth ligand in ferric heme proteins. *Biophys. J.* **1999**, *77* (2), 1143-1149.
73. Hu, S.; Smith, K. M.; Spiro, T. G., Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (50), 12638-12646.
74. Abe, M.; Kitagawa, T.; Kyogoku, Y., Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and ¹⁵N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69* (10), 4526-4534.
75. Spiro, T. G.; Streckas, T. C., Resonance Raman-Spectra of Heme Proteins - Effects of Oxidation and Spin State. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (2), 338-345.
76. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Principles and Applications*. 2^a ed.; John Wiley and Sons: New York, 2001.
77. Laviron, E.; Roullier, L.; Degrand, C., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 11-23.
78. Pearce, P. J.; Bard, A. J., Polymer films on electrodes: Part III. Digital simulation model for cyclic voltammetry of electroactive polymer film and electrochemistry of poly(vinylferrocene) on platinum. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *114* (1), 89-115.
79. Clark, R. A.; Bowden, E. F., Voltammetric peak broadening for cytochrome c/alkanethiolate monolayer structures: Dispersion of formal potentials. *Langmuir* **1997**, *13* (3), 559-565.
80. Doan, T. T.; Vargo, M. L.; Gerig, J. K.; Gulka, C. P.; Trawick, M. L.; Dattelbaum, J. D.; Leopold, M. C., Electrochemical analysis of azurin thermodynamic and adsorption properties at monolayer-protected cluster film assemblies – Evidence for a more homogeneous adsorption interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352* (1), 50-58.
81. Beissenhirtz, M. K.; Scheller, F. W.; Lisdat, F., A Superoxide Sensor Based on a Multilayer Cytochrome c Electrode. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (16), 4665-4671.

82. Calvente, J. J.; Andreu, R.; Molero, M.; López-Pérez, G.; Domínguez, M., Influence of Spatial Redox Distribution on the Electrochemical Behavior of Electroactive Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (39), 9557-9568.
83. Tagliazucchi, M.; Calvo, E. J., Charge Transport in Redox Polyelectrolyte Multilayer Films: The Dramatic Effects of Outmost Layer and Solution Ionic Strength. *Chemphyschem* **2010**, *11* (13), 2957-2968.
84. Laviron, E., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part I. Description and discussion of the model. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 1-9.
85. Laviron, E., General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *101* (1), 19-28.
86. Laviron, E., Use of linear potential sweep voltammetry and of AC voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **1979**, *100* (1-2), 263-270.
87. Kamin, R. A.; Wilson, G. S., Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Anal. Chem.* **1980**, *52* (8), 1198-1205.

Capítulo 5



*Nanoprismas triangulares
de oro (AuNTs)*

5. Nanoprismas triangulares de oro (AuNTs).

5.1. Introducción.

Los antiguos griegos ya sabían que había cinco sólidos, a los que llamaron platónicos, que podían construirse seleccionando un polígono regular convexo y colocando el mismo número de ellos en cada esquina. Así, se forman tetraedros, octaedros, hexaedros (cubo), icosaedros y dodecaedros. La belleza de su simetría y su aparente simplicidad continúa inspirando a generaciones de matemáticos y científicos.

La preparación de estas estructuras a nivel de nanoescala con metales, partiendo de las sales correspondientes, parecía más un arte que una ciencia, ya que las diferentes preparaciones eran poco reproducibles. Las investigaciones pioneras apuntaban a que las condiciones de reacción o los mecanismos para la modulación de la forma no se entendían bien, al menos, para producir nanocristales en forma masiva con las formas deseadas.

Recientemente, el concepto de control en la forma ha revitalizado la antigua síntesis de coloides metálicos.¹ En este sentido, los prismas triangulares son un tipo de nanoestructuras de gran interés debido a sus propiedades ópticas especiales y ello ha hecho que se desarrollen nuevas metodologías para su preparación.²⁻⁵

Los procedimientos de síntesis más utilizados se basan en el método de crecimiento mediado por semillas, al igual que ocurría con los nanocilindros de oro estudiados en el Capítulo 4. Para ello se preparan semillas de oro de un tamaño en torno a 5 nm de diámetro seguido por un procedimiento de crecimiento en varias etapas que suele incluir un agente surfactante que actúa como decapante y un reductor suave. Estos procedimientos producen una mezcla de nanopartículas con formas esféricas y prismas triangulares cada una de ellas con un tamaño relativamente homogéneo. Parece que la concentración de surfactante es un factor crítico para la producción de prismas triangulares en lugar de otras formas anisotrópicas utilizándose, en este caso, una concentración de surfactantes a saturación. Por otra parte, en el caso de prismas triangulares de oro (AuNTs), el grado de control en la síntesis por adición de iones Au y el reductor ácido ascórbico demuestra los principios de la metodología de semillas. El concepto de crecimiento mediado por semillas involucra la reducción lenta de los iones

metálicos en la superficie de una nanopartícula en crecimiento y, al mismo tiempo, el balance de la potencia reductora en la disolución, de manera que los nuevos eventos de nucleación se hagan lentos en relación con el crecimiento de la nanopartícula. Ya que los iones Au tienen un alto potencial de reducción en ausencia del metal Au ($\text{Au}_{\text{átomo}} / \text{Au}^{\text{I}}_{\text{ac}} = -1.5 \text{ V vs NHE}$), las nanoestructuras de oro sirven como catalizadores que facilitan la propia reducción de oro ($\text{Au}_{\text{metal}} / \text{Au}^{\text{I}}_{\text{ac}} = 1.692 \text{ V vs NHE}$).⁶ Para un número de adiciones dado, si no se añaden las cantidades equivalentes de forma secuencial sino al comienzo de la síntesis, no se observa un aumento equivalente de la longitud del eje del AuNT. Este crecimiento no equivalente indica que la cantidad de iones Au en disolución no controla directamente el tamaño de la nanoestructura. En su lugar, se observa un aumento de la población de partículas pseudo-esféricas de Au con poco aumento en el eje del AuNT. Por tanto, la cantidad de oro debe añadirse paso a paso para que el crecimiento esférico no compita con el de los prismas. También, si los iones Au se añaden en ausencia de ácido ascórbico adicional, tampoco crece la longitud del eje del AuNT. De estos resultados se concluye que la lenta adición del ion metálico en presencia de un agente reductor débil es lo que provoca el crecimiento en forma de prisma triangular.

El crecimiento de los AuNTs se puede monitorizar mediante espectroscopia de absorción UV-visible-NIR, observándose la aparición de tres picos denominados I, II y III que corresponden a la resonancia de plasmon superficial dipolar ($\sim 1200 \text{ nm}$), cuadrupolar ($\sim 800 \text{ nm}$), ambas correspondientes a la estructura del prisma triangular y, la última, que corresponde a la resonancia dipolar ($\sim 500 \text{ nm}$) de las nanopartículas cuasi-esféricas.⁵

A través del crecimiento de los AuNTs durante la síntesis, se observa un aumento de la resonancia dipolar III. Existen evidencias de que las nanopartículas esféricas crecen, llegando a $\sim 40 \text{ nm}$ de diámetro y que no hay población de pequeños AuNTs en desarrollo con las adiciones sucesivas. Esta relación competitiva puede entenderse por el efecto de Gibbs-Thomson que mantiene que una superficie convexa tiene una energía superficial más alta que una superficie plana del mismo material en la misma fase. Por el contrario, una superficie cóncava tendría una menor energía superficial que la

superficie plana. Este efecto se ha observado para islas de metal en la nanoescala y podría ser el que dirige el crecimiento anisotrópico de las nanopartículas.⁷

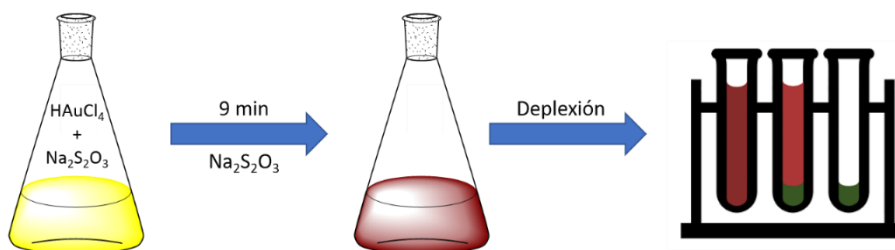
Recientemente, se ha sugerido que los AuNTs forman maclas (111) y que estas estructuras producen facetas cristalinas laterales cóncavas y convexas.⁸ La superficie convexa, de acuerdo con el efecto Gibbs-Thomson sería menos estable frente a la adición de nuevos átomos de Au y podría explicar el crecimiento preferencial de los AuNTs sobre las facetas convexas de las nanopartículas pseudo-esféricas. Los diagramas de difracción de los AuNTs indican la presencia de una faceta cristalina (111) en la cara superior y (112), en la cara lateral del prisma. También se observan reflexiones prohibidas en el diagrama de difracción que son consistentes con la presencia de la estructura de macla.⁶ Estas teorías, por tanto, crean un punto de partida para elucidar el fenómeno físico que dirige el crecimiento selectivo de los AuNTs. Además de las consideraciones de energía superficial están los factores químicos que median la reducción de los iones Au. Es probable que la combinación de ambas fuerzas sea la que produce el crecimiento preferencial de la longitud del AuNT.

5.2. Experimental.

5.2.1. Síntesis de nanoprismas triangulares de oro (AuNT).

La preparación AuNTs se ha llevado a cabo mediante un procedimiento mediado por semillas (Esquema 1)⁹ que emplea un agente reductor suave, como es el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y que puede seguirse mediante espectroscopía UV-visible-NIR. El protocolo comienza con la mezcla 25 ml HAuCl_4 2 mM con 30 mL de una disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM. Esta mezcla se agita durante 9 minutos, que es el tiempo en el que se forman las semillas. La etapa de crecimiento se inicia por la adición de 12.5 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.5 mM. Como puede observarse en la Figura 1, el espectro de HAuCl_4 muestra bandas a 219 y 308 nm que empieza a cambiar cuando se añade $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Transcurridos 9 minutos, se observa la aparición de bandas a 534 y 1086 nm que evolucionan con el tiempo, a la vez que empiezan a disminuir las señales correspondientes a la sal de oro. La etapa de crecimiento se sigue durante 45 minutos, tiempo a partir del cual no se observan cambios significativos en el espectro, lo que hace pensar que el proceso no evoluciona. Hay que destacar que, en estas condiciones no se observa la presencia de sal de oro, por

lo que puede concluirse que los iones Au se han convertido cuantitativamente en nanoestructuras. La presencia de bandas a 539 y 1015 nm permite intuir la presencia en la preparación de una mezcla de nanopartículas esféricas (absorción a 539 nm) y AuNTs (absorción a 1015 nm). Estos cambios en los espectros se acompañan de cambios en el color de la disolución desde rojo a azul verdoso, al final de la reacción.



Esquema 1. Síntesis de nanoprismas triangulares de oro y su posterior depleción.

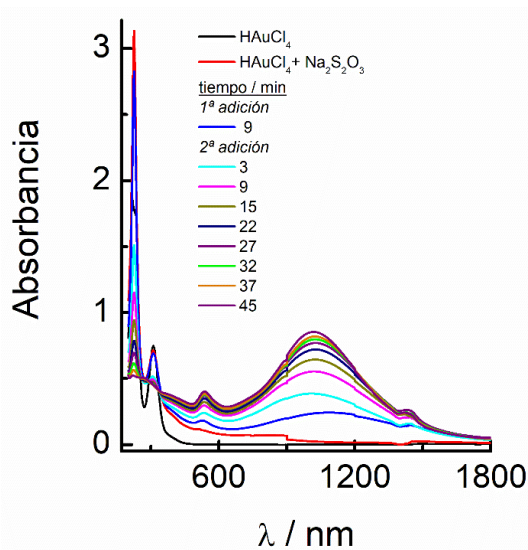


Figura 1. Espectros UV-visible-NIR obtenidos durante las diferentes etapas del procedimiento de preparación de AuNTs mediada por semillas.

5.2.2. Separación de los AuNTs.

Las micrografías TEM obtenidas para esta preparación (Figura 2) muestra, como es de esperar, la presencia de una mezcla de semillas esféricas y AuNTs que deben someterse a un procedimiento de separación posterior. Para ello se utiliza una

metodología de depleción asistida por surfactantes. La concentración de surfactante (CTAB) que se emplea depende del tamaño de las partículas a separar. Por tanto, se lleva a cabo un ensayo preliminar utilizando diferentes concentraciones de CTAB y, manteniendo las muestras a 28 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se observa un precipitado en el fondo del matraz que debe contener los AuNTs, mientras que el sobrenadante mantiene el color rojizo típico de las dispersiones de nanopartículas esféricas. Mediante espectroscopia UV-visible-NIR (Figura 3), se observa que la muestra que contiene 0.167 M de CTAB ha producido la separación completa de estas nanoestructuras, procediéndose a la separación del precipitado y su valoración después de su dispersión en agua. Es evidente que el sobrenadante contiene únicamente nanopartículas esféricas (absorción a 537 nm), mientras que la muestra redispersada muestra la banda a 1030 nm y ausencia total de la señal a 537 nm. Por tanto, se puede concluir que la separación, bajo estas condiciones experimentales es cuantitativa. Es interesante destacar que, esta disolución presenta un color verde oscuro que indica la presencia de AuNTs.

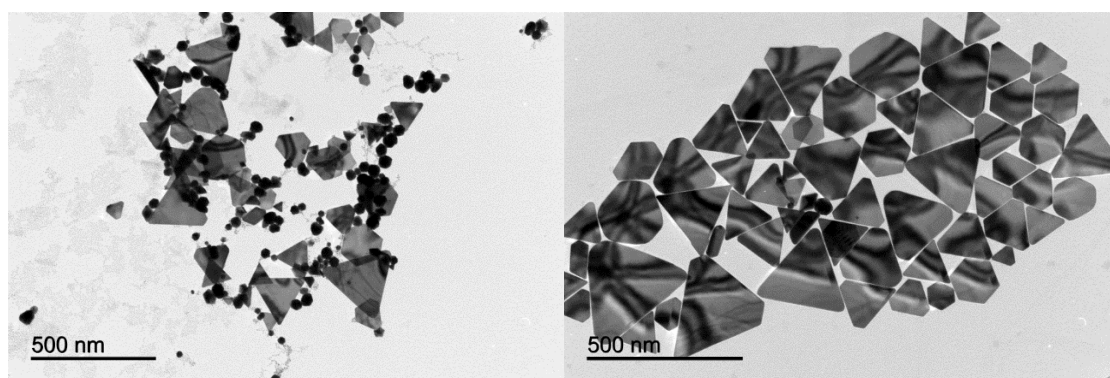


Figura 2. Micrografías TEM de la preparación de AuNTs representada en la Figura 1 (Izquierda) y del precipitado redispersado mostrado en la Figura 3 (Derecha).

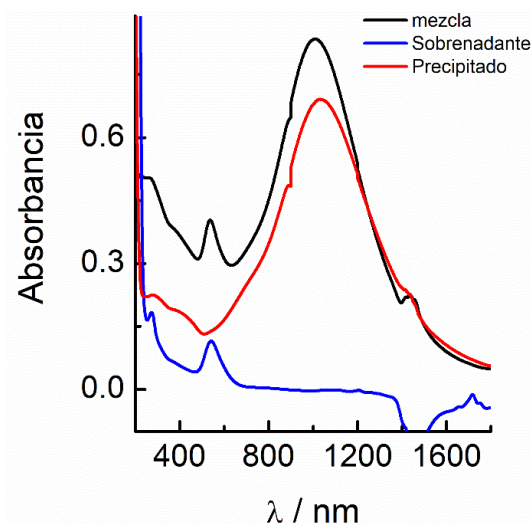


Figura 3. Espectros UV-visible-NIR obtenidos en el procedimiento de depleción de las AuNTs obtenidos mediante el protocolo de síntesis representado en la Figura 1.

Se han medido los tamaños de los AuNTs obtenidos utilizando diferentes imágenes TEM y el resultado se recoge en el histograma representado en la Figura 4 en el que puede observarse que existe una población promedia de AuNTs con una longitud lateral de 156 nm.

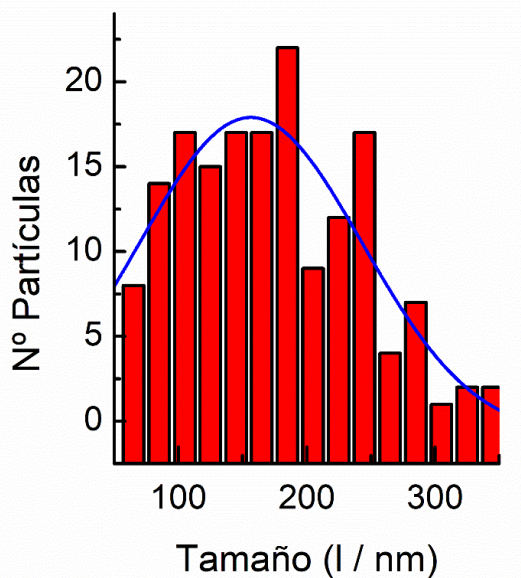


Figura 4. Histograma obtenido para la determinación del tamaño de los AuNTs utilizando micrografías TEM del conjunto cuya muestra se recoge en la Figura 2.

5.3. Resultados y discusión.

5.3.1. Caracterización de AuNTs mediante espectroscopia Raman.

A la vista de la metodología empleada para la separación de las nanopartículas de diferente forma y tamaño utilizando CTAB, se ha llevado a cabo un primer intento de caracterización de los AuNTs empleando espectroscopia Raman. El espectro obtenido para los AuNTs se compara con el de CTAB libre, ya comentado en el Capítulo 4 (Figura 5). Bajo estas condiciones experimentales, hay que destacar que no se observa la banda a 170 cm^{-1} en el espectro de los AuNTs a diferencia de lo que ocurría con CTAB-AuNRs. Como se indicó entonces, esta banda corresponde a la vibración del enlace Au-Br.^{10 11} La aparición de esta banda se ha indicado que es debida a la interacción de las cadenas de CTAB a través del grupo de cabeza manteniendo el anión bromuro en el espacio entre la capa de surfactante y la superficie del Au. El hecho de que estas nanopartículas se sinteticen en ausencia de CTAB y éste se añada solo para el proceso de depleción, indicaría que la forma de adsorberse a la superficie del oro es diferente al caso de los AuNRs. Por otra parte, mientras que en el espectro Raman de CTAB-AuNRs no aparecían las bandas a 748 , 758 y 770 cm^{-1} que corresponden a tensiones del grupo de cabeza trimetilamonio, sino que aparecía una única banda menos definida a 760 cm^{-1} , en el espectro de los AuNTs estas bandas aparecen en forma similar al caso del CTAB libre. Este hecho apunta igualmente a un tipo de película diferente en el presente caso, probablemente presentando menos compacidad y, por tanto, permitiendo una mayor libertad de movimiento que en el caso de la bicapa de CTAB que protege al AuNR. Como se observa en la Figura 5, existen una gran similitud en el resto de las bandas obtenidas observándose aquellas características de cadenas alquílicas largas como son las vibraciones de esqueleto C-C a 1070 y 1144 cm^{-1} , las debidas a los grupos CH_2 , a 1295 , 1393 , 1447 , 1464 y 1481 cm^{-1} . En la región de huella digital de las vibraciones C-H, aparecen las tensiones simétrica y antisimétrica de CH_2 a 2850 y 2880 cm^{-1} , así como las simétricas y antisimétricas de CH_3 a 2930 y 2960 , respectivamente. La forma de estas bandas que refleja el orden/desorden y la polaridad del entorno de las cadenas de alcano, mediante las relaciones de intensidad $2850/2880$ y $2930/2850$, respectivamente, muestran que no hay cambios significativos al pasar de CTAB libre al que se encuentra protegiendo al AuNT, lo que indicaría que la película de CTAB protege

a la nanopartícula, pero se encuentra adsorbida débilmente. Por último, se observa también la banda a 3040 cm^{-1} que surge de la tensión asimétrica NCH de las cadenas de los grupos trimetilamonio.¹²

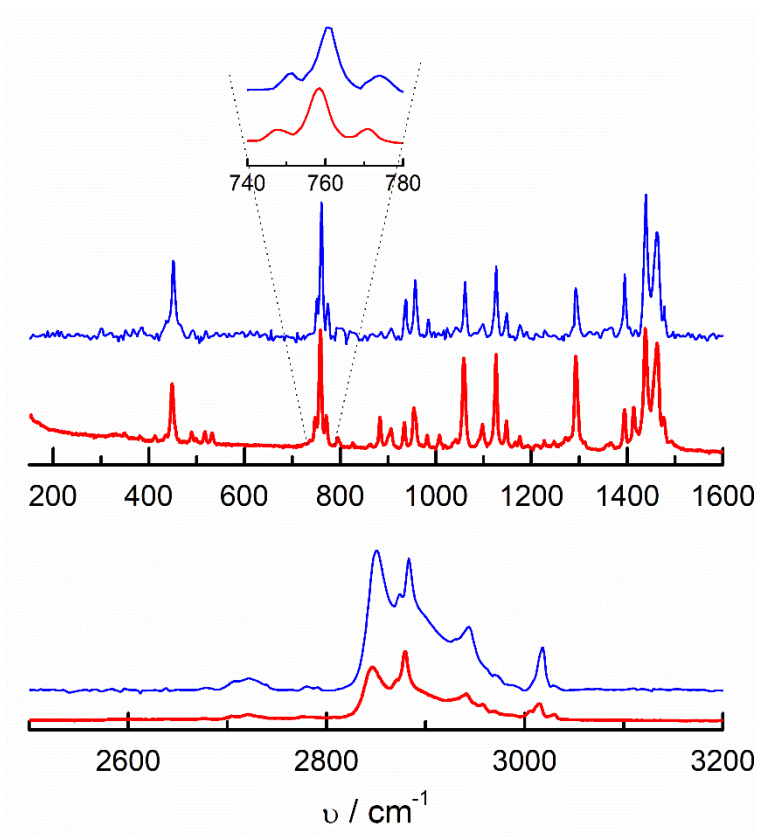


Figura 5. Espectros Raman de CTAB y AuNTs protegidos por CTAB.

5.3.2. Caracterización de AuNTs mediante técnicas electroquímicas.

Otra metodología empleada para comprobar la presencia de la capa de CTAB protegiendo los AuNTs es la voltamperometría cíclica. Para ello, se depositan unas gotas de AuNTs sobre la superficie del electrodo GC y se procede al registro del perfil electroquímico del electrodo recubierto de nanopartículas. Como puede observarse (Figura 6), aparecen los picos de oxidación y reducción de oro, superpuestos en el perfil del electrodo GC obtenido bajo las mismas condiciones experimentales.

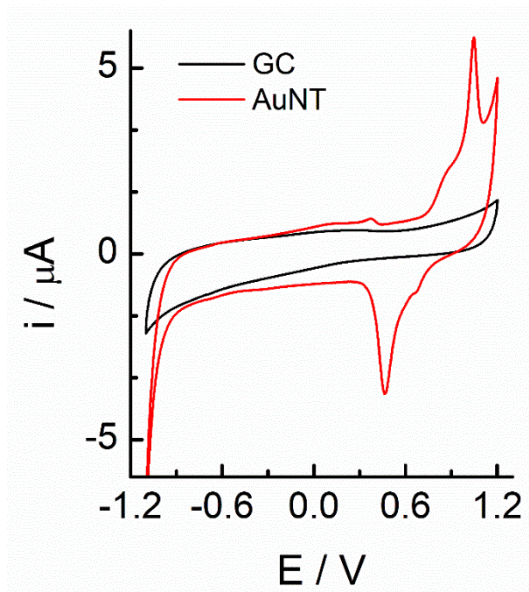


Figura 6. VCs de un electrodo de GC desnudo (—) y modificado con CTAB-AuNTs (—) en disolución fosfato 50 mM a pH 7,4.

Cabe destacar el hecho de que no se producen los picos que se describieron como debidos a la transición de fase en la bicapa de CTAB sobre la superficie del oro. Este hecho es una evidencia adicional de la presencia de una película de CTAB que presenta menor organización que en el caso de los AuNRs.

5.3.3. Estudio de la estabilidad de AuNTs en función del pH.

Con el objeto de comprobar la estabilidad de los AuNTs en disolución acuosa se ha llevado a cabo un estudio mediante espectroscopia UV-visible-NIR en función del pH del medio. El estudio comienza en la región de pH ácido, donde los AuNTs son estables y, como se observa en la Figura 7, el espectro no cambia hasta que se alcanzan valores de pH cercanos a 10. A $\text{pH} > 10$, el espectro muestra una disminución de intensidad, así como un desplazamiento de la banda de plasmon superficial hacia el azul (Figura 8).

Este desplazamiento de la banda hacia menores longitudes de onda se ha descrito en el caso de AuNRs como una interacción entre los nanomateriales según su región de mayor superficie (*side-by-side*) que da lugar a un acoplamiento y, por tanto, a un cambio en la longitud de onda de absorción.^{13, 14} En efecto, el análisis mediante microscopia de transmisión electrónica (TEM) de los AuNTs en esta zona de pH indica la presencia de este tipo de agregados, como se recoge en la Figura 9, donde se han podido observar

tanto apilamientos sobre la superficie como otros tipos en forma perpendicular a la misma. Por otra parte, la disminución de absorbancia estaría de acuerdo con una precipitación paulatina de los AuNTs conforme se van formando las pilas de mayor tamaño y se pierde la estabilidad de la dispersión.

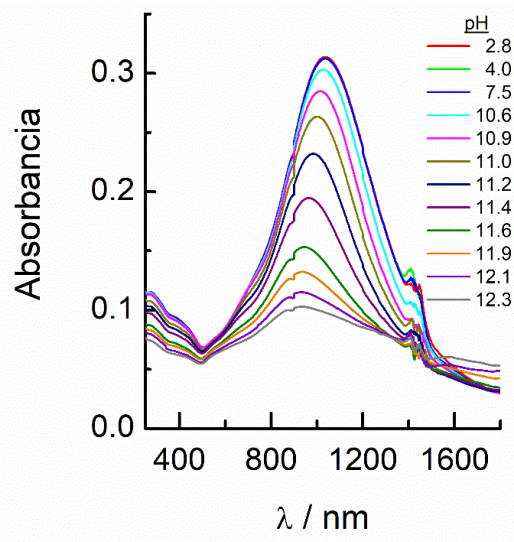


Figura 7. Espectros UV-visible-NIR de AuNTs en función del pH del medio.

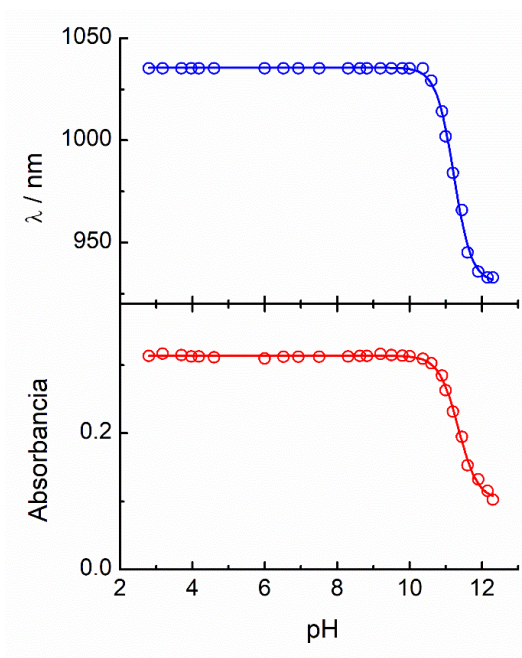


Figura 8. Variación de la absorbancia y longitud de onda del plasmon superficial de los AuNTs en función del pH.

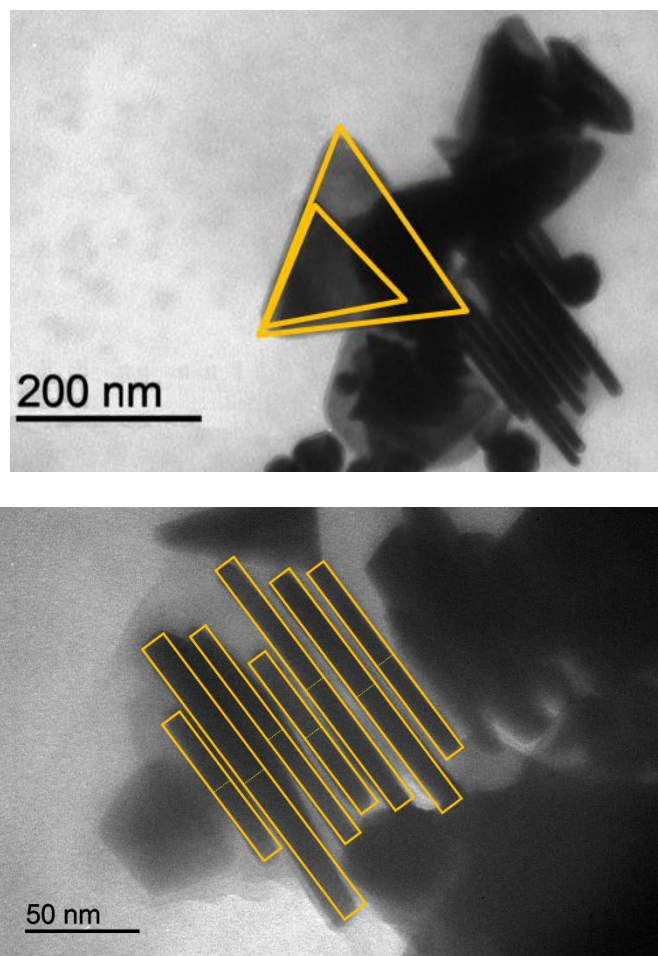


Figura 9. Micrografías TEM de la preparación de AuNTs a pH alcalino. Los recuadros en amarillo se han dibujado para ayudar a la visión de los apilamientos.

5.3.4 Formación y caracterización del bioconjugado AuNT-Hb.

Con el objeto de encontrar si la proteína Hb es capaz de interactuar con estos nanomateriales de estructura en forma de prisma triangular, se ha llevado a cabo el estudio de la formación de los bioconjugados AuNT-Hb.

Para ello, se pone en contacto la disolución de AuNTs con diferentes concentraciones de Hb. En la Figura 10, se recogen los espectros obtenidos al cambiar la concentración de proteína hasta un valor de 10 μM . Asimismo, se muestran los espectros de la proteína en ausencia de AuNTs y los espectros de diferencia que se realizan poniendo en la cubeta de referencia la misma cantidad de Hb que en el bioconjugado o bien restando el espectro de Hb libre al del bioconjugado. Como puede

observarse, la banda del plasmon superficial no se desplaza en ningún sentido, aunque disminuye su absorbancia en presencia de la proteína. En cambio, se observan ciertos cambios en la región que coincide con las señales de Hb. En primer lugar, la banda Soret, que se observa a 405 nm cuando se encuentra libre en disolución, se desplaza a 412 nm cuando forma el bioconjugado. Esta es la razón por la que, en los espectros de diferencia se observan bandas positivas y negativas. A diferencia de lo que ocurre en el caso de MUA-AuNR-Hb, no se observan cambios en las bandas Q, tan solo una pequeña disminución de absorbancia en esa región con respecto a lo que se observa para la proteína libre.

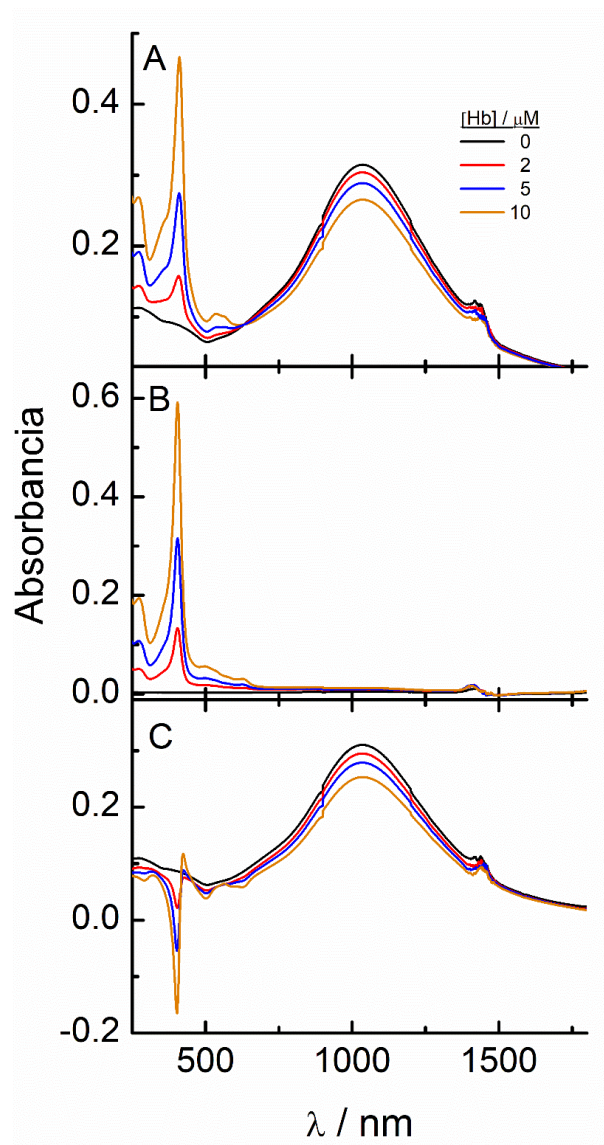


Figura 10. Estudio de la formación del bioconjugado AuNT-Hb. Espectros de (A) Bioconjugados, (B) proteína libre y (C) diferencia.

Para obtener información sobre la estabilidad de los AuNTs en presencia de la proteína, se lleva a cabo un estudio del bioconjugado en función del pH. El comportamiento observado, en principio, es similar al que se obtiene en ausencia de proteína. Se observa que la banda de plasmon superficial no cambia en un amplio intervalo de pH desde medio fuertemente ácido hasta medio alcalino. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurriría en ese caso, el espectro del bioconjugado muestra un desplazamiento hacia el rojo a pH > 10 (Figuras 11 y 12). El cambio en la longitud de onda del plasmón hacia valores más altos se ha descrito que se debe a un tipo de interacción a través de los lados de la base del prisma.¹⁴ Esto daría lugar a un aumento en la relación de aspecto debido a la agregación lateral que podría deberse a la unión de las proteínas en las caras triangulares de las partículas evitándose así la agregación en la forma *side-by-side* que se produce en ausencia de proteínas.

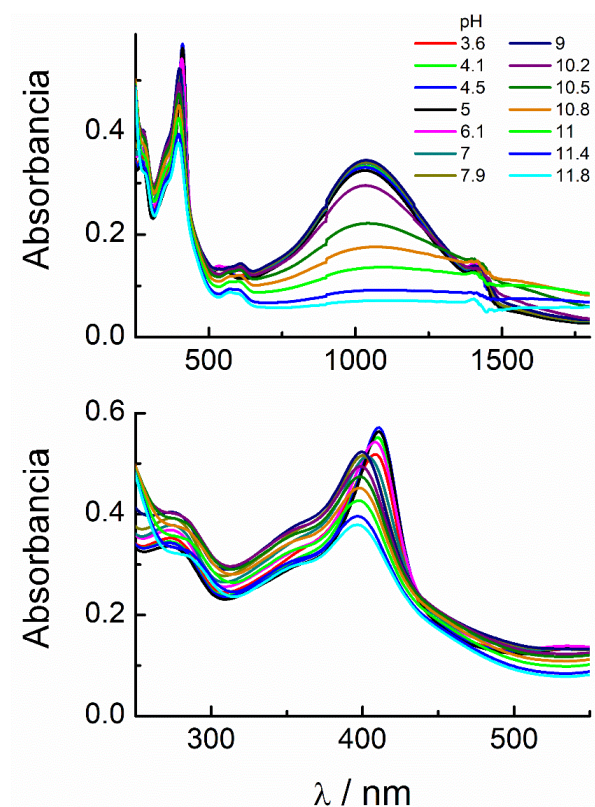


Figura 11. Espectros UV-visible-NIR de AuNT-Hb en función del pH.

Como se muestra en la Figura 12, en la que se representan los valores de absorbancia y longitud de onda en función del pH, al alcanzarse el medio alcalino, la

absorbancia también disminuye como ocurría con los AuNTs, lo que de nuevo, debe adscribirse al aumento de tamaño de las partículas y su consiguiente precipitación.

Se ha medido también la variación de la banda de Soret de Hb en el bioconjugado y se ha comparado en la Figura 13 con la variación de la proteína libre. Es interesante destacar que, en medio ácido, la banda Soret cambia a valores próximos a 410 nm y se mantiene a esos valores hasta alcanzar pH neutro y, a partir de este valor, la longitud de onda cambia abruptamente hasta los valores propios de la forma desnaturalizada que no se observa cuando la proteína está libre. Cabe pensar que, bajo estas condiciones, el bioconjugado precipita sin permitir que se libere la proteína. Aunque, en estas condiciones parece que las moléculas de CTAB no se encuentran adsorbidas fuertemente a la superficie de las nanopartículas, como ocurría en el caso de los AuNRs, no debe descartarse que el efecto observado se deba a la presencia de pequeñas concentraciones del surfactante en el medio y su interacción con la proteína Hb.

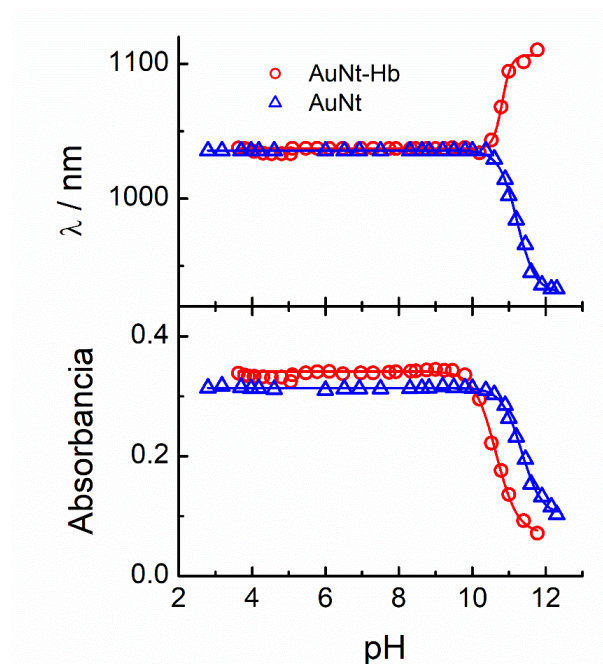


Figura 12. Variación de la longitud de onda del plasmon superficial y de la absorbancia de los bioconjugados AuNT-Hb en función del pH. Para comparar el comportamiento, se ha incluido la variación correspondiente a los AuNTs en ausencia de proteína extraídos de la Figura 8.

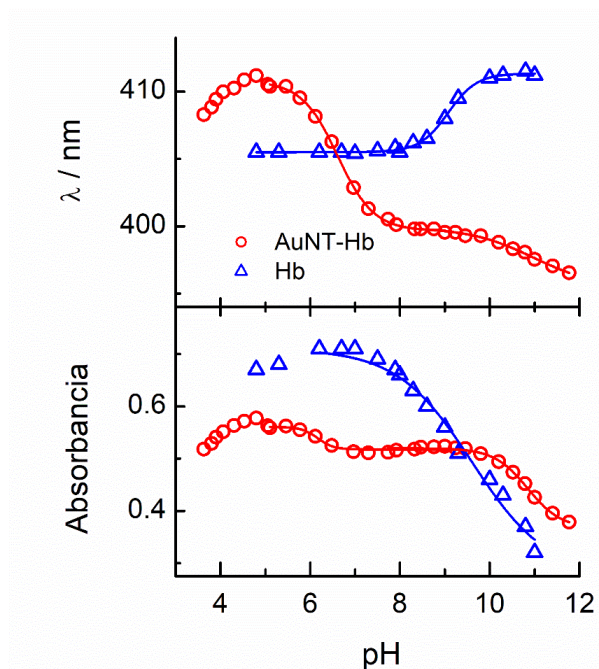


Figura 13. Variación de la longitud de onda de la banda Soret y su absorbancia en función del pH. Para su comparación, se ha incluido la variación de la proteína libre bajo las mismas condiciones experimentales.

Como se muestra en la Figura 14, las micrográficas TEM de los bioconjugados depositados sobre la rejilla en esta región de pH confirman el comportamiento descrito, dando lugar a interacciones laterales, en lugar del apilamiento observado cuando están los AuNTs libres bajo las mismas condiciones alcalinas.

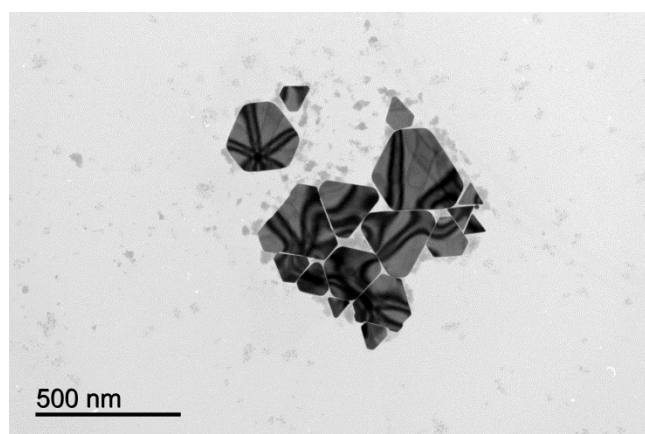


Figura 14. Micrografía TEM del bioconjugado AuNT-Hb en medio alcalino.

5.3.5. Caracterización de AuNT-Hb mediante espectroscopia Raman.

Para realizar la caracterización mediante espectroscopia Raman del bioconjugado se procede como en el Capítulo 4. En la Figura 15 se muestra el espectro Raman tanto del bioconjugado como de la proteína libre, para su comparación.^{15, 16}

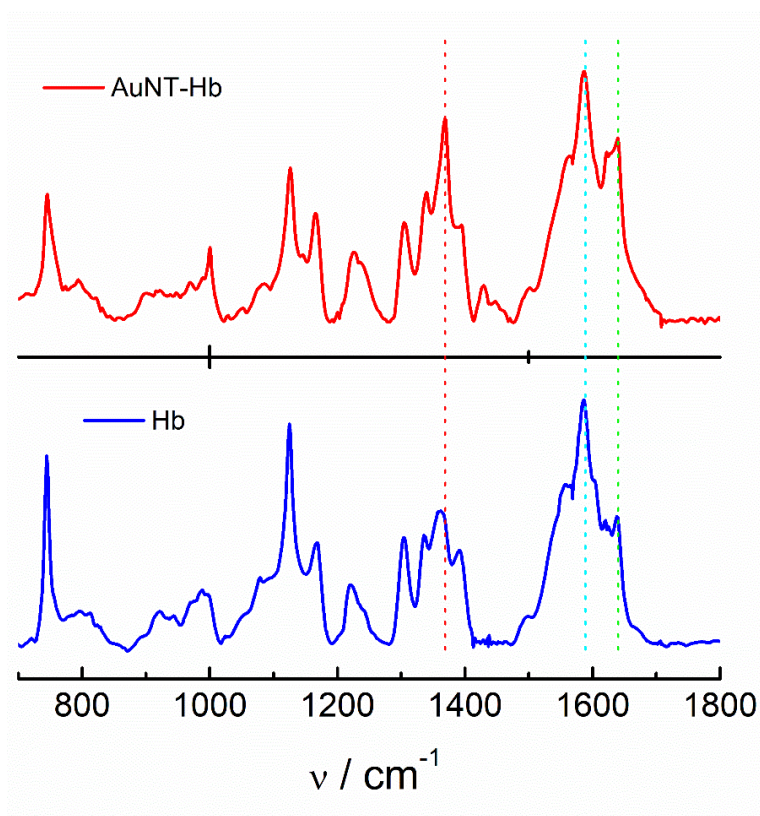


Figura 15. Espectros RR y SERRS. Las líneas verticales punteadas señalan las bandas marcadoras del estado de oxidación (roja), estado de espín (celeste) y estados de oxidación y espín (verde).

El comportamiento observado es muy similar al encontrado con los AuNRs, pudiendo observarse tanto el efecto Raman de Resonancia debido a que se utiliza el láser de 535 nm para la excitación, como el efecto SERRS ya que la banda de plasmon superficial de los AuNTs es muy ancha y abarca estos valores de longitud de onda.

Las vibraciones de porfirina incluyen las bandas marcadoras del estado de oxidación a 1378 y 1355 cm^{-1} para hemos férricos y ferrosos, respectivamente, además de otros modos de esqueleto como son las de 1639, 1554, 1391 y 1301 cm^{-1} .¹⁷ Las bandas marcadoras de oxidación aparecen en el espectro de Hb a 1359 cm^{-1} indicando que se encuentra en estado de Hb(FeII) y algo similar ocurre en el caso del bioconjugado CTAB-

AuNR-Hb. Sin embargo, el espectro de MUA-AuNR-Hb se mostraba un desplazamiento de esta banda hacia 1372 cm^{-1} , lo que indicaba que se encuentra en estado Hb(FeIII). En el caso de AuNT-Hb, esta señal aparece a 1367 cm^{-1} , por lo que cabría esperar que se encontrara fundamentalmente en forma oxidada. Por otra parte, la banda a 1562 cm^{-1} se ha asignado también al estado oxidado, observándose un desplazamiento hacia valores más bajos de energía para el estado reducido. No obstante, esta banda es menos útil como marcador de estado de oxidación ya que se encuentra solapada con otra cercana a 1555 en el caso de los derivados protohemo, como el que posee la Hb.¹⁷

Las bandas marcadoras del estado de spin son las bandas a 1555 y 1585 cm^{-1} , siendo ésta última la que se asigna al estado de bajo espín (LS) que es la que se observa en todos los casos en los espectros. Por último, las bandas a 1500 y 1640 cm^{-1} son sensibles tanto al estado de oxidación como al estado de espín, aunque con mucha menos precisión que las anteriores. A partir de este análisis se puede concluir que la Hb libre se encuentra en estado reducido (probablemente deoxi-Hb) y cuando forma el bioconjugado con los AuNTs se oxidaría estando en ambos casos en estado de LS.

5.3.6. Caracterización de AuNTs mediante DLS.

Otra técnica muy útil para el estudio de los nanomateriales tanto libres como formando los bioconjugados es la técnica de dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*). Esta tecnología permite, además de la determinación del tamaño hidrodinámico del nanomaterial, la medida del potencial Z.

Las curvas de distribución de tamaño para nanopartículas asimétricas muestran, sin embargo, detalles que están ausentes en el caso de las nanopartículas esféricas. En este caso, las curvas exhiben dos picos de distribución de tamaños, uno a grandes y otro a valores muy pequeños de tamaño que han hecho que, en ocasiones, estos últimos se interpreten como picos debidos a impurezas presentes en el medio y se pase por alto su significado real. La explicación del origen de estos picos viene del hecho de que DLS obtiene información sobre el tamaño de partícula midiendo el coeficiente de difusión. Es por esta razón que el tamaño obtenido se denomina hidrodinámico. El coeficiente de difusión de una nanopartícula depende de su masa, pero además, de su forma y su química superficial, ya que estos parámetros afectan a las interacciones partícula-

disolvente y, por tanto, al movimiento Browniano de las mismas. Teniendo esto en cuenta, los resultados que se observan deben interpretarse que se deben a que la nanopartícula anisotrópica tiene el mismo coeficiente de difusión que el de una esférica con un diámetro hidrodinámico igual al de la distribución encontrada. Por otra parte, el pico de distribución que se obtiene a valores de tamaño pequeños representaría el coeficiente de difusión rotacional de la partícula anisotrópica.¹⁸⁻²¹ Por tanto, los resultados que se obtienen en las medidas DLS de nanopartículas anisotrópicas no son distribuciones de tamaño real y no se corresponden con las dimensiones de longitud ni espesor de la nanopartícula. En la Figura 16 se muestran los picos de distribución de tamaños como porcentajes de intensidad, obtenidos para los AuNTs y el bioconjugado AuNT-Hb a dos valores de pH diferentes.

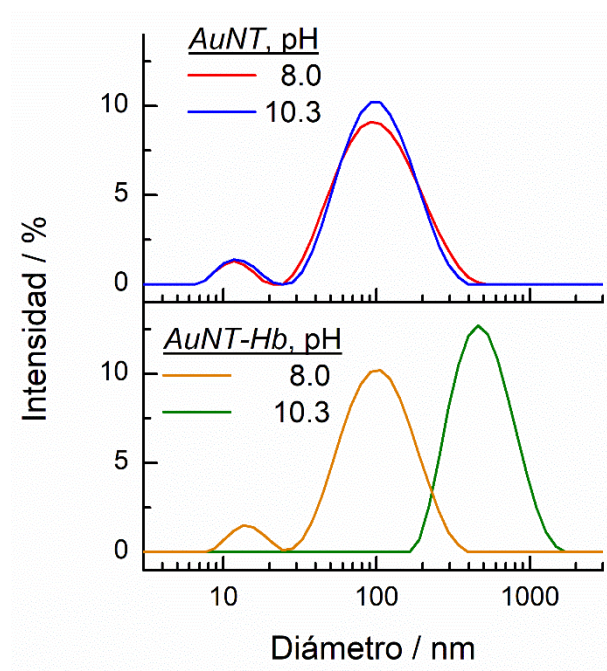


Figura 16. Distribución de tamaños obtenidos como porcentajes de intensidad para AuNTs y AuNT-Hb a diferentes pH.

En el caso de AuNTs se obtienen señales similares independientemente del valor de pH de medida. Se observan, no obstante, dos picos a 12 nm y 95 nm que deben tomarse como medidas de los coeficientes de difusión rotacional y translacional de una partícula esférica de esos diámetros, respectivamente.

Es interesante destacar que, aunque la técnica no permita determinar el tamaño exacto de los AuNTs, aún sigue siendo válida para comprobar la interacción con proteínas y la formación de los bioconjugados. En efecto, en la Figura 16 se observa que, en el caso de los bioconjugados se obtienen picos con distribución de tamaños diferentes al caso de AuNTs. Así, a pH 8, se observan dos picos a 14 nm y 102 nm que darían cuenta de la presencia de la *corona* de proteínas rodeando a las nanopartículas. En cambio, a pH 10.3, se observa un solo pico a 470 nm, un valor de tamaño mucho mayor que debe corresponder a un agregado de AuNT-Hb que se forma bajo esas condiciones experimentales.

Estos estudios se han llevado a cabo como una valoración en función del pH, como se recoge en la Figura 17. De acuerdo con lo observado con espectroscopia UV-visible-NIR, los bioconjugados, al igual que los AuNTs libres se mantienen dispersos en disolución y, como se ve en la medida del tamaño hidrodinámico, aislados. A partir de pH 10 se empieza a observar un aumento drástico del tamaño, que es mucho más acusado en el caso del bioconjugado. Este hecho está de acuerdo con la forma de asociarse descrita anteriormente a partir de los resultados de espectroscopia UV-visible-NIR y TEM. Así, la unión *side-by-side* afecta en menor medida a los coeficientes de difusión, mientras que la interacción *end-to-end* comienza a influir este parámetro de forma más importante. Lo que se observa en la Figura 17 es, por tanto, un resultado aparente, ya que el cambio abrupto de tamaño en el bioconjugado debe estar más relacionado con la forma del agregado que con su masa.

Las medidas de potencial Zeta están de acuerdo con la presencia de carga superficial positiva en medio ácido tanto para los AuNTs, como para los bioconjugados y para la propia proteína Hb. En el caso de la proteína, el potencial disminuye de forma importante marcando un punto de inflexión en torno a pH 6.4, próximo al valor del punto isoeléctrico de Hb. Los AuNTs mantienen el potencial superficial positivo en un amplio intervalo de pH. Este valor positivo viene de la modificación superficial con CTAB y, solo al alcanzar valores de pH alcalino, el potencial comienza a disminuir. Esta disminución de potencial, aunque no llega al valor cero, debe ser la causante de la agregación observada. En el caso del bioconjugado, se produce también una disminución del potencial zeta llegando a un valor nulo cuando el pH es 10.8. Este valor

coincide con el aumento brusco del tamaño de los agregados y con la inflexión observada en la variación de la absorbancia y de la longitud de onda del plasmon superficial obtenida mediante espectroscopia UV-visible-NIR (Figura 12). Es interesante destacar que, la presencia de los AuNTs cambia en varias unidades de pH (~ 4 a 5 unidades) el valor aparente del punto isoeléctrico de la proteína cuando forma el bioconjugado.

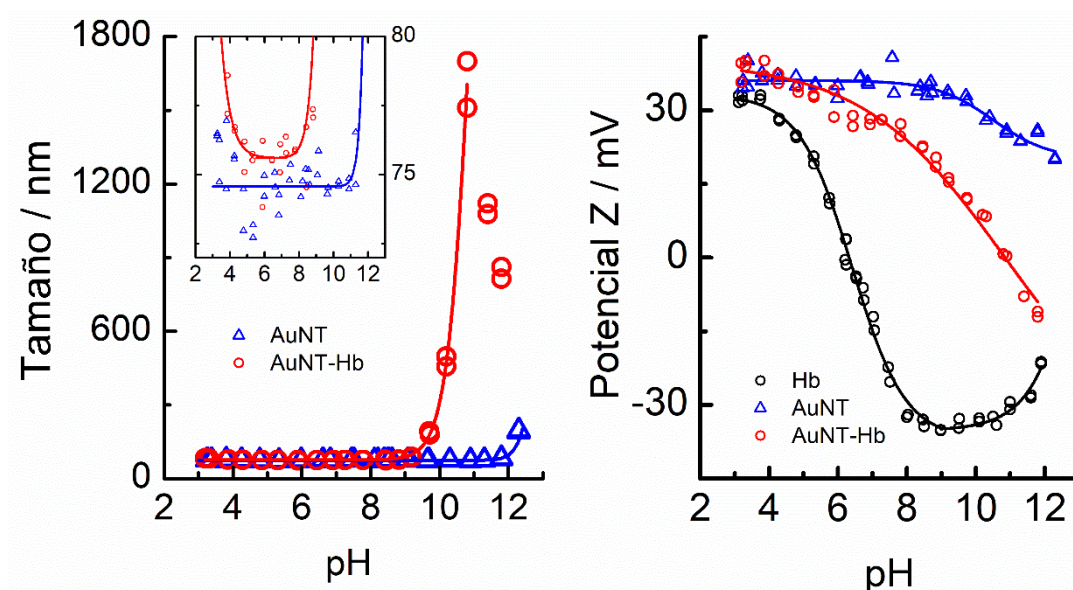


Figura 17. Medidas de (izquierda) tamaño de partículas mediante DLS y (derecha) Potencial Z en función del pH.

5.3.7. Estabilidad del bioconjugado AuNT-Hb en función de la temperatura.

Con el objeto de obtener más información sobre la estabilidad de la proteína cuando forma parte de la *corona* que protege al AuNT, se ha llevado a cabo un estudio en función de la temperatura. Para ello se realiza un estudio mediante espectroscopia UV-visible-NIR mientras se cambia la temperatura en forma continua desde 15 a 95 °C. El experimento se lleva a cabo tanto con la proteína libre como con el bioconjugado. En la Figura 18 se muestran los espectros obtenidos para Hb (parte superior), al aumentar la temperatura registrándose los espectros a intervalos de 5 °C, hasta llegar a 95 °C y, en la parte inferior, se muestran los espectros obtenidos durante la rampa de bajada desde 95 a 15 °C. Asimismo, se muestran las variaciones de absorbancia y longitud de onda de

la banda Soret de la proteína. Como puede observarse, la banda Soret se encuentra a 405 nm a temperatura ambiente y se desplaza hasta 411 nm al aumentar esta variable mostrando una inflexión a 79 °C. Al mismo tiempo, se produce una disminución de la absorbancia que describe un comportamiento similar, siendo en este caso la inflexión en torno a 66 °C. Cuando se somete a la proteína a la rampa de temperatura en sentido descendente se produce un aumento de la absorbancia junto con un desplazamiento de la longitud de onda hacia valores más bajos, aunque no se llegan a obtener los valores de partida. Debe concluirse que la proteína trata de recuperar su estructura, obteniéndose la inflexión a un valor similar de temperatura, pero el cambio de conformación que se ha producido no es totalmente reversible, ya que no se recupera el valor de la longitud de onda de la banda Soret a 405 nm ni el valor de absorbancia inicial.

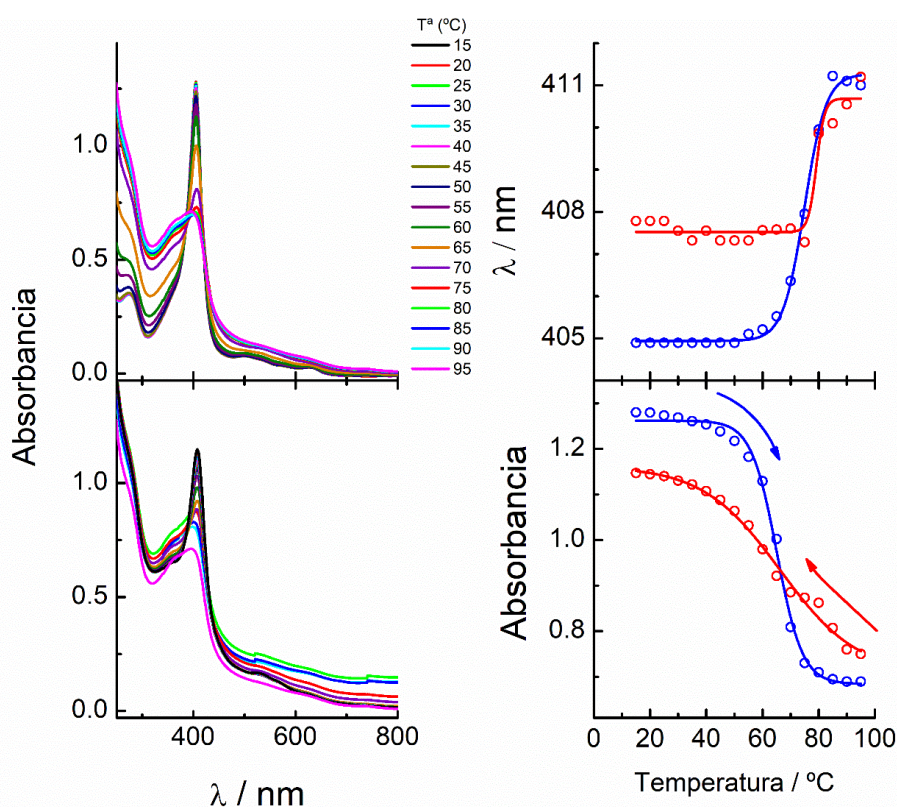


Figura 18. Estudio de la estabilidad de la proteína Hb en función de la temperatura mediante espectroscopia UV-visible-NIR. Cambios en la longitud de onda y absorbancia de la banda Soret en función de la temperatura.

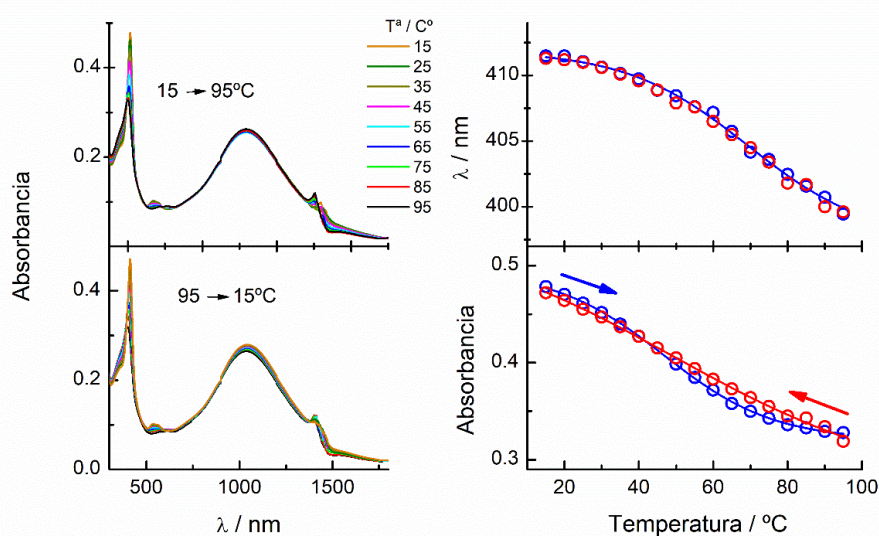


Figura 19. Estudio de la estabilidad del bioconjugado AuNT-Hb en función de la temperatura mediante espectroscopia UV-visible-NIR. Cambios en la longitud de onda y absorbancia de la banda Soret en función de la temperatura.

Se ha realizado un estudio en función de la temperatura, bajo las mismas condiciones experimentales usadas para la proteína libre, en presencia de los AuNTs, es decir, después de formar el bioconjugado. Como se observa en la Figura 19, la banda del plasmon superficial no cambia al pasar de 15 a 95 °C. Sin embargo, pueden detectarse algunos cambios en la región de la banda Soret de la proteína. Se ha determinado la variación tanto de la longitud de onda como de la absorbancia de esta banda y su comportamiento frente al pH se muestra también en la Figura 19. Hay que recordar que, cuando se forma el bioconjugado, la banda Soret cambia a 411 nm. Ahora, al aumentar la temperatura, se produce un desplazamiento al azul, aunque esta variación tiene una tendencia suave que no llega a tener la forma sigmoideal típica de estos procesos. Igualmente ocurre con la variación de la absorbancia en función de la temperatura. No obstante, lo más interesante es que la banda se recupera totalmente al invertir esta variable y alcanzar de nuevo los 15 °C. En la Figura 20 se muestran los espectros obtenidos en el estado inicial de temperatura ambiente, alta temperatura y de nuevo la temperatura ambiente. Está claro que el bioconjugado recupera su estado inicial al invertir la temperatura. Por otra parte, se pueden intuir los cambios que se producen en las bandas Q como consecuencia del cambio en el entorno del grupo hemo. Así, se observa que las bandas a 530 y 560 nm que acompañan a la banda Soret a 411 nm,

cambian hasta 625 nm a alta temperatura en paralelo con el desplazamiento de la banda Soret a 400 nm (Figura 21). Estos espectros muestran un punto isobéptico a 585 nm indicando la existencia de un intercambio de especies bajo estas condiciones experimentales. Al igual que ocurre con el resto de los detalles en los espectros este cambio es totalmente reversible como queda reflejado en el insert de la Figura 20.

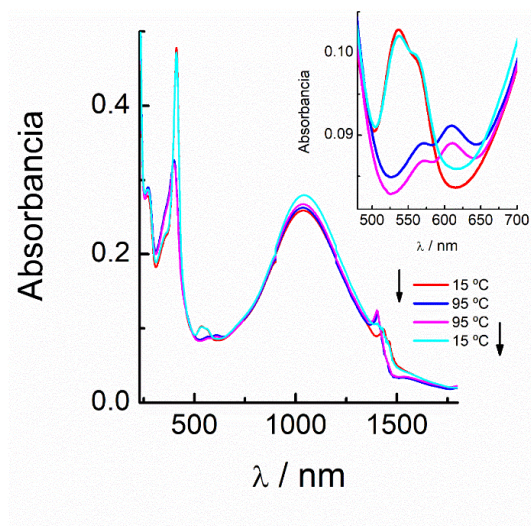


Figura 20. Espectros del bioconjugado AuNT-Hb a las temperaturas inicial, máxima y final en el experimento de rampa de temperatura. Insert: detalle de las bandas Q.

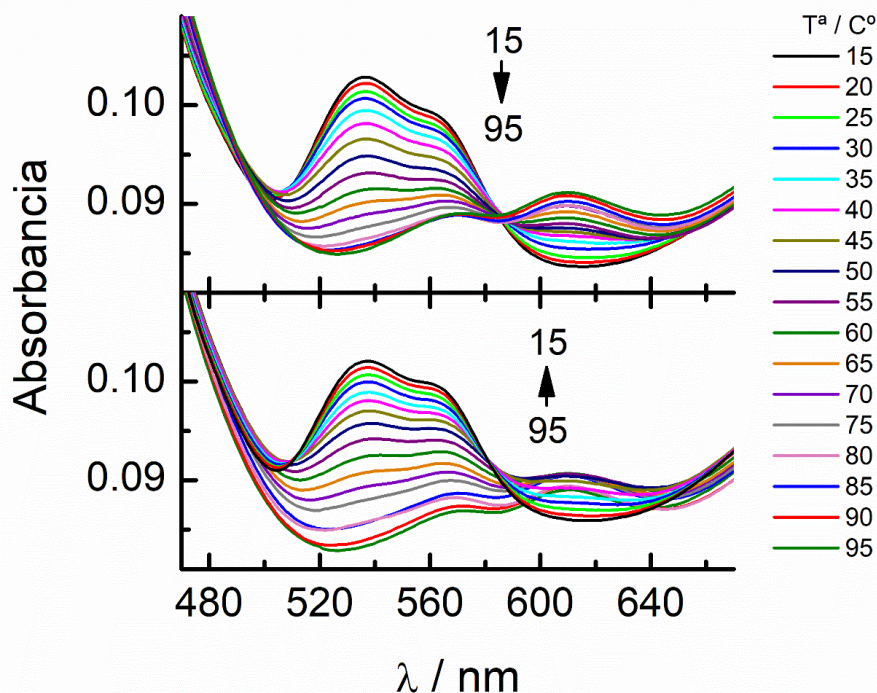


Figura 21. Detalle de las bandas Q de los espectros mostrados en la Figura 19 en función de la temperatura.

Por tanto, puede concluirse que la proteína Hb adquiere una conformación cuando forma el bioconjugado con los AuNTs que soporta cambios con la temperatura de forma reversible que no es capaz de soportarlos en su forma libre.

5.3.8. Estudio de la transferencia electrónica de los bioconjugados.

En esta última sección se describe el comportamiento electroquímico de los bioconjugados AuNT-Hb. Para este estudio, se sigue el mismo procedimiento empleado en los Capítulos 3 y 4, con las AuNPs y AuNRs. Así, una vez formado el bioconjugado, se depositan varias gotas (3 μL) de la disolución sobre un electrodo de carbón vitrificado (GC) y, una vez evaporado el disolvente, se cubre con una película delgada de Nafion y se procede a las medidas electroquímicas.

Los VCs obtenidos a diferentes velocidades de barrido se muestran en la Figura 22. Como puede observarse, la proteína sufre un proceso redox típico, al igual que ocurría con las otras nanopartículas de oro, pero hay que destacar que en este caso los picos anódico y catódico quedan mejor definidos que en los casos anteriores. En los VCs a baja velocidad de barrido se observan los picos anódico y catódico a -0.24 y -0.29 V, respectivamente. El valor de $E_{1/2}$ es, por tanto, -0.26 V, siendo este valor más alto que en el caso de AuNP-Hb y CTAB-, MUA-AuNR-Hb que mostraban valores de -0.37, -0.31 y -0.35 V, respectivamente.

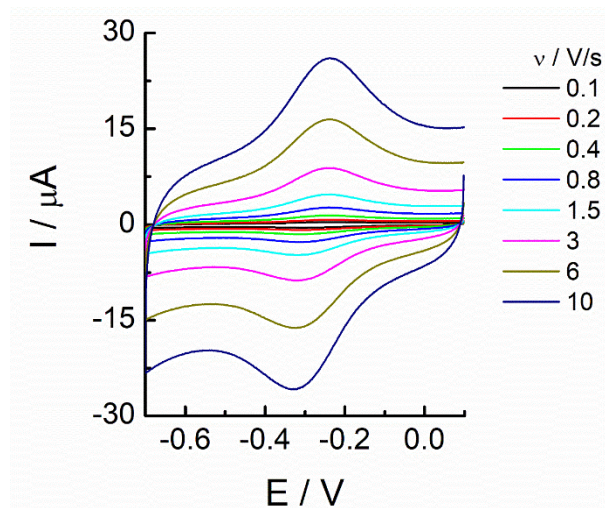


Figura 22. VCs del bioconjugado AuNT-HB a diferentes velocidades de barrido.

La forma de los VCs indica que los procesos redox que se observan tienen lugar en la superficie del electrodo. No obstante, se ha llevado a cabo el análisis de la corriente de los picos anódico y catódico, observándose que ambos son proporcionales a la velocidad de barrido, de acuerdo con la ecuación (1) del Capítulo 3. Asimismo, la representación logarítmica muestra pendientes cercanas a la unidad, de nuevo, confirmando esta hipótesis.

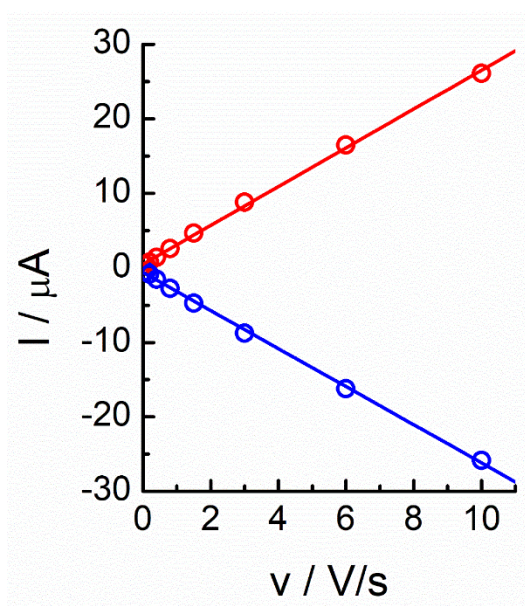


Figura 23. Representación de la corriente de los picos anódico y catódico de los VCs de la Figura 22 en función de la velocidad de barrido.

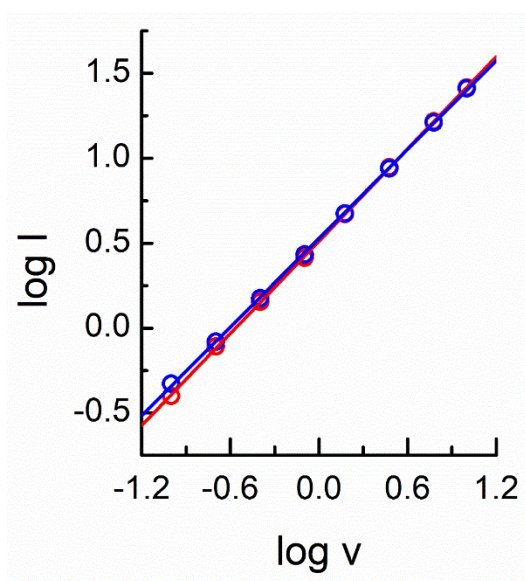


Figura 24. Representación logarítmica de la corriente de los picos anódico y catódico de los VCs de la Figura 21 en función de la velocidad de barrido.

La mayor definición de los picos voltamperométricos ha permitido llevar a cabo una sustracción de la corriente de carga tanto para la traza anódica como para la catódica. Los registros obtenidos se muestran en la Figura 25. De esta forma se ha podido determinar de forma precisa tanto las densidades de carga involucradas en el proceso como la semianchura de los picos anódico y catódico. Los resultados se recogen en la Figura 26.

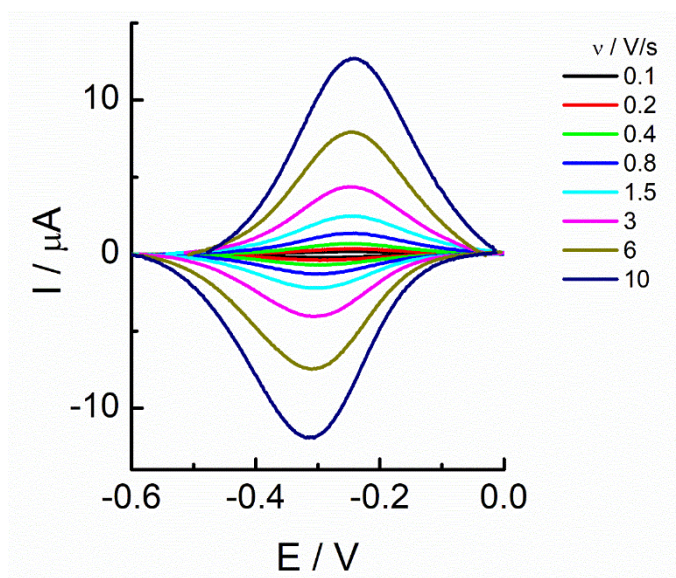


Figura 25. CVs del bioconjugado AuNT-Hb, mostrados en la Figura 21, después de sustraer la corriente de carga.

En el presente caso, no se conoce el coeficiente de extinción molar de los AuNTs y, por otra parte, la muestra es bastante polidispersa. Para que el experimento realizado con los AuNTs sea de alguna manera comparable a los realizados con AuNRs y AuNPs, se ha utilizado una disolución con una absorbancia en la región del plasmon superficial similar a la usada con estas nanopartículas. Por otra parte, se ha añadido la misma concentración y volumen de proteína. De esta manera, se puede determinar que la carga máxima que podría obtenerse, si todas las moléculas de Hb añadidas pudieran ser electroactivas es de $15 \mu\text{C}$. Esta cantidad de carga es mucho mayor que la que se obtiene en cualquiera de los experimentos realizados. Por tanto, lo que puede concluirse a partir de la carga medida en el presente experimento es que es del orden de la que se obtiene en el caso de las nanopartículas con otras formas y tamaños.

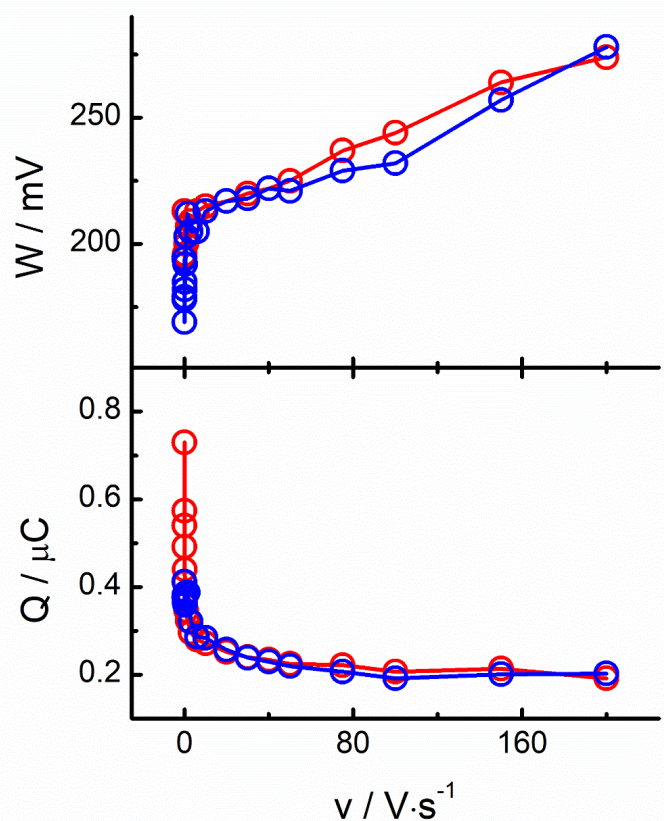


Figura 26. Representación de la anchura a la mitad de la altura (W) y la carga involucrada en los procesos de oxidación (azul) y reducción (rojo) del bioconjugado AuNT-Hb.

Así, en la Figura 26, se puede también observar que la anchura media de los picos de los VCs es mayor que la teórica para un proceso monoelectrónico confinado en la superficie (90.6 mV) y que en los Capítulos 3 y 4 se ha explicado que es una consecuencia de la distribución espacial de los centros redox en multicapas que rodean a la nanopartícula,²² o bien como consecuencia de una población heterogénea de proteínas adsorbidas de manera no uniforme que da lugar a diferentes entornos de adsorción y, por tanto, una distribución de estados redox diferentes.²³⁻²⁵ Por tanto, cabe pensar que, bajo las condiciones experimentales del presente caso, se da el mismo patrón que en los casos estudiados en los capítulos anteriores. Aunque a altas velocidades de barrido, se obtiene un valor similar de las cargas catódica y anódica, en el intervalo de bajas velocidades ($v < 1\text{V/s}$) las cargas de reducción son prácticamente el doble que las de oxidación.

Ya que el mecanismo de transferencia de carga involucra la transferencia electrónica directa entre el electrodo y el sitio redox y que la propagación de la reacción

redox dentro de la película y más allá de la distancia túnel desde el electrodo requiere el intercambio de electrones entre sitios vecinos, se puede observar, bajo las condiciones de este trabajo un evento de “*electron hopping*”.²⁶ De esta forma, las velocidades de transporte y transferencia de carga y su dependencia con las variables experimentales no pueden extrapolarse al caso de multicapas ordenadas que exhiben la capacidad de controlar la naturaleza y la carga de las capas y, ya que el modelo de Laviron^{22, 27} trata centros redox localizados en planos bien definidos, se ha propuesto un modelo²⁶ que permite que el potencial varíe con la distancia del centro redox a la superficie del electrodo. Se observa que la diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción (ΔE^0) a bajas velocidades de barrido no es cero, sino que alcanza un valor constante a unos 58 mV, muy cerca del valor esperado para un sistema controlado por difusión. Este fenómeno se observa cuando la difusión puede penetrar solo el primer plano y, por tanto, a velocidades mayores, se restaura el comportamiento de capa delgada. Cuando la transferencia de carga es más lenta que el transporte de carga, el primer proceso enmascara la separación de picos y no permite observar el fenómeno difusivo. Como se muestra en la Figura 27, a bajas velocidades de barrido ($v < 5$ V/s), se obtienen el comportamiento descrito, encontrándose una separación entre los picos en torno a los 58 mV. Es de destacar que las tendencias de los potenciales de oxidación y reducción se vuelven asimétricas a altas velocidades. Esta asimetría viene dictada por la tendencia del potencial de pico que también varía con la velocidad.

En la Figura 28 se muestra la variación de los potenciales anódico y catódico, una vez que se elimina la contribución de E^0 , y se recupera la simetría de las ramas, como acaba de comentarse. Utilizando las ecuaciones (4) y (6) del Capítulo 3, se puede determinar un valor de $\alpha = 0.46$ y $k_s = 333.8$ s⁻¹. Es de destacar el mayor valor de la constante de transferencia de carga obtenido bajo estas condiciones experimentales para el bioconjugado AuNT-Hb.

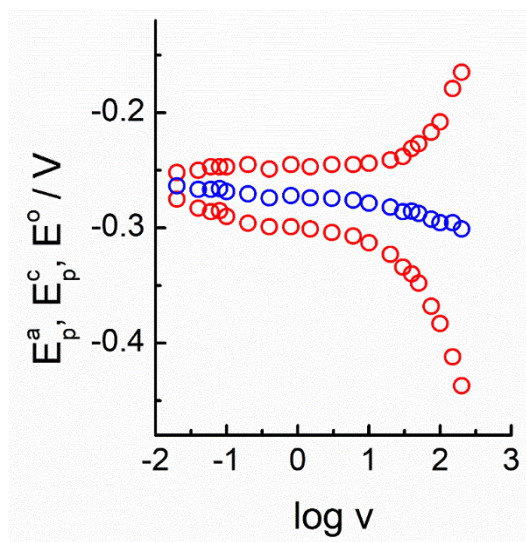


Figura 27. Variación de los potenciales de pico catódico y anódico y del potencial de onda media de los bioconjugados en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

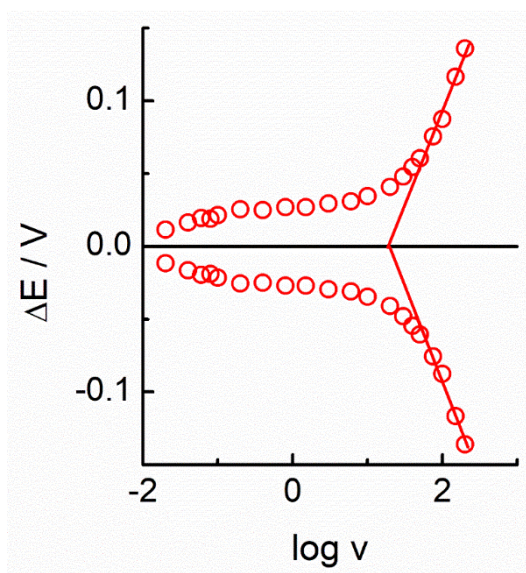


Figura 28. Variación de los potenciales de pico (después de sustraer el potencial de onda media) en función del logaritmo de la velocidad de barrido.

Por último, se ha comprobado la capacidad catalítica del bioconjugado frente a la reducción de H_2O_2 . En la Figura 29 se muestra el efecto de la adición de sustrato en el voltamperograma de AuNT-Hb. Se observa, como es de esperar, la disminución del pico anódico a la vez que la señal catalítica aumenta en forma proporcional a la concentración de H_2O_2 .

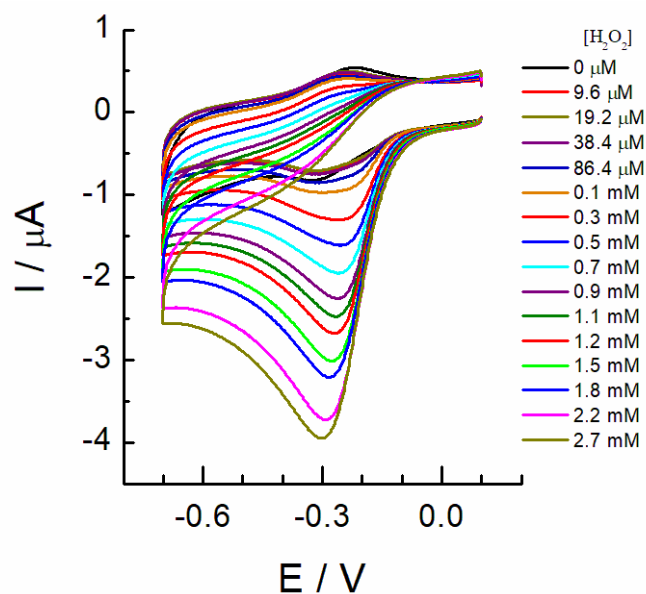


Figura 28. Efecto de la adición de concentraciones crecientes de H_2O_2 a una disolución tampón de fosfato 50 mM a pH 7.4 con un electrodo de carbono vítreo en el que se ha depositado el bioconjugado AuNT-Hb.

El análisis de la corriente de reducción de H_2O_2 mediante la ecuación de Lineawer-Burk permite determinar un valor de $I_{max} = 4.6 \mu A$ y $K_M = 0.97 \text{ mM}$. Este valor de K_M es menor que los obtenidos con los otros bioconjugados poniendo de manifiesto que la forma de prisma triangular imprime un mayor efecto catalítico al bioconjugado.

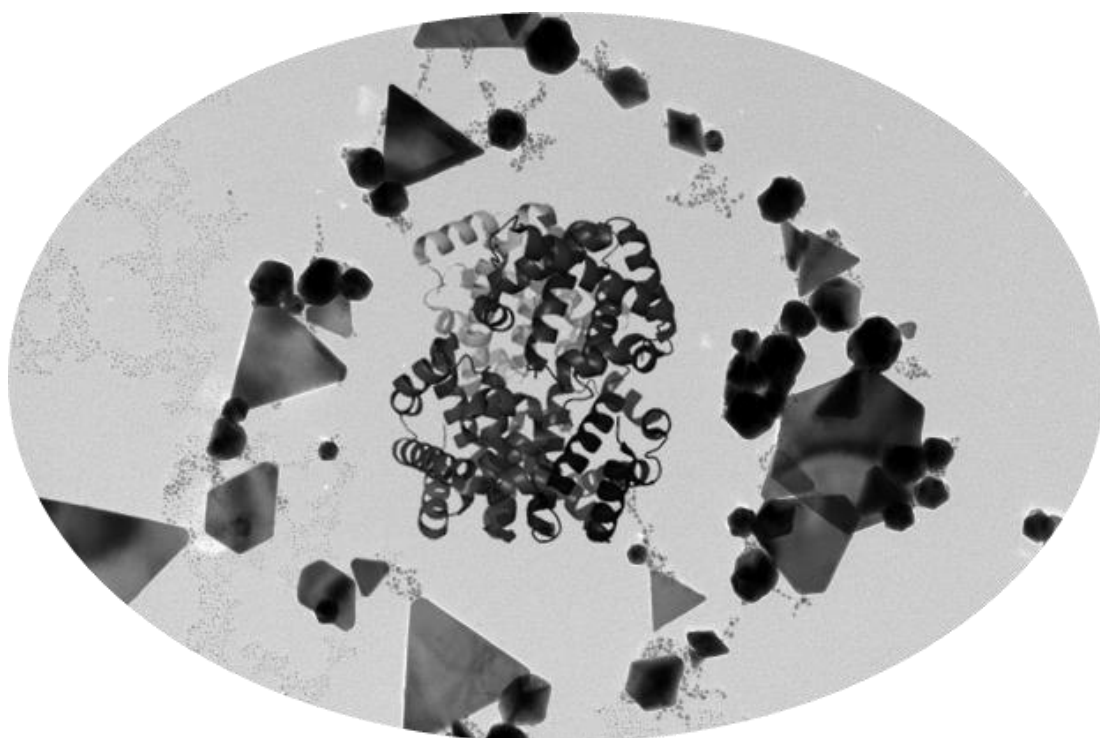
5.4. Bibliografía

1. Kim, F.; Connor, S.; Song, H.; Kuykendall, T.; Yang, P. D., Platonic gold nanocrystals. *Angew. Chem.* **2004**, *43* (28), 3673-3677.
2. Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, *382* (6592), 607-609.
3. Jin, R. C.; Cao, Y. C.; Hao, E. C.; Metraux, G. S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A., Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. *Nature* **2003**, *425* (6957), 487-490.
4. Jin, R. C.; Cao, Y. W.; Mirkin, C. A.; Kelly, K. L.; Schatz, G. C.; Zheng, J. G., Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science* **2001**, *294* (5548), 1901-1903.
5. Millstone, J. E.; Park, S.; Shuford, K. L.; Qin, L. D.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A., Observation of a quadrupole plasmon mode for a colloidal solution of gold nanoprisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (15), 5312-5313.

6. Millstone, J. E.; Metraux, G. S.; Mirkin, C. A., Controlling the edge length of gold nanoprisms via a seed-mediated approach. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16* (9), 1209-1214.
7. McLean, J. G.; Krishnamachari, B.; Peale, D. R.; Chason, E.; Sethna, J. P.; Cooper, B. H., Decay of isolated surface features driven by the Gibbs-Thomson effect in an analytic model and a simulation. *Phys. Rev. B* **1997**, *55* (3), 1811-1823.
8. Lofton, C.; Sigmund, W., Mechanisms controlling crystal habits of gold and silver colloids. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15* (7), 1197-1208.
9. Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; del Pino, P.; de la Fuente, J. M., Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965-8970.
10. He, J.; Unser, S.; Bruzas, I.; Cary, R.; Shi, Z. W.; Mehra, R.; Aron, K.; Sagle, L., The facile removal of CTAB from the surface of gold nanorods. *Colloids Surf. B* **2018**, *163*, 140-145.
11. Koglin, E.; Tarazona, A.; Kreisig, S.; Schwuger, M. J., In-situ investigations of coadsorbed cationic surfactants on charged surfaces: a SERS microprobe study. *Colloids Surf. A* **1997**, *123-124*, 523-542.
12. Tebbe, M.; Kuttner, C.; Männel, M.; Fery, A.; Chanana, M., Colloidally Stable and Surfactant-Free Protein-Coated Gold Nanorods in Biological Media. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (10), 5984-5991.
13. Jain, P. K.; Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Plasmon coupling in nanorod assemblies: Optical absorption, discrete dipole approximation simulation, and exciton-coupling model. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (37), 18243-18253.
14. Park, H.-S.; Agarwal, A.; Kotov, N. A.; Lavrentovich, O. D., Controllable Side-by-Side and End-to-End Assembly of Au Nanorods by Lyotropic Chromonic Materials. *Langmuir* **2008**, *24* (24), 13833-13837.
15. Hu, S.; Smith, K. M.; Spiro, T. G., Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (50), 12638-12646.
16. Abe, M.; Kitagawa, T.; Kyogoku, Y., Resonance Raman spectra of octaethylporphyrinato-Ni(II) and meso-deuterated and 15N substituted derivatives. II. A normal coordinate analysis. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69* (10), 4526-4534.
17. Spiro, T. G.; Strekas, T. C., Resonance Raman-Spectra of Heme Proteins - Effects of Oxidation and Spin State. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (2), 338-345.
18. Liu, H.; Pierre-Pierre, N.; Huo, Q., Dynamic light scattering for gold nanorod size characterization and study of nanorod-protein interactions. *Gold Bulletin* **2012**, *45* (4), 187-195.
19. Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Lang, P. R., Dynamic Light Scattering of Short Au Rods with Low Aspect Ratios. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (13), 5020-5025.
20. van der Zande, B. M. I.; Dhont, J. K. G.; Böhmer, M. R.; Philipse, A. P., Colloidal Dispersions of Gold Rods Characterized by Dynamic Light Scattering and Electrophoresis. *Langmuir* **2000**, *16* (2), 459-464.

21. Antoniou, E.; Voudouris, P.; Larsen, A.; Loppinet, B.; Vlassopoulos, D.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M., Static and Dynamic Plasmon-Enhanced Light Scattering from Dispersions of Polymer-Grafted Silver Nanoprismes in the Bulk and Near Solid Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (6), 3888-3896.
22. Laviron, E.; Roullier, L.; Degrand, C., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 11-23.
23. Clark, R. A.; Bowden, E. F., Voltammetric peak broadening for cytochrome c/alkanethiolate monolayer structures: Dispersion of formal potentials. *Langmuir* **1997**, *13* (3), 559-565.
24. Doan, T. T.; Vargo, M. L.; Gerig, J. K.; Gulka, C. P.; Trawick, M. L.; Dattelbaum, J. D.; Leopold, M. C., Electrochemical analysis of azurin thermodynamic and adsorption properties at monolayer-protected cluster film assemblies – Evidence for a more homogeneous adsorption interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352* (1), 50-58.
25. Beissenhirtz, M. K.; Scheller, F. W.; Lisdat, F., A Superoxide Sensor Based on a Multilayer Cytochrome c Electrode. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (16), 4665-4671.
26. Tagliacruzchi, M.; Calvo, E. J., Charge Transport in Redox Polyelectrolyte Multilayer Films: The Dramatic Effects of Outmost Layer and Solution Ionic Strength. *Chemphyschem* **2010**, *11* (13), 2957-2968.
27. Laviron, E., A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes: Part I. Description and discussion of the model. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *112* (1), 1-9.

Capítulo / Chapter 6



Conclusiones / Conclusions

1. Las metodologías de síntesis empleadas en este trabajo están basadas en la reducción de ácido tetracloroaúrico con reductores suaves tales como aniones citrato, ácido ascórbico y tiosulfato sódico. La naturaleza del agente reductor, así como la presencia o no de surfactantes en el medio de reacción son el punto clave para dirigir hacia la obtención de determinadas formas y tamaños en el material resultante. Las NPs esféricas y cilíndricas se obtienen en forma monodispersa mientras que las que adquieren morfología de prisma triangular precisan de un paso posterior de separación de semillas.
2. Los AuNRs prístinos están protegidos por una bicapa de CTAB fuertemente adherida a la superficie. Esta bicapa se forma durante la fase de crecimiento de los nanocilindros y, como pone de manifiesto la espectroscopia Raman, interaccionan con la superficie del oro a través de las cabezas de tetrametil amonio actuando los aniones bromuro como puntos de unión entre los átomos de oro y los grupos tetrametil amonio cargados positivamente. La ausencia de esta señal en el espectro Raman de los AuNTs que se han sometido a depleción con CTAB pone de manifiesto que, en este caso, la capa protectora es de distinta naturaleza estructural. Otra evidencia en el mismo sentido viene del comportamiento electroquímico. En el caso de los AuNRs crecidos en presencia de CTAB se observa un fenómeno de transición de fase desde una estructura ordenada a otra desordenada. De nuevo, esta transición no se produce en los AuNTs, apuntando a la ausencia de estructura en forma de bicapa en este caso.
3. El intercambio de ligandos en AuNPs se produce de forma eficiente cuando se usan mercaptoderivados como MP o MUA. La presencia de estas capas moleculares en forma de monocapas autoensambladas confieren una nueva identidad a las AuNPs y ello queda plasmado en su estabilidad en disoluciones acuosas.

El intercambio de ligandos en AuNRs es más complejo. Las condiciones experimentales son ahora más demandantes y ello es consecuencia de la presencia de la bicapa de CTAB que se encuentra fuertemente adsorbida y estrechamente empaquetada sobre la superficie de los AuNRs. No obstante, se ha conseguido un

intercambio efectivo con los ácidos MUA y MHDA. La prueba de esta eficacia viene de los resultados obtenidos mediante espectroscopias XPS y Raman que indican la ausencia de bromuro sobre la superficie de los NRs así como la presencia de otras señales debidas a los nuevos componentes. Otras evidencias vienen de resultados de espectroscopia IR y electroquímicos.

4. Los AuNRs modificados con MUA o MHDA muestran un comportamiento característico en disoluciones acuosas que deriva del propio procedimiento de intercambio y de la estructura de las moléculas que se intercambian. Así, a pesar de la diálisis exhaustiva y de los pasos precipitación-redispersión, las moléculas de MUA y MHDA quedan adheridas e interdigitadas, respectivamente, en las monocapas autoensambladas formadas sobre el oro. Esta disposición de las moléculas se manifiesta en un comportamiento distinto en función del pH de la disolución lo que se evidencia también mediante microscopía TEM que indica que, mientras que los MUA-AuNRs se ensamblan en conformación *end-to-end*, probablemente mediante asociación por enlaces de H, los MHDA-AuNRs lo hacen en conformación *side-by-side*. En el caso de los AuNTs, se observa un comportamiento en disolución similar al obtenido con CTAB-AuNRs. Además, mediante microscopía TEM se observa una preferencia por el ensamblado mediante apilamiento en forma *side-by-side*, en medios alcalinos.
5. La formación de bioconjugados con la proteína Hb se ha observado con todos los NMs estudiados. La formación del bioconjugado se evidencia por los pequeños desplazamientos que se producen en las bandas LSPR debido a los cambios en el índice de refracción de las capas que rodean al NM, en este caso, la *corona* de proteínas.

En el caso de las AuNPs, el comportamiento de los bioconjugados en disoluciones de diferente pH es similar e independiente de la capa protectora de la nanopartícula, ya sean aniones citrato, MP o MUA. Sin embargo, la estructura de la proteína, en lo que respecta al entorno próximo al grupo hemo, presenta algunos cambios, lo que estaría relacionado con la adopción de diferentes orientaciones, en función de la naturaleza

química de la monocapa protectora. En medio alcalino, los bioconjugados AuNP-Hb poseen un potencial Z negativo, al igual que las AuNPs y la propia Hb. El valor de pI del bioconjugado se encuentra entre los de las AuNPs y la Hb. Hay que señalar que los fenómenos de desestabilización observados mediante diferentes técnicas consisten en la formación de agregados, lo que se pone de manifiesto mediante DLS. El fenómeno de agregación se ha observado también mediante espectroscopia ATR-IR, observándose la aparición de efecto SEIRAS. Además, el análisis de la banda amida I de la proteína pone de manifiesto que la formación de agregados va acompañada de una disminución del contenido de estructura α -hélice en paralelo con un aumento de estructura de lámina- β y del componente A_1 que se relaciona con las interacciones intermoleculares. Puede concluirse que, en el estado agregado, las interacciones intermoleculares aumentan y desestabilizan, en cierta medida, la estructura α -hélice de la proteína Hb.

Los bioconjugados formados con AuNRs presentan una alta estabilidad en medios acuosos, en particular en medio neutro y débilmente ácido o alcalino. En el caso de CTAB-AuNR-Hb, en medio fuertemente ácido, se observa una tendencia a la asociación *end-to-end* sin precipitación. En medio alcalino se produce una desestabilización similar a la que sufre el AuNR en ausencia de proteína, lo que indicaría la desorción de ésta bajo estas condiciones. Además, los cambios observados en la banda Soret apuntan a que se produce la desnaturalización de la proteína, probablemente debido a la presencia de CTAB a una concentración mayor que su concentración micelar crítica. El bioconjugado MUA-AuNR-Hb muestra algunas diferencias significativas. En particular, la banda Soret se desplaza a los valores propios de la especie hemicromo (411 nm) al formarse el bioconjugado y ocurre en paralelo con la aparición de bandas a 537 y 560 nm. Este comportamiento, que se observa en la proteína nativa a $pH > 10$, se produce en el bioconjugado desde medio neutro, adelantándose por más de dos unidades de pH . Los espectros Raman de los bioconjugados muestran los fenómenos de resonancia y SERS. De esta forma, se han podido observar las señales conocidas como marcadores del estado de oxidación, que indican que el Fe hémico en CTAB-AuNR-Hb, se encuentra en estado de Fe(II), al igual que en la proteína libre, mientras que en el caso de MUA-AuNR-Hb,

se encontraría en su estado oxidado Fe(III). En cuanto al estado de espín, las bandas marcadoras indican que, en ambos casos, el Fe hémico se encontraría en estado de bajo espín.

Los bioconjugados formados con AuNTs provocan también un cambio en la Hb hacia la especie hemicromo al producirse la interacción. A diferencia de lo que ocurría con CTAB-AuNR-Hb, los cambios observados en la estabilidad en medio alcalino no se corresponderían con la desorción de la proteína sino con la asociación de los bioconjugados en forma *side-by-side*, como se pone de manifiesto mediante microscopía TEM. Por otra parte, la especie que se encuentra formando el bioconjugado es la especie oxidada Fe(III) en su forma de bajo espín, como se ha observado en espectroscopía Raman. La gran estabilidad de los AuNTs y de los bioconjugados que forman se ha observado también mediante DLS. La combinación de estos resultados con los de espectroscopía UV-visible-NIR permiten corroborar la agregación en medio alcalino en las formas *side-by-side* y *end-to-end*, para los AuNTs y los AuNT-Hb, respectivamente, y concluir que esta última forma de ensamblaje conduce a mayores valores de diámetros hidrodinámicos que la primera y mayor efecto en la agregación. Por último, el bioconjugado AuNT-Hb resiste altas temperaturas sin sufrir agregación y, mucho más interesante, provoca que los cambios que se producen en la proteína que forma el bioconjugado sean reversibles, a diferencia de lo que ocurre con la Hb libre que sufre una transición conformacional a 70 °C que conduce a un estado que no es capaz de recuperarse totalmente al invertir la temperatura.

6. La presencia del NM en el entorno de la proteína Hb le confiere electroactividad, en contraste con lo que ocurre con la proteína libre. Los estudios realizados para caracterizar la respuesta electroquímica mediante voltamperometría cíclica señalan que el proceso se separa del comportamiento ideal mostrando picos anódicos y catódicos con semianchuras en torno a 200 mV. Este hecho se explicaría por la presencia de diferentes microentornos en las proteínas que forman la *corona* además de la propia complejidad de la propia Hb que consta de 4 monómeros, cada uno con su grupo hemo que es la especie electroactiva. Del comportamiento observado, a

partir de los cambios en la carga involucrada en los procesos electroquímicos frente a la velocidad de barrido, se deduce que la presencia de multicapas formando la *corona* proteica provoca que, a bajas velocidades, puedan experimentar el proceso redox una mayor cantidad de grupos, mientras que, a altas velocidades, solo se produce el intercambio con las capas más próximas al núcleo metálico. Por otra parte, en todos los casos estudiados se obtiene una separación de los potenciales anódico y catódico en torno a 60 mV, a bajas velocidades de barrido, que estaría relacionado con las limitaciones en el transporte de carga, de acuerdo con un sistema controlado por difusión. Se supone que, en el límite de baja velocidad de barrido, la técnica de voltamperometría cíclica sondea los sitios redox y el potencial obtenido es un promedio de todos los valores de potencial en los diferentes microentornos de la película. En cambio, a alta velocidad, solo se sondean los sitios adyacentes al núcleo metálico y son los únicos que contribuyen al valor de potencial. Usando el método de Laviron se pueden determinar las constantes de velocidad del proceso de transferencia electrónica. Por último, la capacidad de transferencia electrónica de los bioconjugados permite su uso en ensayos de bioelectrocatalisis, en particular, frente a H_2O_2 y O_2 .

1. The synthesis methodologies used in this work are based on the reduction of tetrachloroauric acid with mild reducers such as citrate anions, ascorbic acid and sodium thiosulfate. The nature of the reducing agent, as well as the presence or not of surfactants in the reaction medium are the key point to lead towards obtaining certain shapes and sizes in the resulting material. Spherical and cylindrical NPs are obtained in monodisperse form whereas those that acquire triangular prism morphology require a posterior step of seed separation.
2. The pristine AuNRs are protected by a bilayer of CTAB strongly adhered to the surface. This bilayer is formed during the growth phase of the nanocylinders and, as the Raman spectroscopy reveals, they interact with the surface of the gold through the heads of ammonium tetramethyl acting the bromide anions as binding points between gold atoms and ammonium tetramethyl groups positively charged. The absence of this signal in the Raman spectrum of the AuNTs that have undergone depletion with CTAB shows that, in this case, the protective layer is of different structural nature. Another evidence in the same direction comes from electrochemical behavior. In the case of AuNRs grown in the presence of CTAB, a phase transition phenomenon is observed from an ordered structure to another disordered. Again, this transition does not occur in the AuNTs, pointing to the absence of a bilayer structure in this case.
3. The exchange of ligands in AuNPs is produced efficiently when using mercaptoderivates as MP or MUA. The presence of these molecular layers in the form of self-assembled monolayers confers a new identity on the AuNPs and this is reflected in their stability in aqueous solutions.

The exchange of ligands in AuNRs is more complex. The experimental conditions are now more demanding and this is the result of the presence of the bilayer of CTAB that is strongly adsorbed and closely packed on the surface of the AuNRs. However, an effective exchange has been achieved with the acids MUA and MHDA. The test of this efficacy comes from the results obtained by XPS and Raman spectroscopies that indicate the absence of bromide on the surface of the NRs as well as the presence of

other signals due to the new components. Other evidences come from results of IR spectroscopy and electrochemical techniques.

4. The AuNRs modified with MUA or MHDA show a characteristic behavior in aqueous solutions that derives from the procedure of exchange and the structure of the molecules that are exchanged. Thus, in spite of the exhaustive dialysis and the precipitation-redispersion steps, the molecules of MUA and MHDA remain adhered and intertyped, respectively, in the self-assembled monolayers formed on the gold. This disposition of the molecules manifests itself in a different behavior depending on the pH of the solution which is also evidenced by TEM microscopy indicating that, while the MUA-AuNRs are assembled in an *end-to-end* conformation, probably by H-bond associations, the MHDA-AuNRs make it in a *side-by-side* conformation. In the case of AuNTs, the observed behavior in solution similar to that obtained with CTAB-AuNRs. In addition, a preference is observed by TEM microscopy, for the assembly through a *side-by-side* stacking in alkaline media.
5. The formation of bioconjugates with the protein Hb has been observed with all the NMs studied. The formation of the bioconjugates is evidenced by the small displacements that occur in the LSPR bands due to changes in the refractive index of the layers that surround the NM, in this case, the protein *corona*.

In the case of the AuNPs, the behavior of the bioconjugates in solutions of different pH is similar and independent of the protective layer of the nanoparticle, whether anions citrate, MP or MUA. However, the structure of the protein, in particular, in the environment near the heme group, presents some changes, which would be related to the adoption of different orientations, depending on the chemical nature of the protective monolayer. In alkaline medium, the bioconjugate AuNP-Hb have a negative Z-potential, as well as the AuNPs and the Hb itself. The pI value of the bioconjugate is found between the AuNPs and Hb. It should be noted that the phenomena of destabilization observed by different techniques consist in the formation of aggregates, which is revealed by DLS. The aggregation phenomenon has also been observed through ATR-IR spectroscopy, showing the appearance of SEIRAS

effect. In addition, the analysis of amide-I band of the protein shows that the formation of aggregates is accompanied by a decrease in the α -helix structure content in parallel with an increase in β -sheet structure and the component A_1 that relates to intermolecular interactions. It can be concluded that, in the aggregate state, intermolecular interactions increase and destabilize, to some extent, the α -helix structure of the Hb protein.

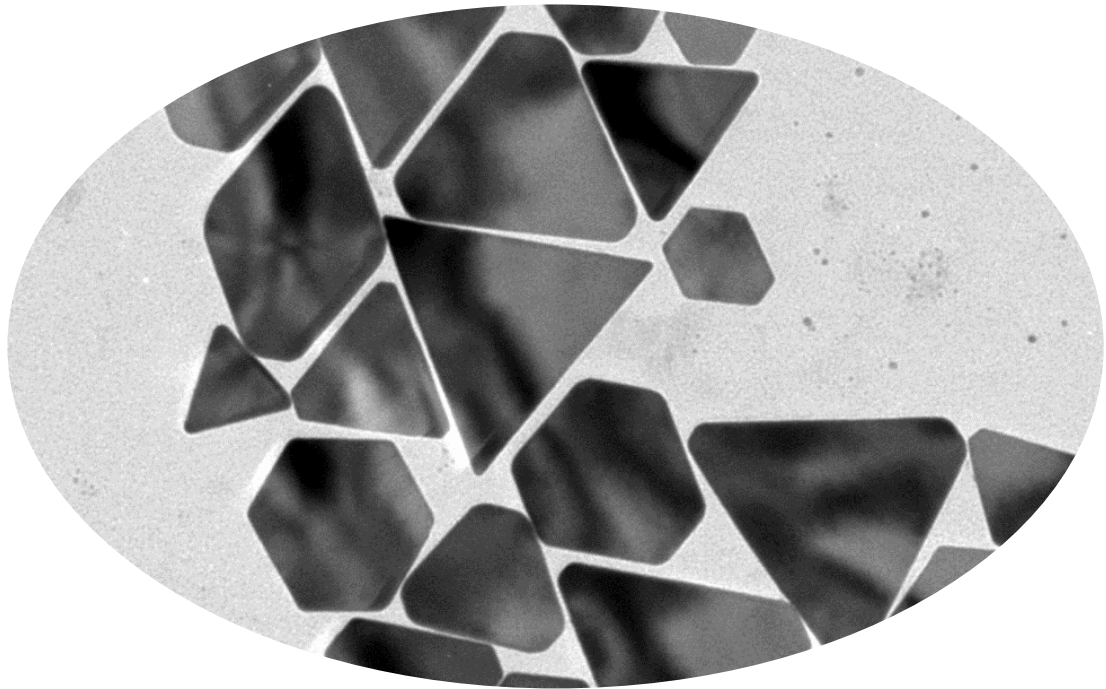
The bioconjugates formed with AuNRs present a high stability in aqueous media, particularly in neutral and weakly acidic or alkaline medium. In the case of CTAB-AuNR-Hb, in a strongly acidic medium, a tendency to *end-to-end* association is observed without precipitation. In alkaline medium there is a destabilization similar to that suffered by AuNR in the absence of protein, which would indicate the desorption under these conditions. In addition, the changes observed in the Soret band point to the denaturation of the protein, probably due to the presence of CTAB to a greater concentration than that of its critical micelle concentration. The bioconjugated MUA-AuNR-Hb shows some significant differences. In particular, the Soret band moves to the wavelength of the hemichrome species (411 nm) when the bioconjugate is formed and occurs in parallel with the appearance of bands at 537 and 560 nm. This behavior, observed in the native protein at $\text{pH} > 10$, is produced in the bioconjugates from a neutral medium, ahead of more than two pH units. The Raman spectra of the bioconjugates show the phenomena of resonance and SERS. In this way, it has been possible to observe the signals known as markers of the state of oxidation, that indicate that hemic Fe in CTAB-AuNR-Hb, is in state of Fe (II), like in the free protein, whereas in the case of MUA-AuNR-Hb, one would find in oxidized state, as Fe (III). As for the spin state, the marker bands indicate that, in both cases, the hemic Fe would be in low-spin state.

Bioconjugates formed with AuNTs also provoke a change in Hb towards the hemichrome species when the interaction occurs. Unlike what happened with CTAB-AuNR-Hb, the changes observed in the stability in alkaline medium would not correspond with the desorption of the protein but with the association of the bioconjugates in a *side-by-side form*, as revealed by TEM microscopy. On the other

hand, the species that is forming the bioconjugate is the oxidized species Fe (III) in its low spin form, as it has been observed by Raman spectroscopy. The great stability of the AuNTs and the bioconjugate forms has also been observed by DLS. The combination of these results with those of UV-Visible-NIR spectroscopy allow to corroborate the aggregation in alkaline medium in the *side-by-side* and *end-to-end* forms, for the AuNTs and AuNT-Hb, respectively, and to conclude that this latter form of assembly leads to higher values of hydrodynamic diameters than the first one and this provokes a greater effect on aggregation. Finally, the bioconjugated AuNT-Hb resists high temperatures without suffering aggregation and, much more interesting, the changes that occur in the protein that forms the bioconjugate are reversible, unlike what happens with free Hb that suffers a conformational transition at 70 °C leading to a state that is not able to completely recover by reversing the temperature.

6. The presence of NMs in the Hb protein environment confers electroactivity, in contrast to what happens with the free protein. The studies carried out to characterize the electrochemical response by cyclic voltammetry indicate that the process is separated from the ideal behavior showing anodic and cathodic peaks with half-widths of around 200 mV. This fact would be explained by the presence of different microenvironments in the proteins that form the *corona* in addition to the very complexity of the Hb structure itself consisting of 4 monomers, each one with an heme group which is the electroactive species. From the observed behavior in the changes in the charge involved in electrochemical processes as a function of the scan rate, it is deduced that the presence of multilayers forming the protein *corona* causes that at low scan rates, the redox process can reach a greater number of groups, while at high speeds only the exchange with the layers closest to the metal nuclei occurs. On the other hand, in all the cases studied, we obtain a separation of the anodic and cathodic potentials of around 60 mV, at low scan rates, that would be related to the limitations in the transport of charge, according to a diffusion-controlled system. It is assumed that, in the low scanning speed limit, the cyclic voltammetry probes the redox sites and the potential obtained is an average of all the potential values in the different microenvironments of the film. On the other hand, at high speed, only the sites adjacent to the metal nuclei are probed and are the only ones that contribute

to the potential value. Using the Laviron's method, the electron transfer rate constants can be determined. Finally, the electron transfer ability of the bioconjugates allows its use in bioelectrocatalysis to tests against H_2O_2 and O_2 .



*Glosario de
abreviaturas*

A**AFM**

Microscopía de fuerza atómica · 57

AgNP

Nanopartículas de plata · 100

AgNRs

Nanocilindros de plata · 18, 32

AgNWs

Nanohilos de plata · 18

AR

Relación de aspecto · 17, 18, 19, 26, 28, 29, 32, 135, 136, 138

ATR

Reflexión total atenuada · 64, 65, 84, 97, 98, 100, 229, 234

AuNP

Nanopartícula de oro · 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 30, 32, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 109, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 122, 123, 133, 174, 182, 184, 216, 218, 227, 228, 229, 233, 234

AuNR

Nanocilindro/s de oro · 18, 19, 32, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 199, 201, 204, 206, 208, 209, 216, 218, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235

AuNT

Nanoprismas triangulares de oro · 33, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 227, 228, 230, 233, 234, 235, 236

B**BE**

Energía de unión · 139, 141, 143, 144, 145

C**cAuNP**

Nanopartículas de oro protegidas por citrato · 84, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 114, 117

cmc

Concentración micelar crítica · 129, 131, 167

CTAB

Bromuro de cetil-trimetilamonio · 18, 19, 20, 33, 121, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 159, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 185, 186, 197, 199, 200, 201, 206, 208, 211, 216, 223, 227, 228, 229, 230, 233, 234, 235

CTAC

Cloruro de cetil-trimetilamonio · 33, 131

D

DLS

Espectroscopia de correlación fotónica o dispersión de luz cuasi-elástica · 73, 94, 96, 97, 209, 210, 212, 229, 230, 234, 236

DLVO

Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek · 41, 43, 44

DTGS

Detector de sulfato de triglicina deuterado · 66

E

EDL

Doble capa eléctrica · 41, 75

EF

Factor de aumento · 30, 31, 32

EM

Campo electromagnético externo · 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33

F

FT-IR

Infrarrojo con transformada de Fourier · 62, 65, 85, 147

G

GC

Electrodo de carbono vítreo · 71, 72, 103, 104, 105, 117, 151, 152, 154, 155, 184, 200, 201, 216

H

hard corona

Capa interna formada sobre las partículas por las proteínas · 81, 82

Hb

Hemoglobina · 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 219, 220, 221, 222, 228, 229, 230, 234, 235, 236

HOMO

Orbital molecular ocupado de más alta energía · 61

I

IHP

Plano interior de Helmholtz · 36

IR

Infrarrojo · 26, 62, 63, 69, 73, 84, 97, 98, 100, 101, 129, 228, 229, 234

IUNAN

Instituto Universitario de Nanoquímica de la Universidad de Córdoba · 76

L**LS**

Bajo spin · 174, 209

LSPR

Resonancia del plasmón superficial localizado · 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 95, 96, 135, 137, 156, 157, 160, 162, 169, 171, 172, 228, 234

LUMO

Orbital molecular desocupado de más baja energía · 61

M**MHDA**

Ácido 16-mercaptohexadecanoico · 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 155, 162, 163, 228, 233, 234

MP

6-Mercaptopurina · 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 104, 109, 110, 113, 114, 117, 227, 228, 233, 234

MUA

Ácido mercaptoundecanoico · 84, 85, 86, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 104, 109, 110, 113, 114, 117, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 164, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 186, 204, 209, 216, 227, 228, 229, 233, 234, 235

N**Nafion**

Marca de la membrana sintética empleada para el atrapamiento de las partículas sobre el electrodo · 72, 104, 106, 109, 125, 154, 216

NHE

Electrodo normal de Hidrógeno · 194

NIBS

Metodología de detección por retro dispersión no invasiva empleada en DLS · 74

NIR

Infrarrojo cercano · 26, 28, 29, 62, 135, 136, 137, 144, 157, 162, 164, 165, 194, 195, 196, 197, 198, 201, 202, 205, 211, 212, 213, 214, 230, 236

NM

Nanomaterial/es · 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 32, 81, 83, 228, 230, 234, 236

NP

Nanopartícula/s · 13, 14, 15, 16, 17, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 38, 82, 83, 84, 227, 233

NR

Nanocilindro/s o nanorod/s · 17, 18, 19, 20, 27, 28, 32, 53, 130, 131, 132, 133, 144, 148, 158, 161, 162, 164, 173, 185, 228, 233

NT

Nanotriángulos · 28, 32, 33

NWs

Nanohilos · 17, 18

O**OHP**

Plano exterior de Helmholtz · 36

P

PEG

Polietilenglicol · 12, 133, 187

pl

Punto Isoeléctrico · 97, 170, 229, 234

PVP

Polivinil-pirrolidona · 33

R

RBCs

Células rojas de la sangre · 82

RR

Espectroscopia de resonancia Raman · 172, 208

RS

Dispersión Raman · 31

S

SAM

Monocapas autoensambladas · 88, 132, 143

SCAI

Servicio central de apoyo a la investigación · 59

SCE

Electrodo de calomelanos saturado · 103

SEIRAS

Espectroscopia de absorción infrarroja superficial aumentada · 99, 100, 229, 234

SEM

Microscopía electrónica de barrido · 57

SERRS

Dispersión Raman aumentada por resonancia superficial · 31, 172, 208

SERS

Aumento de la dispersión Raman superficial o "Surface Enhancement Raman Scattering" · 29, 30, 31, 32, 33, 82, 120, 148, 150, 151, 171, 172, 188, 223, 229, 235

soft corona

Capas externas formadas sobre las partículas por las proteínas · 81, 82

SPM

Microscopía de sonda de barrido · 57

SPR

Resonancia del plasmón superficial · 61

STM

Microscopía de efecto túnel · 57

T

TEM

Microscopia electrónica de transmisión · 19, 57, 58, 59, 60, 94, 95, 102, 138, 139, 160, 161, 163, 196, 197, 198, 201, 203, 207, 211, 228, 230, 234, 235

TGA

Análisis termogravimétrico · 129

U

upd

Deposición a bajo potencial · 131

UV

Ultravioleta · 22, 28, 52, 61, 62, 84, 87, 89, 90, 91, 95, 96, 135, 136, 137, 144, 156, 157, 160, 162, 164, 165, 168, 169, 170, 194, 195, 196, 197, 198, 201, 202, 205, 211, 212, 213, 214, 230, 236

V

VC

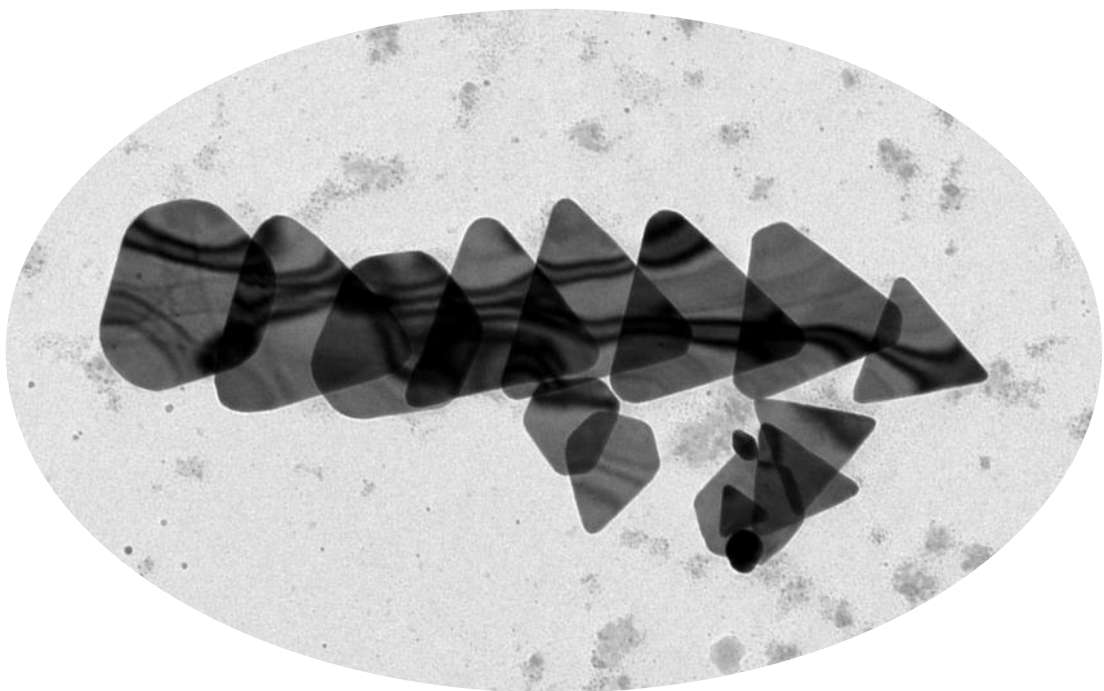
Voltamperometría o voltamperograma cíclico · 103, 104, 105, 106, 107, 152, 154, 175, 176, 182, 183, 201, 216, 217, 219

X

XPS

Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X · 67, 68, 69, 131, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 148, 188, 228, 233

Anexo



*Publicaciones y
Comunicaciones Científicas*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcis

Regular Article

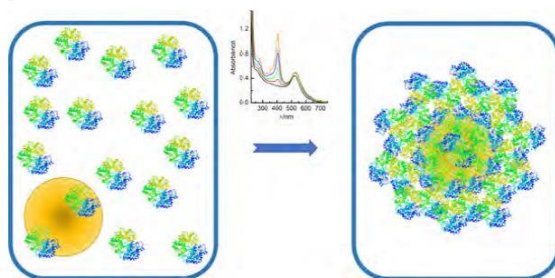
Hemoglobin bioconjugates with surface-protected gold nanoparticles in aqueous media: The stability depends on solution pH and protein properties



Rafael del Caño, Lucia Mateus¹, Guadalupe Sánchez-Obrero, José Manuel Sevilla, Rafael Madueño, Manuel Blázquez, Teresa Pineda*

Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Rabanales, Ed. Marie Curie 2ª Planta, E-14014 Córdoba, Spain

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2017
Revised 29 June 2017
Accepted 2 July 2017
Available online 5 July 2017

Keywords:

Hemoglobin
Gold nanoparticles
Protein corona
UV-visible spectroscopy
Attenuated total reflectance infrared spectroscopy
Dynamic light scattering
Zeta-potential

ABSTRACT

The identification of the factors that dictate the formation and physicochemical properties of protein-nanomaterial bioconjugates are important to understand their behavior in biological systems. The present work deals with the formation and characterization of bioconjugates made of the protein hemoglobin (Hb) and gold nanoparticles (AuNP) capped with three different molecular layers (citrate anions (c), 6-mercaptopurine (MP) and ω -mercaptopundecanoic acid (MUA)). The main focus is on the behavior of the bioconjugates in aqueous buffered solutions in a wide pH range. The stability of the bioconjugates have been studied by UV-visible spectroscopy by following the changes in the localized surface resonance plasmon band (LSRP), Dynamic light scattering (DLS) and zeta-potential pH titrations. It has been found that they are stable in neutral and alkaline solutions and, at pH lower than the protein isoelectric point, aggregation takes place. Although the surface chemical properties of the AuNPs confer different properties in respect to colloidal stability, once the bioconjugates are formed their properties are dictated by the Hb protein corona. The protein secondary structure, as analyzed by Attenuated total reflectance infrared (ATR-IR) spectroscopy, seems to be maintained under the conditions of colloidal stability but some small changes in protein conformation take place when the bioconjugates aggregate. These findings highlight the importance to keep the protein structure upon interaction with nanomaterials to drive the stability of the bioconjugates.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: tpineda@uco.es (T. Pineda).

¹ Present address: Corporación Tecnológica de Bogotá, Bogotá, Colombia.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2017.07.011>

0021-9797/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Hemoglobin becomes electroactive upon interaction with surface-protected Au nanoparticles



Rafael del Caño, Lucía Mateus¹, Guadalupe Sánchez-Obrero, José Manuel Sevilla, Rafael Madueño, Manuel Blázquez, Teresa Pineda*

Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Rabanales, Ed. Marie Curie 2ª Planta, E-14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Hemoglobin
Gold nanoparticles
Protein corona
Electron transfer
Electroactivity

ABSTRACT

In this work, we report on the electrochemical behavior of bioconjugates prepared with gold nanoparticles (AuNP) capped with three different molecular layers (citrate anions, 6-mercaptopurine and α -mercaptopundecanoic acid) and the protein hemoglobin (Hb). Freshly formed bioconjugates are deposited on a glassy carbon electrode and assayed for electroactivity. A pair of redox peaks with formal potential at -0.37 V is obtained, in contrast with the free Hb protein that is inactive on the glassy carbon substrate. The redox response is typical for quasi-reversible processes allowing the determination of the electron transfer rate constant for the three bioconjugates. Additional evidence of the structural integrity of protein upon forming the bioconjugate is obtained by monitoring the electrochemical response of the Hb heme Fe(III)/Fe(II) redox couple as a function of solution pH. Moreover, the Hb forming the protein corona around the AuNPs show good electrocatalytic activity for the reduction of hydrogen peroxide and oxygen. It has been found that only the first layer of Hb surrounding the AuNPs are electroactive, although some part of the second layer also contribute, pointing to the role of the AuNP in the electrochemical response.

1. Introduction

Direct electrochemistry of redox proteins is difficult to realize in the normal working electrodes due the deeply burying of the electroactive centers or the unfavorable orientation of the proteins upon adsorption on the electrode surface. To accelerate the electron transfer rate, different chemically modified electrodes have been used that can shorten the distance between the active centers and the electrodes by directing the protein to immobilize in the right orientation [1–3]. In this sense, nanostructured materials and nanomaterials of various nature and morphologies are now being used for electrode modification taking advantage of their high conductivity, large surface area and good biocompatibility, to facilitate electron transfer of redox proteins [1]. The challenge is to develop an appropriate system for immobilization of the redox protein in a way that the electron transfer rate increase with respect to the classical metallic substrates.

Hemoglobin (Hb) is a typical metalloprotein with a quaternary structure that contains four polypeptide chains (globin chains) and one heme group bound to each of the globin chains. However, as an intrinsic protein [4,5], Hb do not has a redox protein as natural partner

for ET exchange and therefore it may lack of electron tunneling pathways within their own structure. This should be the reason of an inefficient ET when Hb is studied by using a naked electrode. Even though, Hb direct electrochemistry has been realized on different modified electrodes by using biopolymers [6,7], membranes [8] and nanocomposites [9,10].

Protein-nanoparticle conjugates, in particular those formed with gold nanoparticles (AuNPs), are widely used for different applications [11]. The good biocompatibility of AuNPs [12] together with the easy modification chemistry [13–15], the unique size-dependent chemical, physical and optical properties and high protein loading, make them very good candidates to probe the ability to facilitate electron transfer of the protein Hb [16].

It is well known that protein adsorption readily takes place when the AuNPs contact the biological milieu provoking that the protein surface is surrounded by a corona of proteins [17–19]. The protein corona has a dynamic character and its evolution plays an important role in the interaction of the AuNPs with biological systems. Thus, it is of great interest for any biological application to understand how the process of protein adsorption and exchanges occurs and, more

* Corresponding author.

E-mail address: tpineda@uco.es (T. Pineda).

¹ Present address: Corporación Tecnológica de Bogotá, Bogotá, Colombia.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.090>

Received 13 July 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 29 August 2017

Available online 31 August 2017

0039-9140/© 2017 Published by Elsevier B.V.



Libro de Resúmenes

XXXV Reunión

A Coruña

19 a 23 Julio 2015

Bienal RSEQ



www.bienal2015.cienciasudc.es/es/



S2: Nanociencia y Materiales Moleculares

CARACTERIZACIÓN DE BIOCONJUGADOS FORMADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PROTEÍNAS

R. del Caño, J.M. Gisbert, G. Sánchez-Obrero, R. Madueño, M. Blázquez, T. Pineda

Dpto. de Química Física y T.A., Universidad de Córdoba, E-14014, Córdoba, España.

tpineda@uco.es

Palabras Clave: nanopartícula, proteína, bioconjugado, estabilidad.

La utilización de nanomateriales en el campo de la salud ha encontrado una barrera importante en el desconocimiento de la interfase entre los materiales y el medio biológico. Los aspectos a destacar son la composición superficial del nanomaterial, la interfase sólido-líquido y la zona de contacto de esta última con el medio biológico.[1] En el medio biológico se encuentran presentes numerosas proteínas y pequeñas moléculas a altas concentraciones que se pueden adsorber a la superficie de la nanopartícula formando una nube de proteínas agregadas conocida como "corona" de proteínas.[2] Este fenómeno es imposible de evitar y está presente siempre que un nanomaterial se encuentre en contacto con un fluido biológico.[3]

Es, por tanto, de gran importancia el estudio de estos sistemas con el objeto de conocer tanto su estructura como la estabilidad en diferentes entornos. La estabilidad, en particular, depende de la funcionalización superficial del nanomaterial.

En este trabajo se aborda el estudio de la funcionalización superficial de nanopartículas de oro, tanto de forma esférica como cilíndrica y de su interacción con material proteico. Se hace énfasis en las diferencias encontradas en función de la forma de las partículas y como estos aspectos se relacionan con la estabilidad de las dispersiones de estos nanobioconjugados en medios acuosos. La utilización de diferentes técnicas de caracterización como son las espectroscopías FTIR, UV-visible, Fluorescencia y Dicroísmo circular permiten obtener información sobre la naturaleza de la capa molecular protectora del nanomaterial así como sobre la estructura y conformación de las proteínas que forman parte de la *corona*.

Agradecimientos: Proyecto CTQ2014-60227-R (Mineco), P10-FQM-6408 (Junta Andalucía) y Universidad de Córdoba

Referencias

- [1] Nel, A. E.; Maedler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., *Nature Mater.* 2009, 8, 543-557.
 [2] Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104, 2050-2055.
 [3] Hamad-Schifferli, K., *Nanomedicine* 2013, 8, 1-3.



Characterization of bioconjugates formed by plasma proteins and different shaped-gold nanoparticles

Rafael del Caño (1), Alain Rafael Puente Santiago (1), José María Gisbert (1), Felix del Aguila (1), Guadalupe Sánchez (1), Manuel Blázquez (1), María Teresa Pineda (1), Rafael Madueño (1)

(1) Universidad de Córdoba

Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie 2ª planta Córdoba Spain

Email: q92caocr@uco.es

Presenting author: Rafael Madueño

Type: Poster
Theme: E. Materials, Devices and Nanochemistry
Topic: E2. Nanomaterials, Devices, Technology and applications
Keywords: Gold nanomaterials, plasma proteins, bionanconjugates, Stability, Binding

SUMMARY:

The interest of nanomaterials for potential applications has raised some questions about the new real venues offered in research fields such as biomedicine and sensing. Those are often related in nanomedicine to a proper material design for effective intracellular targeting and/or imaging, drug delivery and selective binding approaches in prospect of non-invasive therapies implementation. At this regard, better understanding of the interfacial interactions between surface functionalized nanoparticles (NPs) and biological fluids is still needed. Thus, the main aspects to consider in such interactions are the NPs surface composition, the solid-liquid interface and the contact region with the living matter.[1] When nanoparticles (NPs) enter the biological fluid, this implies their association with plasma proteins at high concentrations to form bioconjugates. There is a quite recent concern in the crucial role that bioconjugates may have, as a consequence of the adsorption of proteins by forming a "protein corona" on the NPs surface, for bio-nanotechnological approaches.[2,3] Among different nanomaterials, gold nanoparticles (AuNPs) constitute the most stable type of biocompatible particles that exhibit very interesting physical and chemical properties with biomedical, optical, and sensing applications.[4,5]

Therefore, fundamental knowledge of the binding interactions, dynamic exchange processes at the "protein corona", conformational changes and stability of the bioconjugates as a function of the size, shape and type of nanomaterial becomes of special importance. In particular, stability of bioconjugates is directly influenced by the NPs surface functionalization.

This work aims to study the stability of bioconjugates formed “in vitro” by the interaction of different surface functionalized and shaped-AuNPs (pseudo-spherical, rod-like and prism) with plasma proteins in aqueous media. The influence of interfacial interactions and NPs shape is discussed in terms of the bionanoconjugates’ stability by their characterization with FTIR-IRRAS, XPS, UV-visible, fluorescence and Circular Dicroism spectroscopic techniques. Structural information of the AuNPs protecting molecular layer together with the structure and conformation of the proteins constituting the corona is also obtained.

Acknowledgements: Projects CTQ2014-60227-R (Mineco), P10-FQM-6408 (Junta Andalucía) and Universidad de Cordoba

References

- [1] Nel, A. E.; Maedler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M., *Nature Mater.* **2009**, *8*, 543-557.
- [2] Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2050-2055.
- [3] Hamad-Schifferli, K., *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1-3.
- [4] Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W., *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13840-13851.
- [5] Tebbe, M.; Kuttner, C.; Maennel, M.; Fery, A.; Chanana, M., *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (10), 5984-5991

ELECTROQUÍMICA

XXXVII REUNIÓN DEL GRUPO
DE ELECTROQUÍMICA DE
LA REAL SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE QUÍMICA

ALICANTE, 17-20 DE JULIO DE 2016



UNIVERSIDAD DE ALICANTE



XXXVII REUNIÓN DEL GRUPO DE ELECTROQUÍMICA

Alicante, 17-20 de julio de 2016

Bioconjugados de nanopartículas de oro anisotrópicas con la proteína Hemoglobina

Rafael del Caño, Guadalupe Sánchez-Obrero, Rafael Madueño,
Manuel Blázquez, Teresa Pineda

*Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Depto Química Física y T.A. Universidad de Córdoba,
Campus Rabanales, Ed. Marie Curie 2ª Planta, E-14014 Córdoba, España
q2caocr@uco.es*

Los estudios de formación y caracterización de bioconjugados con nanopartículas de oro están actualmente en auge debido, por una parte a que éstas constituyen las nanopartículas de tipo metálico más estables conocidas y, por otra parte, presentan propiedades muy interesantes [1]. De esta manera, se encuentran objetivos de interés en campos muy diversos como son la biomedicina, la ciencia de materiales, la energía, la cosmética, o los bio-sensores [2].

Dentro de las proteínas más comunes en los flujos biológicos se encuentran las hemoproteínas y se ha dedicado mucho esfuerzo en conocer cómo se alteran sus propiedades cuando interaccionan con las superficies metálicas. Una de las aproximaciones más utilizadas es el estudio de la transferencia electrónica (ET) del grupo hemo en proteínas de diferente naturaleza y se ha observado un importante aumento de la velocidad de la ET al pasar de un estado libre al estado que adopta en el bioconjugado. Este fenómeno se está explotando además en la construcción de biosensores y celdas de combustible, debido a la inmovilización de estos bioconjugados sobre electrodos específicamente funcionalizados [3].

En el presente trabajo se recoge un estudio de la caracterización del bioconjugado formado con nanopartículas de oro anisotrópicas, como son los nanoprismas de oro, y la proteína Hemoglobina. Los estudios de caracterización se llevan a cabo empleando diferentes técnicas espectroscópicas, como la UV-visible-NIR, IR y Dicroísmo circular así como con medidas de potencial zeta. Además se emplean técnicas electroquímicas para la caracterización de los bioconjugados atendiendo a la ET de la proteína tanto libre como formando el bioconjugado.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2010-16137 y CTQ2014-60227R), Junta de Andalucía (P10-FQM-6408).

Bibliografía:

- [1] Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jaekel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Properties and Applications of Colloidal Nonspherical Noble Metal Nanoparticles. *Advanced Materials* **2010**, *22*, 1805-1825.
- [2] Bogart, L. K.; Pourroy, G.; Murphy, C. J.; Puentes, V.; Pellegrino, T.; Rosenblum, D.; Peer, D.; Levy, R. Nanoparticles for Imaging, Sensing, and Therapeutic Intervention. *ACS Nano* **2014**, *8*, 3107-3122.
- [3] Samanta, D.; Sarkar, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 2567-2592.

CREANDO REDES DOCTORALES

Vol. V



Universidad de Córdoba 2016

 **educo**
Escuela de Doctorado de la Universidad de Córdoba

 **UCOPress**
Ediciones Universidad de Córdoba

eidA3
escuela internacional de doctorado en
agraciamentación
SEDE UCO

Estabilidad de nanopartículas de oro anisotrópicas con la proteína Hemoglobina

Rafael Del Caño, Manuel Blázquez, María Teresa Pineda.

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. E-mail: g92caocr@uco.es

Summary

In this study, the bio-conjugation of hemoglobin (Hb) with anisotropic gold nanoparticles is analyzed by using spectroscopic and electrochemical methods. The stability of the bioconjugates formed by Hb and gold nanotriangles (Au-NTs) has been characterized by UV-visible spectroscopy. It has been found that the Au-NTs are stable in a wide pH range that extends from acid to alkaline values. We have observed a different behavior in the presence of the protein. The effects of temperature in the stability of the bioconjugate have shown a great tolerance against this parameter. Despite this high stability, a change in the protein as a result of the presence of the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) molecules used in the synthesis of the nanoparticles has been observed. On the other hand, the study of the electrochemical properties of the bioconjugates shows that the protein retains its catalytic activity upon binding to the nanoparticles and thus its structure remains unaltered.

Resumen

En este estudio se analiza la bio-conjugación de hemoglobina (Hb) con nanopartículas de oro anisotrópicas, utilizando métodos espectroscópicos y electroquímicos. La estabilidad de los bioconjugados formados con Hb y nanotriángulos de oro (Au-NTs) se ha estudiado mediante espectroscopia UV-visible, encontrándose que son estables en un amplio intervalo de pH que se extiende desde medio ácido hasta valores de pH alcalinos, obteniéndose un diferente comportamiento como consecuencia de la presencia de la proteína. Además se ha comprobado cómo influye la temperatura en la estabilidad, observándose una gran tolerancia por parte del bioconjugado. A pesar de esta gran estabilidad, se observa un cambio en la proteína como consecuencia de la presencia de las moléculas de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) empleado en la síntesis de las partículas. Por otro lado, el estudio electroquímico de los bioconjugados formados muestra que la proteína mantiene su actividad catalítica y que su estructura permanece estable.

Introducción

Los estudios de formación y caracterización de bioconjugados con nanopartículas de oro están actualmente en auge debido, por una parte, a que éstas constituyen las nanopartículas de tipo metálico más estables conocidas y, por otra, a que presentan propiedades muy interesantes [1]. De esta manera, se encuentran objetivos de interés en campos muy diversos como son la biomedicina, la ciencia de materiales, la energía, la cosmética, o los bio-sensores [2].

Dentro de las proteínas más comunes en los flujos biológicos se encuentran las hemo-proteínas y es interesante conocer cómo se alteran sus propiedades cuando interactúan con las superficies metálicas. Una de las aproximaciones más utilizadas es el estudio de la transferencia electrónica (ET) del grupo hemo en proteínas de diferente naturaleza, observándose un importante aumento de la velocidad de la ET al pasar de un estado libre al estado que adopta en el bioconjugado. Este fenómeno se está explotando además en la construcción de biosensores y celdas de combustible, debido a la inmovilización de estos bioconjugados sobre electrodos específicamente funcionalizados [3].

Metodología

Las medidas espectroscópicas UV-Visible se han llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro Jasco V-570. Dependiendo de la concentración se han utilizado cubetas de diferente paso óptico (0.2 y 1 cm).

Las medidas electroquímicas se han realizado usando una celda Metrohm con una configuración de tres electrodos: un electrodo auxiliar de Pt, un electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado y un electrodo de trabajo de carbón vitrificado (GC). Todos los potenciales medidos en este trabajo se refieren a este electrodo de referencia. Las medidas electroquímicas se han realizado eliminando previamente el oxígeno disuelto mediante burbujeo de una corriente de gas nitrógeno durante 10 minutos.

Resultados

Con el objeto de estudiar la estabilidad del bioconjugado formado, se han sintetizado Au-NT (Figura 1). Durante la síntesis, inevitablemente, se forman partículas esféricas que deben ser eliminadas mediante un proceso de depleción con un surfactante como el CTAB.

La presencia del surfactante se pone de manifiesto en la formación del bioconjugado con Hb a través de un desplazamiento de la banda Soret desde 404 nm (proteína nativa) a 411 nm en el espectro UV-Visible, así como un cambio en las bandas Q. Este fenómeno se ha explicado como consecuencia de un cambio en la coordinación del hierro del grupo hemo a través de la histidina distal [4].

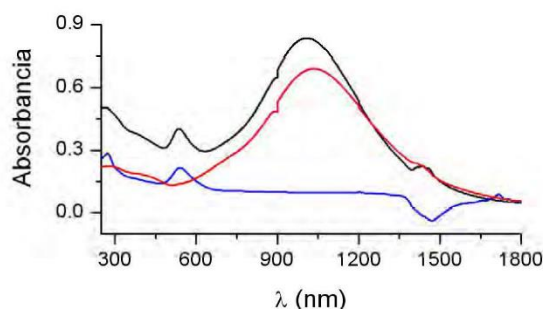


Figura 1. Espectros UV-Visible de Au-NTs antes (negro) y después (rojo) del proceso de separación. (azul) espectro del sobrenadante obtenido.

La formación de una corona de proteínas sobre la nanopartícula se puede intuir por el desplazamiento de 3 nm observado en la banda del plasmón superficial del espectro UV-Visible, así como en las medidas de tamaño.

Los resultados obtenidos en función del pH muestran que tanto los Au-NTs como los bioconjugados son estables en un amplio intervalo de esta variable. No obstante, en medio alcalino se observan cambios siendo el comportamiento muy diferente en cada caso pudiendo concluirse que la agregación de las partículas al formar el bioconjugado se produce en una forma distinta (Figura 2). Así, mientras que en las partículas libres se observa un desplazamiento hacia el azul, en el bioconjugado el desplazamiento se produce hacia el rojo.

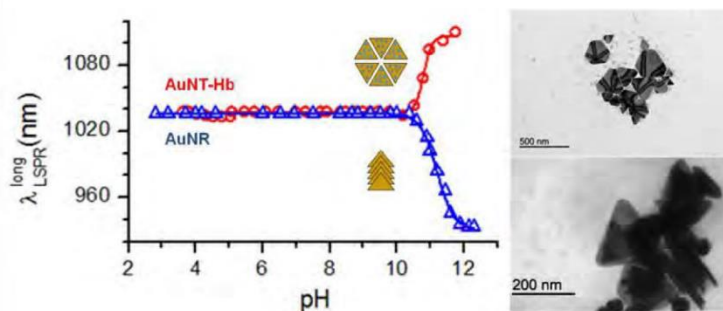


Figura 2. Variación de la λ en función del pH, e imágenes TEM obtenidas a pH 12 para ambos sistemas.

Este comportamiento se explica, por una parte, por el apilamiento de las partículas cuando estas se encuentran libres originándose agregados con una menor relación de aspecto y, por tanto, el desplazamiento hacia el azul. Por otra parte, cuando la proteína está presente se produce una

agregación lateral de los Au-NTs, impidiéndose la interacción cara con cara, y por tanto produciéndose un desplazamiento hacia el rojo (Figura 2).

En cuanto a la estabilidad del bioconjugado en función de la temperatura, se observa un comportamiento reversible del sistema desde temperaturas de 15 a 95 °C, lo cual permitiría el empleo de estos sistemas en aplicaciones fototérmicas.

Por último se ha realizado la caracterización electroquímica así como la medida de la actividad catalítica del bioconjugado. Observando las respuestas obtenidas, se puede afirmar que no se producen cambios en la estructura de la proteína y que esta mantiene su actividad.

Conclusiones

- Hb forma bioconjugados estables con Au-NT en medios acuosos de diferentes pHs.
- La temperatura afecta a los bioconjugados Hb-AuNT de forma reversible.
- Los cambios que tienen lugar en la proteína en presencia de Au-NTs se deben en parte a la presencia de CTAB, aunque se evitan en cierta medida, con respecto a la proteína libre.
- La interacción de Hb con Au-NTs permite observar la transferencia electrónica de los grupos hemo, así como la actividad catalítica frente a la reducción del H₂O₂.

Bibliografía

- [1] T.K. Sau, A.L. Rogach, F. Jaeckel, T.A. Klar, J. Feldmann, *Adv. Mater.* 22(16) (2010) 1805-1825.
- [2] L.K. Bogart, G. Pourroy, C.J. Murphy, V. Puentes, T. Pellegrino, D. Rosenblum, D. Peer, R. Levy, *ACS Nano* 8(4) (2014) 3107-3122.
- [3] D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.* 40(5) (2011) 2567-2592.
- [4] A.A. Akhrem, G.M. Andreyuk, M.A. Kisel, P.A. Kiselev, *Biochim. Biophys. Acta* 992(2) (1989) 191-194.

Agradecimientos

Proyectos CTQ2014-60227-R (Mineco), P10-FQM-6408 (Junta de Andalucía) y Universidad de Córdoba.



El Comité organizador del
I Workshop de ELECTROBIONET

CERTIFICA

que la comunicación titulada

**Caracterización de nanomateriales y su uso en
biosensores**

ha sido presentada como *COMUNICACIÓN ORAL* por

Rafael del Caño Ochoa

en el I Workshop de ELECTROBIONET, celebrado en
Madrid el 18 de noviembre de 2016.

Y para que así conste, firmo el presente certificado.



José Manuel Pingarrón Carrazón
Presidente del Comité Organizador

Estudio de Bioconjugados formados con nanopartículas de oro y la proteína Hemoglobina.

R. Del Caño, G. Sánchez-Obrero, J.M. Sevilla, R. Madueño, M. Blázquez, T. Pineda

*Dep. De Química Física y T. A., Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Universidad de Córdoba, C. Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14014 Córdoba, España.
q92caocr@uco.es*

El uso de nanomateriales en diferentes campos de aplicación tales como biomedicina, ciencia de materiales, energía, cosmética, etc,¹ se ha visto incrementado en los últimos años debido a las interesantes propiedades que presentan estos materiales en su forma nanométrica.

En este sentido, el oro es uno de los materiales más usados. Sin embargo, la utilización de estos nanomateriales en estos campos ha encontrado una barrera importante en el desconocimiento de la interface entre los materiales y el medio biológico.

Al poner las nanopartículas de oro en un fluido biológico se encuentra con numerosas proteínas y pequeñas moléculas a altas concentraciones que se pueden adsorber sobre la superficie de la nanopartícula formando una nube de proteínas agregadas conocida como “corona de proteínas”.

Es, por tanto, de gran importancia el estudio de estos sistemas con el objeto de conocer tanto su estructura como la estabilidad en diferentes entornos. La estabilidad, en particular, depende de la funcionalización superficial del nanomaterial.²

En este trabajo se aborda el estudio de la funcionalización superficial de nanopartículas de oro y de su interacción con material proteico, en concreto con la proteína Hemoglobina. Se hace énfasis en la estabilidad de las dispersiones de estos nanobioconjugados en medios acuosos. La utilización de diferentes técnicas de caracterización como son las espectroscopías FTIR, UV-visible y XPS permiten obtener información sobre la naturaleza de la capa molecular protectora del nanomaterial, así como sobre la estructura y conformación de las proteínas que forman parte de la corona. Además, se observa la transferencia electrónica (TE) de la proteína tras formar el bioconjugado y ser depositado sobre un electrodo de carbono vitrificado.³

Agradecimientos

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos), Junta de Andalucía (P10-FQM-6408) y Universidad de Córdoba.

Referencias

- [1] Hong, X.; Tan, C. L.; Chen, J. Z.; Xu, Z. C.; Zhang, H., *Nano Research* **2015**, 8 (1), 40-55.
- [2] del Caño, R.; Mateus, L.; Sánchez-Obrero, G.; Sevilla, J. M.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T., *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, 505, 1165-1171.
- [3] del Caño, R.; Mateus, L.; Sánchez-Obrero, G.; Sevilla, J. M.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T., *Talanta* **2018**, 176, 667-673.

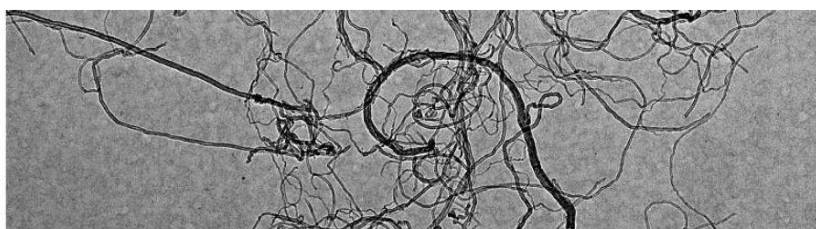
**Sexta Edición del Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces**



Córdoba, 25 y 26 de Enero de 2017

Aula Magna. Aulario Averroes

Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba



LIBRO DE RESÚMENES



BIOCONJUGADOS DE HEMOGLOBINA CON NANOPRISMAS DE ORO

Rafael del Caño, Teresa Pineda, Guadalupe Sánchez, Rafael Madueño, Manuel Blázquez.

*Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Departamento de Química Física y T. A.,
Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Ed. Marie Curie 2ª Planta, E-14014 Córdoba, España
g92caocr@uco.es*

Los estudios de formación y caracterización de bioconjugados con nanopartículas de oro están actualmente en auge debido, por una parte a que éstas constituyen las nanopartículas de tipo metálico más estables conocidas y, por otra, a que presentan propiedades físicas y químicas muy interesantes.¹ De esta manera, son objeto de interés en campos muy diversos como son la ciencia de materiales, energía, diseño de bio-sensores o biomedicina.^{2,3}

Dentro de las proteínas más comunes presentes en los flujos biológicos se encuentran las hemo-proteínas, las cuales pueden interaccionar en primera instancia con nanopartículas que son suministradas para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades. Por lo tanto, es importante conocer tanto la estabilidad de los bioconjugados formados como la posible alteración de las propiedades de estas proteínas al interaccionar con la superficie de las nanopartículas. Una de las aproximaciones más utilizadas es el estudio de la transferencia electrónica del grupo hemo en proteínas de diferente naturaleza, observándose un importante aumento de la velocidad de la transferencia al pasar de un estado libre al estado que adopta en el bioconjugado. Este fenómeno se está explotando adicionalmente en la construcción de biosensores y celdas de combustible, por la posibilidad de inmovilizar estos bioconjugados sobre electrodos funcionalizados específicamente.⁴

En el presente trabajo se recoge un estudio de la caracterización y estabilidad del bioconjugado formado por nanopartículas de oro anisotrópicas, como son los nanoprismas de oro (Au-NPs), y la proteína hemoglobina. Los estudios de caracterización se llevan a cabo empleando diferentes técnicas como espectroscopia UV-visible-NIR, medidas de potencial zeta y tamaño mediante técnicas de dispersión de luz, y microscopía de transmisión electrónica (TEM). Además, se emplean técnicas electroquímicas para la caracterización de los bioconjugados siguiendo la transferencia electrónica de la proteína tanto libre como asociada con los Au-NPs.

¹ Sau, T. K.; Rogach, A. L.; Jaeckel, F.; Klar, T. A.; Feldmann, J. *Advanced Materials*, **2010**, 22 (16), 1805-1825.

² Feng, B.; Zhou, F. Y.; Wang, D. G.; Xu, Z. A.; Yu, H. J.; Li, Y. P. *Science China-Chemistry*, **2016**, 59 (8), 984-990.

³ Bogart, L. K.; Pourroy, G.; Murphy, C. J.; Puentes, V.; Pellegrino, T.; Rosenblum, D.; Peer, D.; Levy, R. *ACS Nano*, **2014**, 8 (4), 3107-3122.

⁴ Samanta, D.; Sarker, A. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40 (5), 2567-2592.

Agradecimientos

Proyectos CTQ2014-60227-R (MINECO), P10-FQM-6408 (Junta de Andalucía).

CREANDO REDES DOCTORALES

Vol. VI: “La generación del
conocimiento”



Funcionalización y bioconjugación de nanopartículas de oro cilíndricas con la proteína Hemoglobina

Rafael Del Caño, Manuel Blázquez, María Teresa Pineda.

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. E-mail: g92caocr@uco.es

Summary

In this study, the bio-conjugation of hemoglobin (Hb) with anisotropic gold nanoparticles is analyzed by using spectroscopic and electrochemical methods. The stability of the bioconjugates formed by Hb and gold-nanorods (Au-NRs) modified with mercaptoundecanoic acid has been characterized by UV-visible spectroscopy. It has been found that the Au-NRs are stable in a wide pH range that extends from acid to alkaline values. We have observed a similar behavior in the presence of the protein. Despite this high stability, a change in the protein as a result of the bioconjugation with the nanoparticles has been observed. On the other hand, the study of the electrochemical properties of the bioconjugates shows that the protein retains its catalytic activity upon binding to the nanoparticles and thus its structure remains unaltered.

Resumen

En este estudio se analiza la bio-conjugación de hemoglobina (Hb) con nanopartículas de oro anisotrópicas, utilizando métodos espectroscópicos y electroquímicos. La estabilidad de los bioconjugados formados con Hb y nanocilindros de oro (Au-NRs) modificadas se ha estudiado mediante espectroscopía UV-visible, encontrándose que son estables en un amplio intervalo de pH que se extiende desde medio ácido hasta valores de pH alcalinos. Observándose un comportamiento similar en presencia de la proteína. A pesar de esta gran estabilidad, se observa un cambio en la proteína como consecuencia de la interacción de las partículas con la hemoglobina. Por otro lado, el estudio electroquímico de los bioconjugados formados muestra que la proteína mantiene su actividad catalítica y que su estructura permanece estable.

Introducción

Los materiales inorgánicos, orgánicos y biológicos han existido en la naturaleza desde que comenzó la evolución de la vida en la tierra. Algunas evidencias de ello son microorganismos y minerales que se han encontrado fosilizados en las rocas. Estos materiales hoy en día son estudiados en su forma nanométrica para dar lugar a importantes aplicaciones.

En este sentido los nanomateriales de tipo metálico están siendo ampliamente estudiados, destacando entre ellos, el oro por su gran estabilidad y por presentar unas propiedades muy interesantes [1]. De esta manera, se encuentran objetivos de interés en campos muy diversos como la biomedicina, la ciencia de materiales, la energía o los biosensores [2].

Dentro de las proteínas más comunes en los flujos biológicos se encuentran las hemo-proteínas y es interesante conocer cómo se alteran sus propiedades cuando interaccionan con las superficies metálicas. Una de las aproximaciones más utilizadas es el estudio de la transferencia electrónica (ET) del grupo hemo en proteínas de diferente naturaleza, observándose un importante aumento de la velocidad de la ET al pasar de un estado libre al estado que adopta en el bioconjugado. Este fenómeno se está explotando además en la construcción de biosensores y celdas de combustible, debido a la inmovilización de estos bioconjugados sobre electrodos específicamente funcionalizados [3].

Metodología

Las medidas espectroscópicas UV-Visible se han llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro Jasco V-570. Dependiendo de la concentración se han utilizado cubetas de diferente paso óptico (0.2 y 1 cm).

Las medidas electroquímicas se han realizado usando una celda Metrohm con una configuración de tres electrodos: un electrodo auxiliar de Pt, un electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado y un electrodo de trabajo de carbón vitrificado (GC). Todos los potenciales medidos en este trabajo se refieren a este electrodo de referencia. Las medidas electroquímicas se han realizado eliminando previamente el oxígeno disuelto mediante burbujeo de una corriente de gas nitrógeno durante 10 minutos.

Resultados

Con el objeto de estudiar la modificación de las partículas, así como la formación y estabilidad del bioconjugado formado, se han sintetizado Au-NR (Figura 1). Estas partículas se estabilizan a través de la bicapa formada sobre su superficie. En el caso del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) esta unión es lábil, por lo que podemos desplazar el CTAB por una capa más estable como la que forma el ácido mercaptoundecanoico (MUA) a través del grupo tiol, confiriéndole una funcionalidad a la capa formada al introducir un grupo carboxílico en la superficie de las partículas.

Esta modificación se pone de manifiesto a través de diferentes técnicas espectroscópicas como UV-Visible, espectroscopia foto electrónica de rayos X (XPS) e infrarrojo.

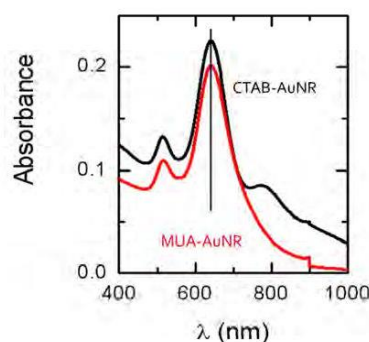


Figura 1. Espectros UV-Visible de Au-NRs antes (negro) y después (rojo) del proceso de modificación con MUA.

Sobre estas nanopartículas modificadas se lleva a cabo la formación de una corona de proteínas de hemoglobina, que se puede intuir por el desplazamiento de 3 nm observado en la banda del plasmón superficial del espectro UV-Visible.

Los resultados obtenidos en función del pH muestran que tanto los Au-NRs como los bioconjugados son estables en un amplio intervalo de esta variable. Observándose un pequeño cambio en el comportamiento de la banda de absorción característica de la proteína (Figura 2).

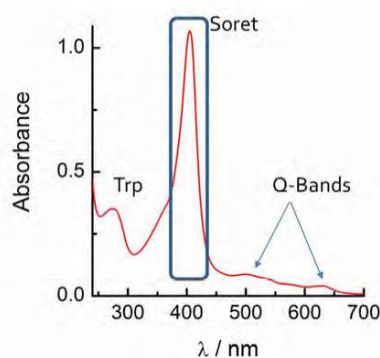


Figura 2. Bandas características de la proteína Hemoglobina en disolución, destacando la banda Soret debida a la absorción de la porfirina.

Este comportamiento se explica como consecuencia de la interacción de la proteína con la superficie de los nanorods, lo que provoca un pequeño cambio en el entorno de la proteína que da lugar a una cierta inestabilidad de la misma puesta en evidencia por cambios en la banda de absorción típica del grupo porfirínico.

Por último, se ha realizado la caracterización electroquímica, así como la medida de la actividad catalítica del bioconjugado (Figura 3). Observando las respuestas obtenidas, se puede afirmar que no se producen cambios en la estructura de la proteína y que esta mantiene su actividad.

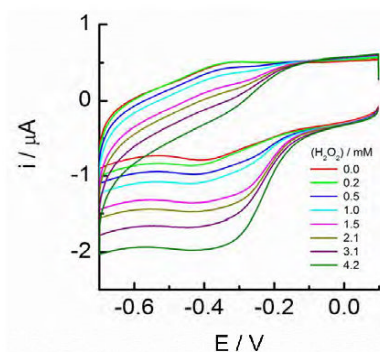


Figura 3. Respuesta catalítica del bioconjugado frente al peróxido de hidrógeno.

Conclusiones

- Se ha llevado a cabo la modificación de los Au-NR con MUA.
- Hb forma bioconjugados estables con Au-NR en medios acuosos de diferentes pHs.
- Los cambios que tienen lugar en la proteína en presencia de Au-NRs se deben en parte a la presencia de CTAB, aunque se evitan en cierta medida, con respecto a la proteína libre.
- La interacción de Hb con Au-NRs permite observar la transferencia electrónica de los grupos hemo, así como la actividad catalítica frente a la reducción del H_2O_2 .

Bibliografía

- [1] T.K. Sau, A.L. Rogach, F. Jaeckel, T.A. Klar, J. Feldmann, *Adv. Mater.* 22(16) (2010) 1805-1825.
- [2] L.K. Bogart, G. Pourroy, C.J. Murphy, V. Puentes, T. Pellegrino, D. Rosenblum, D. Peer, R. Levy, *ACS Nano* 8(4) (2014) 3107-3122.
- [3] D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.* 40(5) (2011) 2567-2592.

Agradecimientos

Proyectos CTQ2014-60227-R (Mineco), P10-FQM-6408 (Junta de Andalucía), Red de Sensores y Biosensores Electroquímicos (ELECTROBIONET) y Universidad de Córdoba.



II WORKSHOP ON ELECTROCHEMICAL DEVICES

II WORKSHOP ELECTROBIONET



**University of Oviedo, Campus Mieres
November 9-10, 2017**

CHARACTERIZATION OF GOLD-NANORODS PROTECTED BY DIFFERENT MONOLAYERS

R. Del Caño, G. Sánchez-Obrero, J.M. Sevilla, R. Madueño, M. Blázquez, T. Pineda

*Department of Physical Chemistry and A.T., Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus of Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14014 Córdoba, Spain
q92caocr@uco.es*

Inorganic, organic and biological materials may have existed in nature since the evolution of life began on earth. Some evidence are microorganisms and minerals that have been found fossilized in rocks. Nowadays these materials are studied in their nanometric form to give rise to important applications.

In this sense the metallic type nanomaterials are being studied extensively, highlighting among them, the gold for its great stability and to present some very interesting properties. In this way, objectives of interest are found in very diverse fields such as biomedicine, material science, energy or biosensors.¹

This work deals with the study of the surface functionalization of cylindrical gold nanoparticles and their interaction with protein material. In addition, the stability of the bioconjugate formed with hemoglobin in aqueous medium is studied, observing the electronic transfer (TE) of the protein after forming the bioconjugate and being deposited on a vitrified carbon electrode.²

The use of different characterization techniques such as FTIR and UV-Visible spectroscopy or the XPS technique allows to obtain information on the nature of the protective molecular layer of the nanomaterial as well as on the structure and conformation of the protein. In addition, the use of electrochemical techniques for the characterization of the bioconjugates using the TE of the protein is used.

References

1. Hong, X.; Tan, C. L.; Chen, J. Z.; Xu, Z. C.; Zhang, H., Synthesis, properties and applications of one- and two-dimensional gold nanostructures. *Nano Research* **2015**, *8* (1), 40-55.
2. Vatsyayan, P., Recent Advances in the Study of Electrochemistry of Redox Proteins. In *Trends in Bioelectroanalysis*, Matysik, F.-M., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 223-262.

Acknowledgements. Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos), Junta de Andalucía (P10-FQM-6408) and Universidad de Córdoba.



XXXVIII REUNIÓN DEL GRUPO DE
ELECTROQUÍMICA DE LA REAL SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE QUÍMICA
XIX ENCONTRO IBÉRICO DE ELECTROQUÍMICA



#38gerseq

Vitoria-Gasteiz
July 5-7, 2017

XXXVIII XIX

Friday 7th July

12:25-12:45

Caracterización de la proteína citocromo b5-1 de *Chlamidomonas reinhardtii* (cr-Cytb5-1) y su interacción con nanopartículas de oro.**Rafael del Caño.**Rafael del Caño¹, Guadalupe Sánchez-Obrero¹, Rafael Madueño¹, Manuel Blázquez¹, Teresa Pineda¹, Alejandro Chamizo-Ampudia², Aurora Galván², Ángel Llamas², Emilio Fernández²¹ Dpto. Química Física y T. A., Instituto Química Fina y Nanoquímica. Ed. Marie Curie, 2ª Planta.² Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Ed. Severo Ochoa, 1ª Planta.

Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba. 14014 Córdoba, España.

Las proteínas ARC (componente reductor de amidoxina) catalizan la reducción de un amplio número de compuestos N-hidroxiados (NHC), usando el poder reductor suministrado por otras proteínas. A diferencia de *Escherichia coli* que contiene un dominio ferredoxina y requiere NADPH-flavin-reductasa para reducir estos compuestos tóxicos, en humanos falta el dominio ferredoxina y se requiere un citocromo b5 (cytb5) y una NADH-cytb5 reductasa. En *Chlamidomonas reinhardtii* (cr) existen seis ferredoxinas pero se ha demostrado que no son necesarias para que crARC reduzca NHCs. En cambio, posee cinco cytb5 y dos flavin-reductasas, cr-cytb5-R que reducen NHCs. De hecho, cytb5-R con ARC y cytb5-1 son capaces de reducir NHC tomando los electrones de NADH.[1,2]

Cytb5 es una proteína anfipática que posee dos dominios, un dominio soluble en agua que posee un grupo hemo y un dominio hidrofóbico de anclaje a la membrana en su extremo C-terminal. Para facilitar su solubilidad, este dominio se ha truncado.

En el presente trabajo, se lleva a cabo un estudio de caracterización físico-química de la proteína cr-cytb5-1 en disolución acuosa. Los estudios mediante espectroscopía UV-visible permiten obtener las condiciones experimentales donde la proteína es estable. Además, se ha ensayado el comportamiento de cr-cytb5-1 en función del pH de la disolución midiendo las variaciones del potencial-zeta, obteniéndose el punto isoeléctrico de la proteína. Uno de los puntos de más interés en los estudios de hemo-proteínas es conocer sus propiedades redox. En este sentido, se ha comprobado que la proteína cr-cytb5-1 depositada sobre un electrodo de grafito no muestra transferencia electrónica cuando se lleva a cabo el experimento en condiciones fisiológicas. En cambio, cuando cr-cytb5-1 interacciona con nanopartículas de oro formando un bioconjugado estable, muestra señal redox observable mediante voltamperometría cíclica. Este comportamiento se debe a que la proteína se adapta a la forma de la nanopartícula y se produce una orientación favorable que permite establecer una buena comunicación con el núcleo metálico de oro.

Referencias:

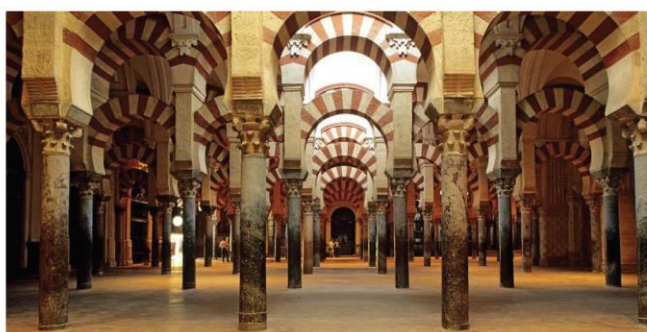
- (1) Chamizo-Ampudia, A.; Galvan, A.; Fernandez, E.; Llamas, A. The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC Has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of Its Human Homologue. *Eukaryotic Cell* 2011, 10, 1270-1282.
- (2) Chamizo-Ampudia, A.; Galvan, A.; Fernandez, E.; Llamas, A. Study of Different Variants of Mo Enzyme crARC and the Interaction with Its Partners crCytb5-R and crCytb5-1. *Inter. J. Molec. Sci.* 2017, 18.

Agradecimientos:

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos), Junta de Andalucía (P10-FQM-6408) y Universidad de Córdoba.

IV reunión de Jóvenes Investigadores en Coloides e Interfases

Córdoba, 7-9 Febrero 2018



Universidad de Córdoba

JICI-IV 

The logo for JICI-IV features the text 'JICI-IV' in a bold, black, sans-serif font. To the right of the text is a graphic element consisting of five horizontal lines of varying lengths and colors (blue, green, yellow, orange, red) that resemble a stylized bar chart or a set of data points.

Libro de resúmenes

IV Reunión de Jóvenes Investigadores en Coloides e Interfases (JICI IV) Córdoba, 2018
Presentaciones orales O-40

Estudio de Bioconjugados formados con nanopartículas de oro y la proteína Hemoglobina.

R. Del Caño, G. Sánchez-Obrero, J.M. Sevilla, R. Madueño, M. Blázquez, T. Pineda

Dep. De Química Física y T. A., Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Universidad de Córdoba, C. Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14014 Córdoba, España.
q92caocr@uco.es

El uso de nanomateriales en diferentes campos de aplicación tales como biomedicina, ciencia de materiales, energía, cosmética, etc,¹ se ha visto incrementado en los últimos años debido a las interesantes propiedades que presentan estos materiales en su forma nanométrica.

En este sentido, el oro es uno de los materiales más usados. Sin embargo, la utilización de estos nanomateriales en estos campos ha encontrado una barrera importante en el desconocimiento de la interface entre los materiales y el medio biológico.

Al poner las nanopartículas de oro en un fluido biológico se encuentra con numerosas proteínas y pequeñas moléculas a altas concentraciones que se pueden adsorber sobre la superficie de la nanopartícula formando una nube de proteínas agregadas conocida como “corona de proteínas”.

Es, por tanto, de gran importancia el estudio de estos sistemas con el objeto de conocer tanto su estructura como la estabilidad en diferentes entornos. La estabilidad, en particular, depende de la funcionalización superficial del nanomaterial.²

En este trabajo se aborda el estudio de la funcionalización superficial de nanopartículas de oro y de su interacción con material proteico, en concreto con la proteína Hemoglobina. Se hace énfasis en la estabilidad de las dispersiones de estos nanobioconjugados en medios acuosos. La utilización de diferentes técnicas de caracterización como son las espectroscopías FTIR, UV-visible y XPS permiten obtener información sobre la naturaleza de la capa molecular protectora del nanomaterial, así como sobre la estructura y conformación de las proteínas que forman parte de la corona. Además, se observa la transferencia electrónica (TE) de la proteína tras formar el bioconjugado y ser depositado sobre un electrodo de carbono vitrificado.³

Agradecimientos

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos), Junta de Andalucía (P10-FQM-6408) y Universidad de Córdoba.

Referencias

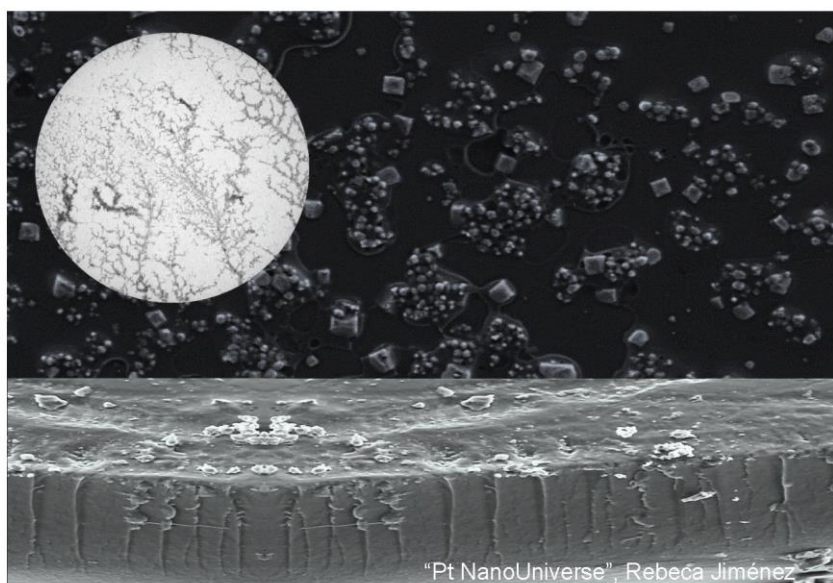
- [1] Hong, X.; Tan, C. L.; Chen, J. Z.; Xu, Z. C.; Zhang, H., *Nano Research* **2015**, 8 (1), 40-55.
- [2] del Caño, R.; Mateus, L.; Sánchez-Obrero, G.; Sevilla, J. M.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T., *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, 505, 1165-1171.
- [3] del Caño, R.; Mateus, L.; Sánchez-Obrero, G.; Sevilla, J. M.; Madueño, R.; Blázquez, M.; Pineda, T., *Talanta* **2018**, 176, 667-673.

IUNAN

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE NANOQUÍMICA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



"Pt NanoUniverse", Rebeca Jiménez

LIBRO DE RESÚMENES

NANOUCO VII

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología

Rectorado de la Universidad de Córdoba
21 y 22 de Enero de 2019

CARACTERIZACIÓN DE NANOTRIÁNGULOS DE ORO ESTABILIZADOS CON MONOCAPAS DE POLIETILENGLICOL.

Miriam Chávez*, Irene Humanes, Rafael del Caño, Guadalupe Sánchez, Rafael Madueño, José M. Sevilla, Manuel Blázquez, Teresa Pineda.
 Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Departamento de Química Física y T. A.,
 Universidad de Córdoba, Campus Rabanales, Ed. Marie Curie 2ª Planta, E-14014 Córdoba, España)
 z52chpem@uco.es

Las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales permiten modular sus propiedades biológicas de manera que se vuelvan aptos para su utilización como sistemas de terapia y diagnóstico, resultando de gran interés en Biomedicina. En este sentido, las nanopartículas de oro de diferentes formas y tamaños han demostrado ser de sumamente versátiles.¹ Sin embargo, las propiedades de la interfase nanomaterial/sistema biológico siguen sin estar del todo claras y continúan siendo objeto de interés. Los recubrimientos de nanoestructuras con monocapas autoensambladas (SAMs) de polímeros que contienen grupos oligo(etilenglicol) (OEG) terminales han demostrado ser eficientes frente a la adsorción inespecífica de proteínas, así como de otros componentes presentes en las células biológicas.²

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro con forma de pirámide triangular (AuNTs) funcionalizadas con OEG, prestando especial atención a la estabilidad y comportamiento de las mismas en medio acuoso.

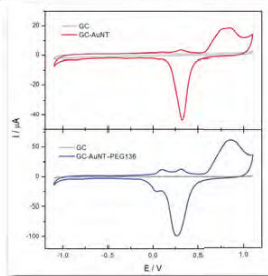


Figura. Perfiles electroquímicos de AuNTs en medios acuosos.

La caracterización se realiza mediante espectroscopia UV-visible-NIR, medidas de potencial zeta o dispersión dinámica de luz y se enfatiza el uso de técnicas electroquímicas (VC y EIS) para el estudio de la interfase de las AuNTs (Figura).

Agradecimientos

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos) y Universidad de Córdoba; M.C. agradece al Ministerio de Cultura y Deporte Ayuda FPU17/03873.

Bibliografía

1. Yin, H.; Guo, Y.; Cui, X.; Lu, W.; Yang, Z.; Yang, B.; Wang, J., Plasmonic and sensing properties of vertically oriented hexagonal gold nanoplates. *Nanoscale* 2018, 10 (31), 15058-15070.
2. Zaitouna, A. J.; Joyce, J.; Cerny, R. L.; Dussault, P. H.; Lai, R. Y., Comparison of Mannose, Ethylene Glycol, and Methoxy-Terminated Diluents on Specificity and Selectivity of Electrochemical Peptide-Based Sensors. *Anal. Chem.* 2015, 87 (13), 6966-6973.

P23-CFQ

SÍNTESIS DE NANOTRIÁNGULOS DE ORO (AUNTS) Y SEPARACIÓN POR TAMAÑOS.

Irene Humanes, Miriam Chávez, Rafael del Caño, Guadalupe Sánchez, Rafael Madueño, Jose M. Sevilla, Manuel Blázquez, Teresa Pineda.

Departamento Química Física y Termodinámica Aplicada, Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Universidad de Córdoba, Ed. Marie Curie, 2ª Planta, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, España.
q12hupei@uco.es

Las nanopartículas de oro con forma bien definidas han recibido gran atención en los últimos años. Las aplicaciones en diferentes campos como la Nanomedicina están sujetas al control de sus propiedades, en particular, las que se refieren a la homogeneidad en el tamaño y la forma. En este trabajo se describe un estudio de procedimiento de síntesis de nanopartículas de oro con forma de pirámide triangular (AuNTs), con el objeto de encontrar las condiciones experimentales apropiadas para obtener un mayor rendimiento. El interés de los AuNTs viene fundamentalmente de sus propiedades ópticas, presentando bandas de absorción en el intervalo UV-visible-NIR del espectro. La gran intensidad que presentan estas bandas, en particular en la región NIR permite sus aplicaciones fototérmicas.¹

Los procedimientos de síntesis² ensayados se monitorizan en tiempo real utilizando espectroscopia UV-visible-NIR. Se han utilizado diferentes estrategias que cambian el tiempo de reacción en diferentes pasos del procedimiento, así como cambios en las concentraciones de los reactivos de partida. La metodología empleada no permite obtener muestras de AuNTs puras. Por tanto, se hace necesario un paso adicional de separación de las nanopartículas, en función de su tamaño y forma. Para ello se aplica un método de depleción utilizando CTAC como surfactante. Este paso de separación se lleva a cabo utilizando diferentes concentraciones del surfactante y temperatura de incubación. La caracterización de las diferentes preparaciones se ha llevado a cabo mediante espectroscopia UV-visible-NIR, Dispersión dinámica de luz y medidas de potencial zeta.

Agradecimientos

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Proyectos CTQ2014-60227-R and CTQ-2015-71955-REDT Red de Excelencia Sensores y Biosensores Electroquímicos) y Universidad de Córdoba; M.C. agradece al Ministerio de Cultura y Deporte Ayuda FPU17/03873.

Referencias

1. Huang, X.; El-Sayed, I. H.; Qian, W.; El-Sayed, M. A., Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 2115-2120.
2. Pelaz, B.; Grazu, V.; Ibarra, A.; Magen, C.; del Pino, P.; de la Fuente, J. M., Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications. *Langmuir* **2012**, *28* (24), 8965-8970.