

Reacciones electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab:

Estudio de la interacción de especies biomédicas
en dendrímeros y nanopartículas.

Aila Jiménez Ruiz



Tesis Doctoral en Química
Universidad de Sevilla

Tesis Doctoral
Química

Reacciones Electroquimioluminiscentes y
parámetros CIELab: Estudio de la
Interacción de Especies Biomédicas en
Dendrímeros y Nanopartículas

Autor:

Aila Jiménez Ruiz

Directores:

M^a Pilar Pérez Tejeda

Catedrática de Universidad

Rafael Prado Gotor

Profesor Titular

Depto. de Química Física

Facultad de Química

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016

Tesis doctoral: Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab:
Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y
Nanopartículas

Autor: Aila Jiménez Ruiz

Tutor: M^a Pilar Pérez Tejeda

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los
siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2016

El Secretario del Tribunal

*A las dos grandes
personas que me enseñaron
a leer, a pensar, y a vivir.*

Agradecimientos

La autora de esta Tesis Doctoral desea hacer constar de forma explícita su agradecimiento a las siguientes personas, por su ayuda y colaboración durante el desarrollo de la misma:

*A la directora, **Dña Pilar Pérez Tejada** y al co-director, **D. Rafael Prado Gotor**, porque sin ellos, obviamente, no existiría esta Tesis. Gracias por vuestro gran trabajo investigador y por la atención y guía prestadas antes, durante y después de (¡espero!) todo el proceso. Y por ser dos magníficas personas cuyo trato ha hecho de este trabajo una gran experiencia.*

*A mi compañero para lo bueno y para lo malo, **José María Carnerero**, un buen investigador, mejor docente y revisor metódico de todas mis meteduras de pata. Y a **Elia Grueso**, quien colaboró aportando su experiencia en microscopía electrónica y en ciencia en general, con el deseo de que su próxima maternidad le sea leve y gratificante.*

*A **Dña. Consuelo Cerrillos González** y a **D. Francisco Varela Fera**, y en general al personal de los servicios de Microscopía Electrónica (AFM y TEM) y de Caracterización Funcional del CITIUS, que nos han atendido todas nuestras necesidades y solicitudes de forma amabilísima, respondiendo a todas las dudas habidas y por haber y facilitándonos enormemente la tarea de obtención de datos en sus equipos.*

*A **Paula Castillo**, quien desarrolló y perfeccionó muchas de las síntesis de nanopartículas que se emplean en esta Tesis Doctoral, por su gran trabajo, su amabilidad y su sonrisa.*

A la Entidad Financiadora de estos estudios de Doctorado en Química, que ha sido mi madre, sin la cual, de nuevo, no habría Tesis. A ella y a Cristóbal agradezco su apoyo incondicional a lo largo de todo el proceso. Y a mi padre, in memoriam, por presentarme a la Química cuando tenía 9 años y por ser mi guía y mi referente.

Y a todo aquel que esté leyendo estas líneas: sin ti, que lees, investigas y buscas información, no habría ciencia. Muchas gracias.

Resumen

La presente Tesis Doctoral, formulada en la modalidad de Tesis por Compendio de Publicaciones, constituye un estudio en profundidad de una serie de interacciones ligando-receptor, que tienen en común la naturaleza supramolecular, la baja toxicidad para el organismo humano y la probada capacidad portadora del receptor (dendrímeros de tipo PAMAM y nanopartículas de oro o plata protegidas por citrato sódico) y el hecho de que el ligando presenta un interés biomédico o biológico, constituyendo por tanto un avance en el campo del conocimiento y la modulación de dichas interacciones con vistas al desarrollo de posibles aplicaciones biomédicas. En el transcurso de los estudios que dan lugar a esta Tesis se ha llevado a cabo el desarrollo y puesta a punto de dos metodologías de trabajo novedosas. La primera de ellas es la electroquimioluminiscencia (ECL) generada por dendrímeros PAMAM en presencia de un sensibilizador y en ausencia de coreactivo adicional, que permite el estudio de las interacciones tanto interdendrímicas como del dendrímero con un ligando adicional; esta línea de investigación continúa la iniciada por nuestro Grupo de Investigación en 2012. La segunda metodología, totalmente nueva en este caso, estudia la aplicación de los parámetros colorimétricos CIELab al estudio del comportamiento de sistemas de nanopartículas en presencia de ligandos que inducen agregación acompañada de cambio de color, medible y cuantificable a partir del análisis de dichos parámetros, y a la determinación de las constantes de interacción ligando-receptor de dichos sistemas. Finalmente, una tercera parte de la Tesis se encuentra dedicada a la influencia de las nanopartículas de oro y plata sobre un sistema ECL modelo, con el objetivo de realizar una aproximación al comportamiento de la especie sensibilizadora, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, en presencia de partículas de fuerte carga aniónica.

Abstract

The present PhD Thesis, formulated under the Thesis by Publications model, constitutes a thorough study of a series of ligand-receptor interactions, which share a number of common traits: receptors (PAMAM dendrimers and citrate-capped nanoparticles) are of a supramolecular nature, present a low toxicity in humans, and their drug carrier capacity has been proven beyond any doubts, while ligands are of biomedical or biological interest, making these studies into an important first step for the knowledge and modulation of those systems and opening up possible research venues for their application in biomedicine. In the course of the research involved in this PhD Thesis two novel methodologies have been developed and tested. The first one is the application of electrogenerated chemiluminescence reactions (ECL) carried out by addition of PAMAM dendrimers into a sensitizer solution with no additional coreactants, which allows for the study of both interdendritic and dendrimer-ligand interactions. This line of research continues the one started by our Research group in 2012. The second methodology has been developed from the start in the course of this PhD Thesis, and focuses in the study of nanoparticle-receptor interactions presenting aggregation-induced color changes by using the colorimetric parameters of the CIELab color system, which allows for the quantification of those changes and for the determination of ligand-receptor binding constants. Finally, the third part of the Thesis covers the influence of both gold and silver nanoparticles over a model ECL system, studying the behavior changes of the common sensitizer species $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ in the presence of highly-charged negative particles.

Índice

Agradecimientos	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Tablas	xxv
Notación y abreviaturas	xxvii
1. Introducción	29
1.1. Reacciones electroquimioluminiscentes (ECL).....	31
1.1.1. Eficiencia ECL, Φ_{ECL}	39
1.2. Colorimetría: el espacio de color CIELab.....	42
1.2.1. Espacios de color absolutos y desarrollo del sistema CIELab.....	42
1.2.2. El color en las nanopartículas: definición y propiedades ópticas.....	52
2. Objetivos	57
3. Artículos publicados.....	61
3.1. <i>Electrogenerated chemiluminescence reactions between the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium</i>	64
3.1.1. Resumen.....	64
3.1.2. Introducción.....	65
3.1.3. Procedimiento experimental	68
3.1.3.1. Reactivos.....	68
3.1.3.2. Medidas ECL.....	68
3.1.3.3. Medidas electroquímicas	70

3.1.3.4. Medidas AFM	70
3.1.4. Resultados.....	71
3.1.4.1. ECL.....	71
3.1.4.2. Potenciales redox.....	73
3.1.4.3. Imágenes AFM.....	75
3.1.5. Discusión	79
3.1.6. Conclusiones	82
3.2. <i>CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles</i>	85
3.2.1. Resumen	85
3.2.2. Introducción.....	86
3.2.3. Procedimiento experimental.....	88
3.2.3.1. Reactivos.....	88
3.2.3.2. Instrumentación	88
3.2.4. Resultados y discusión	89
3.2.5. Conclusiones	103
3.3. <i>Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence</i>	107
3.3.1. Resumen	107
3.3.2. Introducción.....	108
3.3.3. Agente reductor	111
3.3.3.1. Influencia de los procesos de reducción directa en los procedimientos de síntesis	111
3.3.3.2. El oro como catalizador – estrategias de crecimiento a partir de semillas	116
3.3.4. Influencia del agente estabilizante	122
3.3.5. Influencia del pH.....	124
3.3.6. Otros factores	126
3.3.6.1. Temperatura.....	126
3.3.6.2. Agitación y orden de adición	128
3.3.7. Conclusiones y perspectivas	129
4. Trabajo Complementario	135
4.1. <i>Trabajos en proceso de publicación</i>	137
4.1.1. Electrochemiluminescent (ECL) Ru(bpy) ₃ ²⁺ / PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation	137
4.1.1.1. Resumen	137

4.1.1.2. Introducción	138
4.1.1.3. Procedimiento experimental	139
4.1.1.4. Resultados	140
4.1.1.5. Discusión.....	144
4.1.1.6. Conclusiones	151
4.1.2. Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIElab and deconvolution study.....	153
4.1.2.1. Resumen.....	153
4.1.2.2. Introducción	153
4.1.2.3. Materiales y métodos.....	156
4.1.2.4. Resultados y discusión.....	157
4.1.2.1. Conclusiones	174
4.2. <i>Trabajo adicional no recogido en publicaciones</i>	175
4.2.1. Determinación de la influencia de las nanopartículas comerciales de oro-citrato de 5 nm en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	175
4.2.1.1. Resumen.....	175
4.2.1.2. Introducción	175
4.2.1.3. Procedimiento experimental	176
4.2.1.4. Resultados y discusión.....	176
4.2.1.5. Conclusiones	180
4.2.2. Síntesis y optimización de la estabilidad de nanopartículas de platocitrato de 5 nm y su influencia en la eficiencia ECL en la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	181
4.2.3. Resumen.....	181
4.2.3.1. Introducción	181
4.2.3.2. Procedimiento experimental	182
4.2.3.3. Resultados y discusión.....	183
4.2.3.4. Conclusiones	193
5. Resumen global de los resultados y discusión	195
5.1. <i>Artículos publicados</i>	195
5.1.1. Electrogenenerated chemiluminescence reactions between the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium	195
5.1.2. CIElab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles	196
5.1.3. Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence	197

5.2. Trabajo adicional no recogido en publicaciones.....	198
5.2.1. Electrochemiluminescent (ECL) Ru(bpy) ₃ ²⁺ / PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation	198
5.2.2. Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIElab and deconvolution study	199
5.2.3. Determinación de la influencia de las nanopartículas comerciales de oro-citrato de 5 nm en la eficiencia ECL de la reacción Ru(bpy) ₃ ²⁺ /C ₂ O ₄ ²⁻	199
5.2.4. Síntesis y optimización de la estabilidad de nanopartículas de platá-citrato de 5 nm y su influencia en la eficiencia ECL de la reacción Ru(bpy) ₃ ²⁺ /C ₂ O ₄ ²⁻	200
6. Conclusiones	201
Referencias.....	203
Índice de Conceptos	231
Anexo A: Relevancia Científica de las Publicaciones.....	233
6.1. Electrogenenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy) ₃] ²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium.....	234
6.2. CIElab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.....	237
6.3. Nonfunctionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.....	241
Anexo B: Permisos y Declaraciones	244
Informe del director de tesis con la aprobación del órgano responsable sobre la idoneidad de esta modalidad:.....	245
Informe detallado del director/es de tesis con la contribución de cada autor (para artículos con más de cuatro autores):	246
Aceptación por escrito de los coautores de la presentación de los trabajos como tesis.....	248
Renuncia de las personas que compartan autoría que no sean doctores a presentarlos como parte de otra tesis	254
Autorización para la presentación de Tesis Doctoral.....	255

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Longitudes de onda registradas por cada uno de los tres conos L, M y S (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de http://www.cvrl.org , recurso web consultado en Septiembre 2015)	43
Figura 1.2 Distribución de potencia espectral del Iluminante D65 (estándares oficiales de la CIE, obtenidos de http://www.cie.co.at , recurso web consultado en Mayo 2016).....	44
Figura 1.3 Funciones CIE rgb de 1931 (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de http://www.cvrl.org , recurso web consultado en Septiembre 2015).....	45
Figura 1.4 Funciones del observador xyz (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de http://www.cvrl.org , recurso web consultado en Septiembre 2015).....	47
Figura 1.5 Diagrama x, y mostrando el punto blanco del sistema (E) y las coordenadas de los tres colores primarios R, G, B del sistema CIE RGB (imagen obtenida del repositorio Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CIE1931xy_CIERGB.svg bajo licencia de Dominio Público)	48
Figura 1.6 Funciones de colores opuestos propuestas por Schrödinger (1925). Rot/Grün es el par rojo/verde, mientras que Blau/Gelb es el par azul/amarillo. Hell es el canal de brillo [52]. Reproducido de Erwin Schrödinger, (1925): Über das Verhältnis der Vierfarben- zur Dreifarbentheorie - Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse 134_2a: 471-490, de libre acceso a través de la plataforma Zobodat (http://www.zobodat.at).....	49

Figura 1.7 Representación esquemática del sistema de ejes coordenados CIEL*a*b*	51
Figura 3.1: Estructura del dendrímero PAMAM G2.0	66
Figura 3.2: Representación esquemática de la célula electroquímica empleada para las medidas de ECL	69
Figura 3.3: De izquierda a derecha y de arriba a abajo, curvas de intensidad de corriente frente a potencial, intensidad de corriente frente a tiempo, emisión frente a potencial y emisión frente a tiempo para una concentración de dendrímero [G1.0] = 9.26×10^{-5} M.	72
Figura 3.4: Voltagrama del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ obtenido mediante VPD para una concentración de dendrímero PAMAM G2.0 de 8.12×10^{-5} M	74
Figura 3.5: A la izquierda, imágenes topográficas obtenidas mediante AFM para concentraciones [G1.0] = 10^{-4} M (arriba) y 10^{-3} M (abajo). A la derecha, cortes transversales de ambas imágenes a lo largo de las líneas marcadas.	76
Figura 3.6: A la izquierda, imágenes topográficas obtenidas mediante AFM para concentraciones [G2.0] = 10^{-4} M (arriba) y 10^{-3} M (abajo). A la derecha, cortes transversales de ambas imágenes a lo largo de las líneas marcadas.	77
Figura 3.7: Eficiencia ECL en función de la concentración de dendrímero a pH 10	81
Figura 3.8: Valores de $\Delta\lambda$, expresado como $\lambda_{\text{agregado}} - \lambda_{\text{libre}}$, para las cuatro biomoléculas estudiadas (de izquierda a derecha y de arriba a abajo: lisozima, adenosina, lisina y tiourea). Los desplazamientos superiores a $\Delta\lambda = 10$ corresponden a disoluciones donde empiezan a aparecer colores morados o azules a simple vista y se encuentran marcados en color azul en la gráfica.	90
Figura 3.9: Parámetros CIELab obtenidos para las cuatro biomoléculas estudiadas (de izquierda a derecha y de arriba a abajo: lisozima, adenosina, lisina y tiourea). Los valores positivos y negativos de ambos parámetros se colorean empleando el tono que expresan respectivamente, mientras que su valor numérico es una expresión de la intensidad de dicho tono.	91

Figura 3.10: Ajustes empleando el modelo de dos estados para los parámetros normalizados (x^*/x_0^* , donde x_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) a^* y b^* de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, para $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ $[Lis] = 0 - 3.75 \times 10^{-8} \text{ M}$; $[Ad] = 0 - 9 \times 10^{-4} \text{ M}$; para $[AuNPs] = 3.2 \times 10^{-10} \text{ M}$ $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[Tiourea] = 0 - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 94

Figura 3.11: Ajustes empleando el modelo de Benesi-Hildebrand para los parámetros normalizados (x^*/x_0^* , donde x_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) a^* y b^* de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, para $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ $[Lis] = 0 - 3.75 \times 10^{-8} \text{ M}$; $[Ad] = 0 - 9 \times 10^{-4} \text{ M}$; para $[AuNPs] = 3.2 \times 10^{-10} \text{ M}$ $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M a } 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[Tiourea] = 0 - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 96

Figura 3.12: Ejemplo de deconvolución de espectro correspondiente a una disolución $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} \text{ M}$, $[Lis] = 2.8 \times 10^{-8} \text{ M}$. El pico rojo (521 nm) corresponde al pico de absorbancia de las nanopartículas libres y el azul (~600 nm) a la fracción agregada..... 97

Figura 3.13: Ajustes empleando el modelo de dos estados para el área del pico correspondiente a la fracción de nanopartículas libres normalizada ($\text{área}^*/\text{área}_0^*$, donde área_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, $[Lis] = 1.3 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-8} \text{ M}$; $[Ad] = 0 - 9 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[Tiourea] = 0 - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 98

Figura 3.14: Ajustes empleando el modelo de Benesi-Hildebrand para el área del pico correspondiente a la fracción de nanopartículas libres normalizada ($\text{área}^*/\text{área}_0^*$, donde área_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) de las cuatro biomoléculas estudiadas De izquierda a derecha y de arriba abajo, para $[Lis] = 3 \times 10^{-8} \text{ M a } 6.25 \times 10^{-8} \text{ M}$; $[Ad] = 8 \times 10^{-5} \text{ M a } 5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M a } 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[Tiourea] = 0 - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ 99

Figura 3.15: Ajuste, empleando el modelo de dos estados, de los datos experimentales de pérdida de emisión (expresados como I/I_0) para $[lis] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 102

Figura 3.16: Representación de Stern Volmer para tres concentraciones diferentes de lisozima y concentración variable de AuNPs..... 102

Figura 4.1 Curvas a) emisión/potencial y b) emisión/tiempo para [5-Fu]= 2.5×10^{-4} M y [G1.0] = 1.0×10^{-4} M a pH 6.1.....	141
Figura 4.2 Curvas a) emisión/potencial y b) emisión/tiempo para [5-Fu] 2.5×10^{-4} M y [G1.0] = 1.0×10^{-4} M a pH 10.....	141
Figura 4.3 Voltagrama VPD del par Ru(bpy) ^{3+/2+} en una disolución de [5-Fu] = 5.0×10^{-3} M, [G1.5] = 1.0×10^{-4} M a pH 10.	143
Figura 4.4 Valores de eficiencia ECL en función de la concentración de dendrímero para G1.0 y G1.5 a pHs 6.1 y 10.	146
Figura 4.5 Emisión del dendrímero G1.5 excitado a 288 nm en ausencia y presencia de [5-Fu] = 10^{-2} M.....	150
Figura 4.6 Espectros de absorbancia normalizados de una serie de disoluciones conteniendo [AuNPs] = 2.5×10^{-10} M y concentraciones variables de dendrímero PAMAM G1.0. Las concentraciones a las que se produce una reversión de la banda hacia longitudes de onda menores se encuentran marcadas con trazo discontinuo.	157
Figura 4.7 Desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción respecto al blanco ($\Delta\lambda$, expresado como $\lambda_{max} - \lambda_{libre}$) para concentraciones variables de dendrímero PAMAM G1.0.....	158
Figura 4.8 Intensidad de emisión máxima corregida y normalizada para disoluciones de dendrímero de concentraciones a) [G1.0] = 1.4×10^{-4} M y b) [G1.0] = 3.5×10^{-4} M y concentraciones variables de AuNPs	160
Figura 4.9 Estructura del dendrímero PAMAM de primera generación a pH 6. Los grupos amino primarios terminales, en naranja, presentan carga positiva mientras que los grupos amino terciarios internos, en azul, están desprotonados (datos obtenidos de Cakara y colaboradores, referencia [100])	161
Figura 4.10: Espectros de absorbancia normalizados de una serie de disoluciones conteniendo [AuNPs] = 2.6×10^{-10} M y concentraciones variables de dendrímero PAMAM G1.5.....	162
Figura 4.11 Variación de los parámetros CIELab para una serie de disoluciones conteniendo [AuNPs] = 2.5×10^{-10} M y distintas concentraciones de dendrímero G1.0. Los puntos de la gráfica están coloreados según parámetro y signo de acuerdo con	

el tono que representan. La fotografía muestra el color de las disoluciones para $[G_{1.0}] = 1 \times 10^{-8}$ a 2.5×10^{-7} M.	164
Figura 4.12 Imágenes TEM y medidas para $[Au] = 2.5 \times 10^{-10}$ M y $[G_{1.0}] = 1.5 \times 10^{-8}$ M (arriba), $[G_{1.0}] = 2.8 \times 10^{-8}$ M (centro) and $[G_{1.0}] = 8.3 \times 10^{-8}$ M (abajo). Las imágenes interiores han sido tomadas con menor magnificación.	167
Figura 4.13 Espectros de absorbancia normalizados para disoluciones $[G_{1.0}] = 1.4 \times 10^{-4}$ M y concentraciones variables de nanopartículas.	170
Figura 4.14 Ajuste según el modelo de dos estados para los parámetros a^* y b^* normalizados de disoluciones conteniendo $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M y concentraciones variables de $G_{1.0}$	171
Figura 4.15 Ajuste según el modelo de Benesi-Hildebrand para los parámetros a^* y b^* normalizados de disoluciones conteniendo $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M y concentraciones variables de $G_{1.0}$	171
Figura 4.16 Ejemplo de deconvolución para el espectro de una disolución $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M, $[G_{1.0}] = 3 \times 10^{-8}$ M. El pico rojo corresponde a la fracción de nanopartículas libres, y los dos picos en azul claro y oscuro a dos estructuras agregadas con distribuciones de tamaño diferentes.	172
Figura 4.17 Ajuste según el modelo de Benesi-Hildebrand para el área normalizada (definida como el cociente área/área en ausencia de $G_{1.0}$) del pico correspondiente a la fracción libre de nanopartículas para una serie de disoluciones donde $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M.	173
Figura 4.18 Espectros de absorbancia (izquierda) y parámetros CIELab (derecha) para ambos métodos de adición y para una disolución de referencia conteniendo $[Ru(bpy)_3^{2+}] = 2 \times 10^{-4}$ M.	177
Figura 4.19 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad/tiempo (derecha) para el oxalato en ausencia de oro (negro) y para $[AuNPs] = 2.0 \times 10^{-8}$ M según el método A (rojo) y según el método B (verde).	178
Figura 4.20 Espectro de emisión del $Ru(bpy)_3^{2+}$ durante un proceso ECL.	179
Figura 4.21 Imagen obtenida mediante TEM de la síntesis descrita.	183
Figura 4.22 Distribución de tamaño de partícula obtenido.	184

Figura 4.23 Espectros de absorbanza de una suspensión de [AgNPs] = 4.9×10^{-9} M a concentraciones variables de NaCl.....	185
Figura 4.24 Espectros de absorbanza de una suspensión de [AgNPs] = 4.9×10^{-9} M a concentraciones variables de CaCl ₂	185
Figura 4.25 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad de corriente/tiempo (derecha) para la reacción Ru(bpy) ₃ ²⁺ /oxalato en ausencia de plata (negro) y para [AgNPs] = 9.7×10^{-9} M (rojo) y 2.9×10^{-8} M (verde).....	187
Figura 4.26 Espectros de absorbanza de una suspensión de [AgNPs] = 4.9×10^{-9} M y concentraciones variables de citrato sódico.....	188
Figura 4.27 Agregación de una suspensión [AgNPs] = 4.9×10^{-9} M a) en ausencia de citrato sódico, b) en presencia de [Cit] = 5×10^{-3} M, c) [Cit] = 7.5×10^{-3} M, d) [Cit] = 1.3×10^{-2} M.....	189
Figura 4.28 Espectro de absorbanza de la banda plasmon de una suspensión de nanopartículas [AgNPs] = 4.6×10^{-8} M, (negro, línea continua) y realizado en las condiciones de medida ECL para la concentración de nanopartículas más elevada ([AgNPs] = 4.6×10^{-8} M, [Cit] = 1.3×10^{-2} M, [Ru(bpy) ₃ ²⁺] = 2×10^{-4} M, [Ox] = 2×10^{-3} M; rojo, línea discontinua). A fin de visualizar las bandas de absorbanza de la nanopartícula con claridad, del espectro segundo se ha restado el espectro de absorbanza del Ru(bpy) ₃ ²⁺	190
Figura 4.29 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad de corriente/tiempo (derecha) para el oxalato en ausencia de plata (negro) y para [AgNPs] = 5.8×10^{-9} M (rojo) y 4.0×10^{-8} M (verde). La línea amarilla indica la emisión ECL de una disolución [Ox] = 2×10^{-3} M, [Cit] = 1.3×10^{-2} M.....	191
Figura 4.30 Espectros de emisión para una disolución que contiene [Ru(bpy) ₃ ²⁺] = 2×10^{-4} M, [cit] = 1.25×10^{-2} M y [AgNPs] = 0 a 3.9×10^{-8} M	192
Figura 4.31 Ajuste según el modelo de pseudofase para la determinación de la constante de enlace AgNPs-Ru(bpy) ₃ ²⁺ a partir de medidas de quenching de fluorescencia	193

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1: Eficiencias ECL relativas, φ_{ECL} , para una serie de disoluciones de dendrímeros PAMAM G1.0 y G2.0 a pH 10.	73
Tabla 3.2: Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SEH), para una serie de disoluciones de dendrímeros PAMAM G1.0 y G2.0.....	74
Tabla 3.3: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando el modelo de dos estados a los parámetros CIELab de las cuatro biomoléculas	95
Tabla 3.4: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando el modelo de Benesi-Hildebrand a los parámetros CIELab de las cuatro biomoléculas.....	97
Tabla 3.5: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando los modelos de dos estados y de Benesi-Hildebrand al área del pico libre normalizado para las cuatro biomoléculas.....	100
Tabla 3.6: Resumen de las energías libres de enlace con nanopartículas de oro obtenidas para lisozima, adenosina, lisina y tiourea a partir del análisis de parámetros CIELab y de deconvolución.....	101
Tabla 3.7: Resumen de los procedimientos sintéticos desarrollados en el presente trabajo, ordenados por grupo y año de publicación	131
Tabla 4.1: Valores de φ_{ECL} en ausencia de 5-Fu para los dendrímeros G1.0 y G1.5 a pH 6.1 y pH 10.	142
Tabla 4.2: Valores de φ_{ECL} para concentraciones $[G1.0] = [G1.5] = 10^{-4}M$ en presencia de concentraciones variables de 5-Fu a pH 6.1 y pH 10.	142
Tabla 4.3 Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) para disoluciones de G1.0 y G1.5 a concentraciones variables y a pH 6.1 y 10.	143

Tabla 4.4 Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) para disoluciones de $[G1.0] = [G1.5] = 10^{-4}M$ en presencia de concentraciones variables de 5-Fu a pH 6.1 y 10.	143
Tabla 4.5 Valores de pendiente, coeficientes de correlación y rango lineal para los datos recogidos en la Figura 4.4	146
Tabla 4.6 Resumen de las energías libres del enlace G1.0/AuNPs a partir del análisis de parámetros CIELab y de deconvolución.	173

Notación y abreviaturas

Abreviatura	Término
[]	Concentración
Ad	Adenosina
AFM	Microscopía de fuerza atómica
Ag	Plata
Au	Oro
bpy	Bipiridilo
CV	Voltametría cíclica
ECL	Electroquimioluminiscencia
Lis	Lisozima
M	mol.l ⁻¹
Nps	Nanopartículas
Ox	Oxalato (C ₂ O ₄ ²⁻)
PAMAM	Poliamidoamina

QL	Quimioluminiscencia
SPB	Surface Plasmon (resonance) band - Banda de resonancia del plasmón superficial
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
VPD	Voltametría de pulso diferencial
ϕ	Rendimiento cuántico

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones ligando-receptor constituye por sí mismo un campo muy amplio de la ciencia. No se trata, sin embargo, de un área de estudio nativa de la química, sino que tiene sus raíces en la combinación de la medicina con la biología; se pueden empezar a buscar sus orígenes en el auge de la primera a finales del siglo XIX, al calor del creciente interés científico en el desarrollo de fármacos sintéticos para tratar las más diversas enfermedades. Se trata de un proceso, en sus orígenes, puramente experimental, pero que ya apuntaba a la existencia de una base química subyacente: si una sustancia produce un efecto, sea éste beneficioso o perjudicial, en el organismo, es a través de su interacción con un receptor. El desarrollo matemático que permitiría no ya conocer la existencia y naturaleza de estas interacciones, sino su cuantificación, introduciría las interacciones ligando-receptor en el campo de la Cinética Química y de la Termodinámica. Este desarrollo irá teniendo lugar paulatinamente a lo largo de la primera mitad del siglo XX, pero crecerá exponencialmente a partir de la década de 1960 con el desarrollo de las técnicas de purificación y caracterización espectroscópicas que permitirán obtener gran variedad de sustratos biológicos con la pureza suficiente para ser estudiados de forma aislada. Hoy en día, el volumen anual de publicaciones de las más diversas áreas, desde la medicina y la farmacología a la biología y la química, en el campo de la interacción de ligandos (sean estos naturales, artificiales o biomiméticos) con receptores de la más variada naturaleza es enorme y da cuenta del gran interés científico que aún existe en el estudio de este tipo de interacciones.

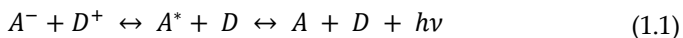
A lo largo de esta sección de Introducción se va a realizar una breve reseña de la

naturaleza de los ligandos y receptores que se han empleado en el estudio de las interacciones objeto de esta Tesis Doctoral, así como de los procedimientos y fundamentos teóricos de los métodos de estudio que han permitido la caracterización de dichas interacciones.

1.1. Reacciones electroquimioluminiscentes (ECL)

Las reacciones de alta energía son procesos químicos que se caracterizan por su alta y favorable energía libre de reacción. Estos procesos son fuertemente exotérmicos y el término entrópico ($T\Delta S$) es aproximadamente de 0'1 eV. Lo relevante de estas reacciones es que en determinadas condiciones generan una radiación electromagnética; esto es, en ellas parte de la energía química puede convertirse en energía luminosa. Los procesos químicos que juegan un papel importante en la conexión entre energía química y energía luminosa son las reacciones de transferencia electrónica, y a ellas nos referiremos en lo sucesivo.

Desde un punto de vista esquemático las reacciones que generan luz (quimiluminiscentes) (QLs) se relacionan con las reacciones fotoluminiscentes (FLs) según:

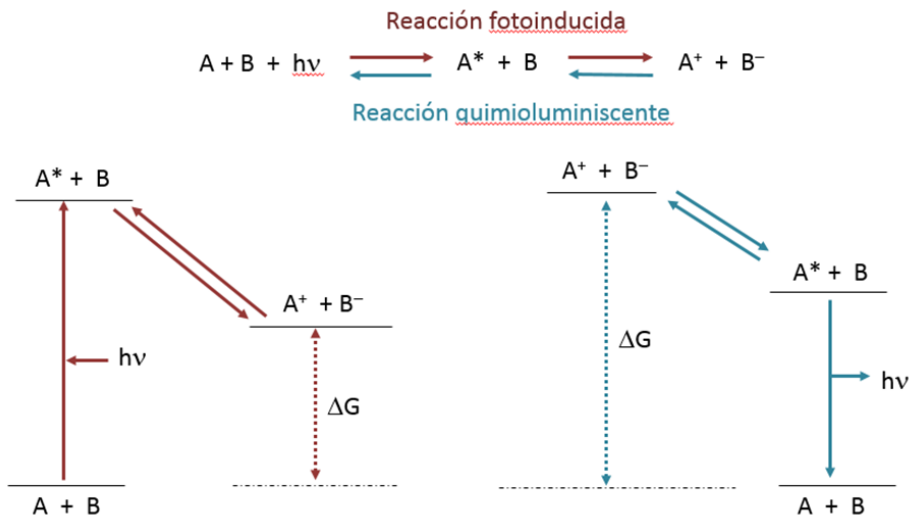


De modo que, para que una reacción fotoquímica pueda darse, es necesaria la absorción de una radiación electromagnética adecuada; parte de la energía luminosa absorbida se transforma en energía química. En cambio, en las reacciones quimiluminiscentes parte de la energía química que se origina al formarse los productos se convierte en energía luminosa (véase **Esquema 1.1**).

Aunque ambos tipos de procesos guardan cierto paralelismo, las reacciones QLs han sido menos estudiadas que las fotoquímicas. La dificultad intrínseca del estudio de los procesos quimiluminiscentes reside en la generación del estado de reactivo dado que ($G_{\text{Reactivo}} \gg G_{\text{Productos}}$) (donde G es la energía libre). Esto es, los reactivos no son estables termodinámicamente y deben generarse a partir de precursores que sí lo sean. Por tanto, las especies que se requieren para generar el estado de reactivos de alta energía deben ser una de ellas muy oxidante y la otra muy reductora.

Es necesaria también la existencia de un estado electrónico excitado de uno de los productos, y además que éste sea de energía adecuada ($G_{A^-} > G_{A^*} > G_A$), y luminiscente. Debido a estas dificultades se emplean frecuentemente *sensibilizadores*; estas especies actúan como receptoras y almacenadoras tanto de energía luminosa como química. Es conocido [1] que algunas especies pueden actuar como LAS (*light absorption sensitizer*) y como LES (*light emission sensitizer*). De

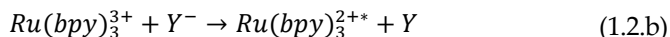
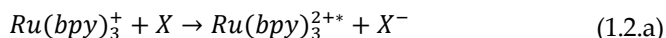
hecho, se requieren las mismas características en cuanto a la estabilidad térmica y fotoquímica, y a sus propiedades redox. También las propiedades espectroscópicas son esencialmente similares, dado que la característica a destacar es la lenta desactivación radiativa. Esto es, las especie LAS deben tener un tiempo de vida suficientemente grande, y las LES una alta eficiencia de emisión.



Esquema 1.1 Esquema de estados energéticos para una reacción fotoinducida (izquierda) y quimioluminiscente (derecha)

Las especies sensibilizadoras más utilizadas son los complejos organometálicos de Ru (II) e Ir (III) debido a sus excelentes propiedades LAS y LES (otras especies pueden visualizarse en W. Miao[2], por ejemplo).

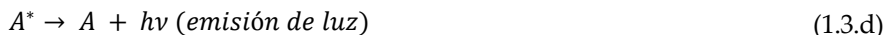
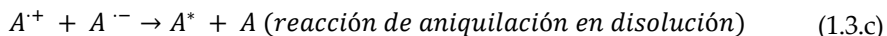
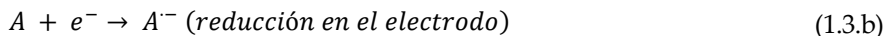
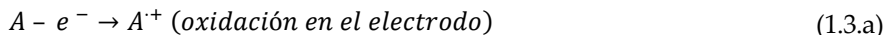
Como ya se ha dicho, los procesos quimioluminiscentes propiamente dichos requieren la generación, mediante una reacción química, de un estado excitado luminiscente (eq. 1). Si se toma el complejo $Ru(bpy)_3^{2+}$ como prototipo, un camino sería oxidar a la especie Ru(I) (1.2.a), y el otro reducir a la especie Ru(III) (1.2.b):



Especies oxidantes (X) como $S_2O_8^{2-}$ y $Ce(IV)$ en medio ácido, y reductoras (Y) como N_2H_4 , $C_2O_4^{2-}$ y OH^- se han utilizado con este fin [3], [4]. Sin embargo, la principal desventaja de este método es la generación de los reactivos de alta energía, así como mantener la concentración requerida de éstos con el fin de que el espectro de luminiscencia sea suficientemente intenso. Por este motivo, se emplea más frecuentemente la generación electroquímica de estados excitados. La electroquimiluminiscencia (ECL) implica la producción “in situ” de las formas oxidada y/o reducida de un sensibilizador en la superficie de un electrodo a partir de precursores estables termodinámicamente; estas especies, al reaccionar en disolución, forman un estado excitado que emite luz.

Las ventajas de la ECL sobre la quimiluminiscencia (QL) son básicamente la sensibilidad y la selectividad. Esto es, mediante el uso de ECL es posible confinar la luz en una región de la célula electroquímica que esté situada con precisión respecto al detector, así la relación señal/ruido es mayor. Asimismo, es posible la generación selectiva de estados excitados mediante la variación de los potenciales aplicados. Además, esta técnica permite la regeneración de los reactivos después de la emisión de la radiación. Es esencial también la especificidad de las reacciones ECL, disminuyendo así los problemas de las reacciones colaterales como los procesos de auto-*quenching*.

Usualmente, hay varias formas de abordar el estudio de las reacciones ECL. Una de ellas consiste en el uso de una o dos especies luminiscentes; otra se basa en la utilización de coreactivos (reactivos no luminiscentes). Ambas tienen en común la generación de reacciones entre radicales libres. Las reacciones ECLs del primer tipo, llamadas de *aniquilación*, pueden ser *sistemas de energía suficiente* o *sistemas de energía insuficiente*. A las primeras se les llama también de *ruta S*, y a las segundas de *ruta T*. En las reacciones de *ruta S*, ECL se produce partiendo de un mismo precursor, y en las de *ruta T* de dos precursores diferentes. Un mecanismo general de la *ruta S* es el siguiente [5], [6]



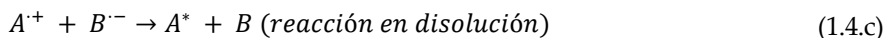
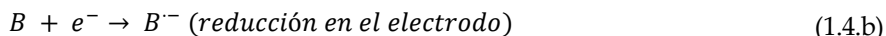
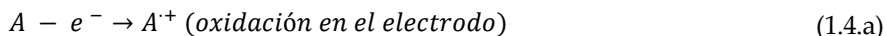
Mediante un pulso alternante de potencial se realiza un barrido entre los potenciales redox y reducción de la especie estable A. Al generarse las especies oxidada y reducida de A (**1.3.a**, **1.3.b**) cerca de la superficie del electrodo, se produce la reacción en disolución dando lugar al estado excitado.

Sistemas de energía suficiente son aquellos en los que la variación de entalpía de la reacción de transferencia electrónica (reacción de *aniquilación*) es mayor que la energía requerida para formar el estado excitado singlete desde el estado fundamental de la especie estable A. Un ejemplo de este tipo de sistema involucra a especies tales como, por ejemplo, rubeno (5,6,11,12-tetrafenil-antraceno) y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. En ambos casos el estado excitado producido en esa reacción es un estado singlete, por lo que a estos procesos se les conoce por *ruta S*. En el caso del rubeno, el estado luminiscente es el mismo que se ha producido en la reacción, $^1\text{RUB}^*$. En el caso del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, el estado luminiscente es el $^3\text{MLCT}$ triplete, pero la eficiencia de la reacción de transferencia singlete-triplete es aproximadamente igual a la unidad. En el caso de la *ruta T* o *sistemas de energía insuficiente*, el estado excitado singlete no se puebla directamente, por lo que se requiere un mecanismo más complicado que el anteriormente expuesto para generar la especie luminiscente, que generalmente involucra especies intermedias en estado triplete; de ahí que se le llame *ruta T*.

La otra estrategia, antes aludida, para la generación de los reactivos ECL de alta energía es el uso de coreactivos. Esta estrategia se utiliza con frecuencia en aplicaciones analíticas y biotecnológicas; el estudio de sistemas relevantes mediante ECL por coreactivo es de gran importancia dado que la mayoría de los instrumentos comerciales utilizan este tipo de sistemas ECL.

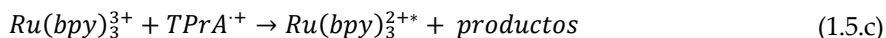
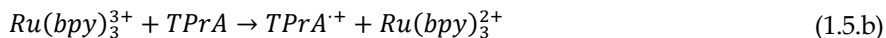
A diferencia de lo que sucedía en los sistemas anteriores, en los que es necesario la oxidación y la reducción electródica de las especies luminiscentes, es posible generar ECL realizando un barrido de potencial en una única dirección (oxidación o reducción) utilizando especies, llamadas coreactivos, que no son luminiscentes. Estas especies, una vez oxidadas o reducidas en el electrodo o cerca de él, producen intermediatos que reaccionan con la forma reducida u oxidada de una especie luminiscente para generar estados excitados que emiten luz. Como los coreactivos al oxidarse o reducirse forman especies muy reductoras o muy oxidantes, a este tipo de procesos se les conoce como reducción-oxidativa ECL u oxidación-reductiva ECL, respectivamente [7], [8]. Así, por ejemplo, el sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ fue el primero del tipo reducción-oxidativa que se estudió [9].

Todos estos sistemas tienen en común, en líneas generales, cuatro procesos: 1) reacción redox en el electrodo tanto de la especie luminiscente como del coreactivo; 2) reacciones químicas homogéneas; 3) formación del estado excitado y 4) emisión de radiación. El esquema siguiente refleja un mecanismo en medio no acuoso:



El compuesto B, tras un pulso o barrido de potencial, se reduce en disolución no acuosa (1.4.b) produciendo una especie fuertemente oxidante B⁻. El potencial aplicado al electrodo también oxida a una especie luminiscente A (1.4.a) como Ru(bpy)₃²⁺, por ejemplo, generando A⁺. Las especies A⁺ y B⁻ reaccionan dando lugar a un estado excitado capaz de emitir radiación luminosa (1.4.c, 1.4.d).

Algunos estudios se han realizado hasta la fecha incluyendo como coreactivos a aminas primarias, secundarias y terciarias [10], [11]. A este respecto, uno de los sistemas mejor estudiados, por su importancia comercial, es el sistema Ru(bpy)₃²⁺/TPrA (TPrA= tri-n-propilamina). Este sistema tiene una eficiencia ECL muy intensa, y es la base de sistemas comerciales para los ensayos de inmunoanálisis y detección de ADN. Una versión simplificada de su mecanismo ECL es la siguiente:



Recientes estudios en los que se utilizan simulaciones de voltametría cíclica y experimentos SECM (scanning electrochemical microscopy), ECL, y SECM-ECL [12] indican que en el sistema Ru(bpy)₃²⁺/TPrA la especie intermedia TPrA* puede ser también luminiscente, presentando un tiempo de vida media estimado de 0.2 ms. En el transcurso de estos estudios se obtuvo además evidencia directa de la existencia de este intermediato mediante estudios de resonancia de espín

electrónico. Por ello, los detalles de este mecanismo están aún en estudio [13], aunque se considera que el estado luminiscente principal es el MCLT del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ dado que sus espectros de ECL y fotoluminiscencia son iguales.

Es de destacar la importancia de los coreactivos en el crecimiento y desarrollo de ECL, dado que la mayoría de los sistemas de aniquilación requieren la utilización de disolventes no acuosos rigurosamente purificados y desoxigenados; el motivo principal del empleo de disolventes no acuosos en las reacciones ECLs de aniquilación es el estrecho margen de potenciales idóneos en agua para generar los precursores de alta energía. Así, por ejemplo, el potencial redox del par $\text{Ru}^{3+/2+}$ es aproximadamente igual a 1.2 V frente a SCE, y el del par $\text{Ru}^{2+/1+}$ es de alrededor de -1.4 V frente a SCE. Este último potencial no es medible con facilidad en disolución acuosa, dado que los productos de la oxidación y/o la reducción del agua interfieren con la reacción de aniquilación, de modo que la emisión ECL no se observa o lo hace muy débilmente. Sin embargo, en los sistemas que usan coreactivos, los precursores de alta energía se generan mediante un barrido de potencial **únicamente** en una dirección, permitiendo así la generación de ECL en disolución acuosa. Esto es, puede generarse ECL utilizando especies luminiscentes que sean únicamente reversibles electroquímicamente en el sentido de oxidación o de reducción, no es necesario generar simultáneamente las formas reducida y oxidada del precursor estable termodinámicamente. Otra ventaja de las reacciones ECL tipo reducción-oxidativa respecto al uso de las reacciones de aniquilación es que el efecto *quenching* del O_2 es menos importante que en las reacciones de aniquilación, por lo que las experiencias ECL se llevan a cabo sin necesidad de utilizar una atmósfera de N_2 o Ar. Una desventaja es, evidentemente, que los coreactivos no se recuperan, sino que se consumen vía reacciones electroquímicas y químicas. Algunos de los coreactivos más usados en agua, debido a su gran señal ECL, bajo coste y toxicidad y facilidad de manejo son el oxalato, el peroxodisulfato y la tripropilamina [1], [2], [7], [9], [11], [14]–[19]. Sin embargo, en los últimos años algunos estudios han explorado el uso de otros coreactivos no tradicionales, llevando al descubrimiento de la capacidad ECL del 2-(dibutilamino)etanol [20], [21] y del cloruro estannoso [15] entre otros. Dentro de las especies sensibilizadoras existen dos grandes grupos, las inorgánicas y las orgánicas. De las primeras se pueden mencionar los complejos de Ru^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Ir^{3+} , Os^{3+} y Ag^+ con ligandos bipyridilo, fenantrolina, biperazina, pirimidina, cianobifenilo, cianofluoruro y sus derivados. Entre las segundas se encuentran el naftaleno, rubreno, luminol, aril derivados del nitrógeno, N-dimetilanilina, antraceno, perileno, pireno y derivados

de distinta naturaleza. Es interesante constatar la influencia del ligando en la eficiencia ECL: se ha comprobado que a mayor capacidad dadora de electrones del ligando menor intensidad registrada del espectro ECL. Así, por ejemplo, la eficiencia ECL disminuye según la secuencia Fenantrolina > bipyridilo > dimetilbipyridilo (4,4' dimetil 2, 2'- bipyridil) > PBI_n-Me ((2-(2'-piridil)-N-metilbencimidazol) > PBI_m-H (2-(2-piridil)-n-metilbencimidazol). Recientemente se han sintetizado y determinado las propiedades espectroscópicas, electroquímicas y ECL de complejos binucleares del tipo [Ru(BTB)Ru]²⁺ (BTB = bis-1,4-(tetrazol-5-il)-benceno) y [Ru(4-TNB)Ru]³⁺ (4-TNB = 4-(1,4-tetrazol-5-il)-benzonitrilo) comprobándose que su eficiencia ECL es de alrededor del 150% comparada con el mucho más habitual Ru(bpy)₃²⁺. Por ello, estos compuestos son prometedores en el campo del desarrollo de nuevos soportes ECL. Otros complejos estudiados recientemente incluyen los complejos binucleares simétricos con ligandos puente arildiamida, como el Ru(bpy)₃²⁺(-CO-NH-Ar-NH-CO-)Ru(bpy)₃²⁺ donde Ar puede ser p-xileno, 4,4' dimetilfenil o 2,6-dimetilnaftaleno. En este tipo de complejos se verifica una débil interacción entre los centros Ru²⁺ y una gran intensidad de emisión ECL debida a la polaridad y conjugación de la molécula. Por ello, son muy útiles para la construcción de soportes ECL y para el análisis biomolecular.

En el campo de las reacciones ECLs en presencia de receptores supramoleculares y en medio acuoso, que son el objeto de la presente Memoria, se ha estudiado por ejemplo la interacción de los complejos Ru(phen)₃²⁺ (phen = fenantrolina) y Os(bpy)₃²⁺ [22], [23] con ADN de timo de ternera en disoluciones acuosas utilizando ión oxalato como coreactivo. Los resultados alcanzados permitieron la determinación de la constante de interacción de los complejos de Ru²⁺ y Os³⁺ con ADN, así como su interpretación en función de la intercalación o no del ligando en el ADN. Otro estudio de naturaleza similar analizó la capacidad sensibilizadora de complejos de Ru²⁺ modificados con polipéptidos para su uso como marcadores moleculares [16].

Por su parte, los dendrímeros PAMAM junto con complejos polipiridilo de Ru²⁺ o *quantum dots* son la base de varios sensores y biosensores ECL selectivos. Otros dendrímeros periféricamente funcionalizados han sido empleados junto con complejos de polipiridil Ru(II) y con *quantum dots* en estudios de identificación de células cancerígenas [24], [25]. En general, el estudio de las reacciones ECL en presencia de dendrímeros PAMAM resulta de interés en el campo de la construcción de sensores, biosensores y *quantum dots* [18], [26]–[31]. Mediante

modificaciones de estos dendrímeros se han llegado a conseguir eficiencias ECL hasta cinco veces mayor que con el complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ de partida, posibilitando el empleo de estos receptores supra-moleculares, por ejemplo, como marcadores en Biodiagnósticos [32], [33]. Existen estudios donde se emplean en ECL moléculas de dendrímero funcionalizadas con grupos terminales de rutenio (II), dando como resultado un incremento notable en la eficiencia de las reacciones ECL: sin embargo, esta funcionalización causa la pérdida del efecto coreactivo del dendrímero, forzando al empleo de un coreactivo adicional. Estos estudios han sido llevado a cabo en todos los casos en presencia de tripropilamina [16], [17], [26]–[29], y en disolventes de naturaleza orgánica como acetonitrilo [16], [17], [27], [28] o una mezcla dimetilformamida/dimetilsulfóxido [28]. Igualmente existen estudios que emplean dendrímeros funcionalizados en combinación con nanotubos de carbono de pared simple, que han demostrado ser altamente sensibles y selectivas para la detección de inmunoglobulina G [18] y para la detección de iones mercurio [30] en oligonucleótidos específicos. Sin embargo, en todos los casos es necesario, de nuevo, introducir un coreactivo adicional.

Las nanopartículas de diferente naturaleza han jugado a su vez un papel importante en el diseño de sistemas ECL con vistas al desarrollo y perfeccionamiento de sensores [34]–[37], por ejemplo, funcionalizadas con complejos de Ru(II) en presencia de dendrímeros PAMAM [18]. Otro estudio reciente analiza las posibilidades de un aptasensor ECL empleando prolina, nanopartículas de platino y dendrímeros PAMAM como amplificadores de la señal ECL [31]; en la misma línea, nanopartículas de platino en combinación con dendrímeros y una matriz de óxido de iridio y estaño han sido empleadas para mejorar sensiblemente la detección de nicotina por ECL [38]. Una de las aplicaciones de mayor interés de estos sistemas es la construcción de sensores específicos empleando nanopartículas funcionalizadas como sondas para la detección de moléculas de interés biomédico, por ejemplo para realizar la detección y cuantificación de secuencias específicas de ADN [39], [40], e incluso de células cancerosas [41], [42].

No obstante, como se dijo anteriormente, la gran mayoría de los estudios ECL desarrollados en la actualidad emplean coreactivos estándar en medio orgánico, generalmente acetonitrilo; los estudios en medio acuoso, como los que se desarrollan en la presente Memoria (véase **secciones 3.1, 4.1.1, 4.2.1, 4.2.2**) son aún escasos.

Finalmente, la colorimetría ha demostrado su utilidad como técnica de caracterización y control de los complejos electroquimioluminiscentes, sobre todo aplicada al estudio del color de la emisión visible ligada a un proceso ECL y de la energía de las transiciones implicadas en los mecanismos del mismo. En este campo, se ha realizado la caracterización empleando parámetros de color CIELab (véase **sección 1.2**) de la emisión de distintos complejos de Ir cuando se emplean como sensibilizadores ECL, y la influencia en el mismo de los estados energéticos de dichos complejos [43]. Otros estudios han explorado la relación entre el color y los potenciales de oxidación de varios complejos para la predicción de los parámetros energéticos de la reacción ECL [12]. La influencia del coreactivo en el color de la emisión ECL ha sido también explorada, empleando reactivos de uso habitual (tripropilamina y N-N-diisopropiletilamina como coreactivos y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ ($\text{ppy} = 2\text{-fenilpiridinato-C2,N}$) como especies emisoras) y trabajando en distintos rangos de potencial aplicado [21].

1.1.1. Eficiencia ECL, ϕ_{ECL}

La eficiencia ECL es una magnitud que mide la eficacia de la reacción que genera el estado excitado emisivo de la especie sensibilizadora frente al conjunto del resto de reacciones que consumen las especies oxidada y reducida. Como se ha mencionado anteriormente, en este estudio se emplea como especie sensibilizadora el complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y como método el de ECL por coreactivo, de manera que se genera el ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$, que decae a su estado fundamental con emisión de luz. Esto posibilita que el curso de la reacción pueda ser seguido, además de a través de la variación de intensidad de corriente en las medidas voltamétricas, mediante la detección de la intensidad de luz emitida en el transcurso de la experiencia. Estas dos variables están intrínsecamente ligadas y son dependientes la una de la otra, ya que ambas son dependientes de la cantidad de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} / \text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ que reacciona en cada ciclo; sin embargo, solamente una parte de este rutenio generará el estado excitado que dará lugar a la emisión. De esta forma, la intensidad de corriente (en mA) generada en el electrodo será proporcional al total de Ru^{II} oxidado en cada ciclo, independientemente de si éste da la reacción quimioluminiscente o no; por otro lado, la intensidad de luz emitida dependerá directamente de la fracción de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ generado en el proceso, es decir, de la fracción de rutenio cuya oxidación transcurre por el camino de reacción principal.

El cociente entre estas dos magnitudes, intensidad de corriente e intensidad luminosa, da lugar a la eficiencia de emisión ECL, que mide la probabilidad de emisión por cada proceso de transferencia de carga [44]; es decir, fotón emitido por electrón transferido.

$$\phi_{ECL} = \frac{\int_0^t I dt}{\int_0^t i dt \left(\frac{N_A}{F} \right)} \quad (1.3.a)$$

Donde I es la intensidad en fotones por segundo, i es la intensidad de corriente en amperios por segundo que pasa por el seno de la disolución, y N_A y F son las constantes de Avogadro y de Faraday, respectivamente. Generalmente, para el cálculo de ϕ_{ECL} se emplea una reacción de referencia, medida con el mismo sistema que la reacción a estudiar, a fin de simplificar el proceso y eliminar la dependencia de factores propios del método de medida, como la distancia de la célula al detector, la geometría del electrodo de trabajo y las características del detector empleado. De esta forma, ϕ_{ECL} del sistema en cuestión puede relacionarse con la de la referencia según:

$$\phi_{ECL} = \phi_{ECL}^0 \frac{Q^0 I}{Q I^0} \quad (1.7)$$

Siendo Q y Q^0 las cargas totales en culombios para la reacción de interés y la de referencia, y análogamente I e I^0 la intensidad en fotones integrada para las dos reacciones; ϕ_{ECL}^0 es la eficiencia ECL de la reacción de referencia. ϕ_{ECL} puede a su vez relacionarse con el rendimiento cuántico de formación del estado excitado, ϕ_{ES} , que se define en base al tratamiento de Marcus de las reacciones quimioluminiscentes. Según este tratamiento, la reacción emisiva durante un proceso quimioluminiscente compite con la no emisiva, según:



donde k_{es} representa la constante de formación del producto excitado y k_{gs} la del producto en estado fundamental. De esta forma, el rendimiento cuántico de formación del estado excitado se define como:

$$\phi_{ES} = \frac{k_{es}}{k_{gs} + k_{es}} \quad (1.9)$$

y se puede relacionar ϕ_{ECL} con ϕ_{ES} de forma directa.

$$\phi_{ES} = \frac{\phi_{ECL}}{\phi_{EM}} \quad (1.10)$$

En la ecuación superior, ϕ_{EM} representa el rendimiento cuántico fotoluminiscente de la especie excitada generada mediante ECL. Dado que ϕ_{ES} es una relación entre constantes de velocidad homogéneas de un mecanismo ECL global (**ecuaciones 1.8.a a 1.9**), si ϕ_{ECL} permanece constante con independencia de la velocidad de barrido o la concentración del reactivo limitante, ϕ_{ES} tampoco variará. Por ello, ϕ_{ECL} constituye una medida de la constante de velocidad de la reacción que conduce a la formación del estado excitado con respecto a las constantes de todas las demás reacciones homogéneas que componen el mecanismo ECL.

1.2. Colorimetría: el espacio de color CIELab

1.2.1. Espacios de color absolutos y desarrollo del sistema CIELab

Se define como *espacio de color* todo aquel modelo matemático que permite identificar un color determinado, expresado el mismo en función de una serie de coordenadas matemáticas de forma unívoca y como un estímulo percibido por el ojo humano modelo en condiciones específicas. Existen dos tipos fundamentales de espacios de color:

- **Absolutos:** Basados en los modelos de percepción de la luz en la visión humana, contienen y codifican potencialmente todos los estímulos que pueden ser percibidos como colores por el ojo humano, y el valor asignado por los mismos a dichos colores es independiente de la vía que se emplee para generarlos. Los sistemas de color absolutos se referencian a un blanco (origen de coordenadas) obtenido bajo unas condiciones específicas de iluminación y empleando un detector estándar.
- **Relativos:** Son espacios acotados de un sistema de color absoluto, que permiten la definición de un subconjunto de colores, pero no del conjunto completo. Su utilidad es de tipo práctico: se emplean en la generación de una gama de colores a partir de tres o más colores primarios, tanto mediante luz (por ejemplo los sistemas RGB y derivados, empleados en monitores) como mediante pigmentos (sistemas CMYK, empleados en la imprenta). Los máximos de los ejes de un sistema de color de tipo relativo, que se corresponden con los colores primarios del sistema, se encuentran situados en tres o más puntos de un sistema de color absoluto, definiendo por tanto un espacio dentro del mismo. Los sistemas relativos se referencian a un sistema de color absoluto.

La definición de un color cualquiera depende de dos parámetros fundamentales. El primero es el observador: la percepción del color es subjetiva y difiere ligeramente de persona a persona, y en algunos casos extremos, como el daltonismo, puede llegar a ser radicalmente diferente. Si se amplía el rango de receptores a, por ejemplo, el detector de luz que emplea un colorímetro, la similitud entre ellos se vuelve mínima, siendo este por tanto un factor a controlar si se pretende conseguir una cuantificación matemática del color. El segundo, mucho más intuitivo, es la

influencia del iluminante, es decir, la luz que se emplea para iluminar el objeto: aunque instintivamente se tiende a pensar en la iluminación ambiental como luz blanca, y en ésta como mezcla perfecta de todas las longitudes de onda visibles, ninguna de las dos suposiciones tiene por qué ser cierta en un momento dado. Si se observa, por ejemplo, una hoja de papel blanca bajo una luz azul, la hoja se verá azul; pero esta propiedad pertenece a la luz, y no al color del objeto, que es blanco. Sin llegar a tales extremos, la luz blanca ambiental dista mucho de ser una mezcla perfecta de longitudes de onda: su color real, más o menos blanco, depende de muchos factores, como, para el caso de una luz artificial, el sistema que la genera (filamento, halógeno...), o la hora del día y las condiciones ambientales para la luz natural. Resulta por tanto obvio que tanto el *observador* como el *iluminante* son factores claves a la hora de definir un sistema de color absoluto: será absoluto en cuanto a que definirá numéricamente la apariencia que tendrá un cierto color *para un detector determinado, bajo una luz estándar*.

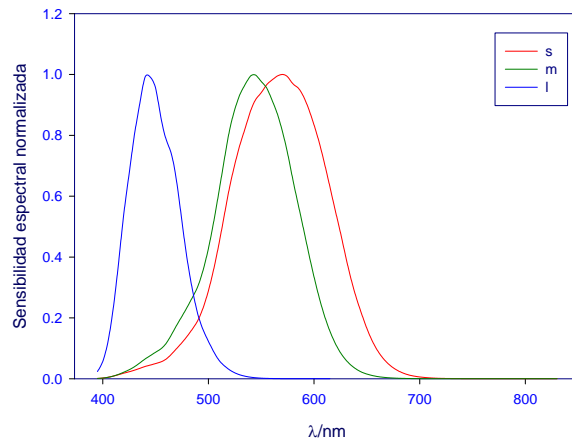


Figura 1.1 Longitudes de onda registradas por cada uno de los tres conos L, M y S (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de <http://www.cvrl.org>, recurso web consultado en Septiembre 2015)

El desarrollo de los sistemas de color absolutos comienza oficialmente en la década de 1930 [45]. Sus inicios se encuentran íntimamente ligados al desarrollo de las teorías de la visión humana del color y a la identificación de las longitudes de onda registradas por cada uno de los tres tipos de cono, que se identifican en función de la longitud de onda a la que presentan máxima sensibilidad: L (*long*; larga), M

(*medium*, mediana) y S (*short*, corta). La sensibilidad espectral normalizada de estos tres conos a la luz de diferentes longitudes de onda da lugar a tres funciones l , m , s (**Figura 1.1**). Este sistema es un sistema de tipo *triestímulo*: es posible definir cualquier color registrado por el ojo humano en función de una combinación lineal de los tres parámetros L, M, S. El sistema CIE LMS constituye por lo tanto uno de los primeros sistemas absolutos de color. Sin embargo, su aplicación práctica se ve limitada por el hecho de que los tres ejes L, M y S no son independientes entre sí; es físicamente imposible estimular de forma aislada el cono S, M o L, por lo que los tres ejes del sistema de coordenadas son imaginarios [46].

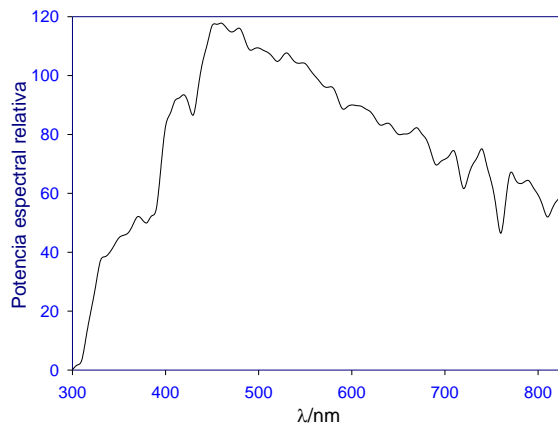


Figura 1.2 Distribución de potencia espectral del Iluminante D65 (estándares oficiales de la CIE, obtenidos de <http://www.cie.co.at>, recurso web consultado en Mayo 2016)

Con la publicación en 1931 de los primeros estándares colorimétricos de la CIE (*Commission Internationale de l'éclairage*; comisión internacional de la iluminación) se introducen por primera vez de forma explícita los conceptos de *observador* y de *iluminante*. El observador se define en base a tres funciones x , y , z que emulan el comportamiento del ojo humano ante estímulos luminosos recibidos en la zona abarcada por un ángulo de 2° alrededor de la *fóvea*, que es la zona donde se localizan los conos responsables de la visión del color. Estudios posteriores modificarían el ángulo a 10° , dando lugar a otro conjunto de observadores independiente; ambos observadores, el CIE 1931 2° Standard Observer y el CIE 1964 10° Standard Observer se emplean hoy en día, siendo el primero el más extendido. El

iluminante es una cuarta función, en este caso representativa del poder espectral (expresado como potencia por unidad de área frente a longitud de onda) de una luz determinada. Existen varios iluminantes CIE estándar, siendo uno de los más conocidos el *Iluminante D65*, descrito como una aproximación a la composición de la luz diurna y establecido como estándar para los cálculos colorimétricos (**Figura 1.2**).[47]

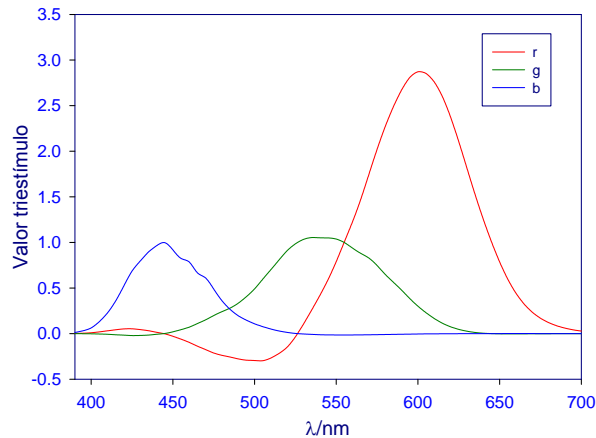


Figura 1.3 Funciones CIE rgb de 1931 (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de <http://www.cvrl.org>, recurso web consultado en Septiembre 2015)

Los estudios de la CIE de 1931 se basan sobre el trabajo principalmente de dos investigadores, Wright y Guild, quienes en años anteriores (el primero en 1928 [48], el segundo en el mismo 1931 [49]) realizaron estudios empleando luces de características estandarizadas, e intensidad regulable y medible, de color rojo, verde y azul. Estas luces se combinaban buscando igualar el color de ciertas muestras a ojos de diferentes observadores humanos; de esta forma, era posible descomponer un color dado en sus componentes roja, verde y azul. Este proceso buscaba establecer un primitivo sistema RGB absoluto (denominado CIE RGB) donde los tres ejes de referencia fueran reales, a diferencia del sistema LMS. Sin embargo, se comprobó en el curso de estos experimentos que ciertos colores no podían ser reproducidos de forma exacta mediante la mezcla de las tres luces, requiriendo la adición de un tono rojo adicional sobre la muestra (no sobre la

combinación de luces) antes de poderse obtener una concordancia. Estos estudios dieron lugar a un conjunto de funciones r, g, b (**Figura 1.3**) donde ciertas longitudes de onda contenían una componente R negativa. La existencia de estos colores es la razón de que los sistemas RGB actuales, de amplio uso en pantallas y monitores, no sean sistemas de color absolutos, sino relativos, ya que no existe forma física de generar una intensidad de luz negativa. Esta componente R negativa daría lugar a problemas tanto de tipo intuitivo y práctico (el concepto de “cantidad negativa de un color” es complejo, como también lo es eliminar un color que no está en una muestra) como matemático; los aún muy primitivos sistemas computacionales de la época tenían ciertas dificultades a la hora de realizar cálculos empleando funciones negativas [50]. Sin embargo, los cimientos físicos de la teoría del color ya habían sido asentados; el trabajo posterior se centraría en corregir los problemas matemáticos derivados del sistema.

Los mismos estándares CIE de 1931 contenían ya una respuesta a este problema de valores negativos, en forma de transformación matemática directa de las funciones r, g, b . Las funciones resultantes, x, y, z , (véase **ecuaciones 1.11.a a 1.11.c**) [46] no poseen valores negativos y presentan además la propiedad de que el área bajo las tres funciones es exactamente la misma (**Figura 1.4**). Estas funciones son las anteriormente citadas *funciones del observador* (CIE 1931 2^o Standard Colorimetric Observer). Es interesante comprobar que, matemáticamente, la función z es prácticamente equivalente a b , mientras que x e y son combinaciones lineales de r y g . Otra propiedad del conjunto de ecuaciones, menos obvia en este caso, es que y se describe de forma que coincida exactamente con otra función independiente, $V(\lambda)$ denominada de *eficiencia luminosa espectral* y que mide la capacidad de la luz de distintas longitudes de onda para excitar los receptores del ojo humano. Debido a esta concordancia, el valor Y describe en la práctica el brillo de un color, mientras que la combinación de X y Z describe su tonalidad concreta [46]. Éste es el sistema CIE XYZ.

$$\bar{x}(\lambda) = 0.49\bar{r}(\lambda) + 0.31\bar{g}(\lambda) + 0.20\bar{b}(\lambda) \quad (1.11.a)$$

$$\bar{y}(\lambda) = 0.17697\bar{r}(\lambda) + 0.81240\bar{g}(\lambda) + 0.01063\bar{b}(\lambda) \quad (1.11.b)$$

$$\bar{z}(\lambda) = 0.00\bar{r}(\lambda) + 0.01\bar{g}(\lambda) + 0.99\bar{b}(\lambda) \quad (1.11.c)$$

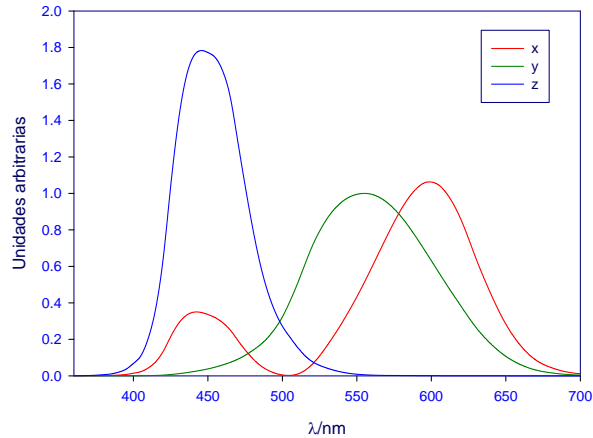


Figura 1.4 Funciones del observador *xyz* (datos publicados por Colour and Vision Research Laboratory, Institute of Ophthalmology, University College London, obtenidos a través de <http://www.cvrl.org>, recurso web consultado en Septiembre 2015)

El espacio CIE XYZ es tridimensional y, por tanto, su representación resulta complicada. Sin embargo, es posible llevar a cabo una transformación simple mediante la definición de tres parámetros x , y , z (Ecuaciones 1.12.a a 1.12.c; no confundir con las funciones del observador, que suelen denotarse con una barra horizontal superior) a partir de las coordenadas XYZ.

$$x = X/(X + Y + Z) \quad (1.12.a)$$

$$y = Y/(X + Y + Z) \quad (1.12.b)$$

$$z = Z/(X + Y + Z) \quad (1.12.c)$$

Según este sistema, resulta obvio que existe una relación matemática entre ambas coordenadas de forma que $z = 1 - x - y$. De esta forma, y fijando el brillo Y , la representación del espacio de coordenadas derivado puede realizarse en dos dimensiones, ya que la tercera depende de las otras dos. Esta derivación da lugar a los diagramas xy (Figura 1.5) [50].

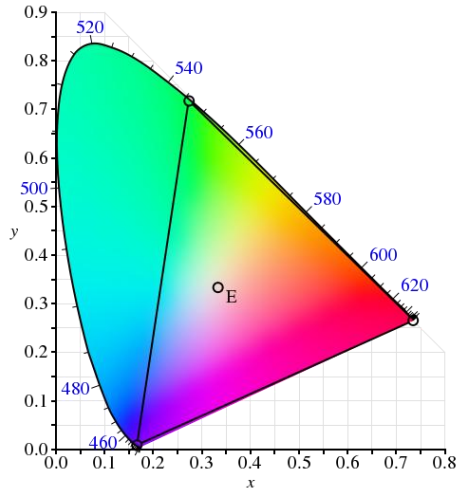


Figura 1.5 Diagrama x, y mostrando el punto blanco del sistema (E) y las coordenadas de los tres colores primarios R, G, B del sistema CIE RGB (imagen obtenida del repositorio Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CIE1931xy_CIERGB.svg bajo licencia de Dominio Público)

Otra propiedad interesante del sistema CIE XYZ es la posibilidad de obtener las coordenadas de un color específico empleando mediciones experimentales de potencia espectral P [46]:

$$X = K(P_1\bar{x}_1 + P_2\bar{x}_2 + P_3\bar{x}_3 + \dots P_n\bar{x}_n) \quad (1.13.a)$$

$$Y = K(P_1\bar{y}_1 + P_2\bar{y}_2 + P_3\bar{y}_3 + \dots P_n\bar{y}_n) \quad (1.13.b)$$

$$Z = K(P_1\bar{z}_1 + P_2\bar{z}_2 + P_3\bar{z}_3 + \dots P_n\bar{z}_n) \quad (1.13.c)$$

donde K es una constante; P es la potencia por cada intervalo pequeño y constante de longitudes de onda (usualmente 5 nm) y x, y, z es el valor de cada una de las tres funciones a la longitud de onda del centro del intervalo. De esta forma, es posible emplear parámetros experimentales, por ejemplo, de transmitancia (previa transformación matemática) para la determinación del color exacto de una muestra; este es el principio de funcionamiento de un colorímetro. Sin embargo, el sistema XYZ vuelve de nuevo a hacer uso de ejes de coordenadas imaginarios, siendo ésta una de sus principales limitaciones.

La CIE recomienda el siguiente protocolo para la obtención de parámetros colorimétricos a partir de medidas de transmitancia [51]:

$$X = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{X}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad (1.14.a)$$

$$Y = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad (1.14.b)$$

$$Z = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Z}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad (1.14.c)$$

$$K = 100 / \sum_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad (1.14.d)$$

donde x_{10} , y_{10} , z_{10} son las funciones del observador; S es una función derivada del iluminante; T es la transmitancia de la muestra y Δ la longitud del intervalo de medida.

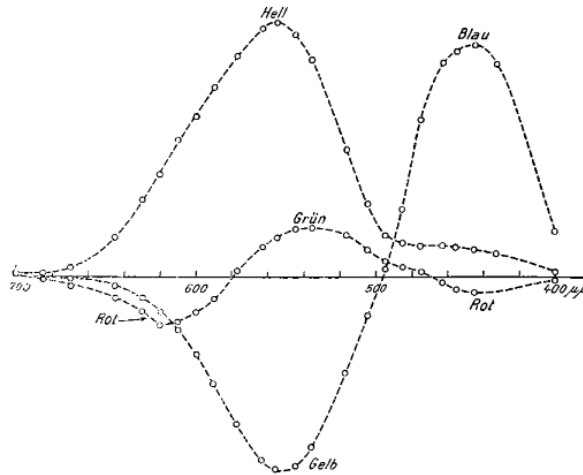


Figura 1.6 Funciones de colores opuestos propuestas por Schrödinger (1925). Rot/Grün es el par rojo/verde, mientras que Blau/Gelb es el par azul/amarillo. Hell es el canal de brillo [52]. Reproducido de Erwin Schrödinger, (1925): Über das Verhältnis der Vierfarben- zur Dreifarbentheorie - Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse 134_2a: 471-490, de libre acceso a través de la plataforma Zobodat (<http://www.zobodat.at>)

Paralelamente a los estudios de la CIE, varios investigadores de los campos de la física y de la psicología, entre los que se encontraban los físicos E. Q. Adams (1923) y E. Schrödinger (1925; **Figura 1.6**) desarrollarían, trabajando de forma independiente, la *teoría de los colores opuestos*, desarrollando una idea mucho anterior de Karl Hering (década de 1870) [52]. En líneas generales, dicha teoría defiende la existencia de dos parejas de colores primarios que proceden de estímulos inversos de la retina y por tanto no pueden ser percibidos de forma conjunta por el cerebro: el rojo y el verde, y el azul y el amarillo. Estos colores son denominados *opuestos*. La existencia de los canales rojo-verde y amarillo-azul se complementa con un tercer canal, acromático, que es el responsable de la percepción del brillo.

En 1975 la CIE adoptaría de forma oficial un espacio de color derivado de esta teoría y desarrollado por MacAdam, que se denominaría el espacio de color CIEL*a*b* o CIELab (los asteriscos en la notación se adoptan a fin de distinguir este espacio de color de otro anterior, basado en el mismo principio y desarrollado por Hunter en la década de 1950, que también emplea ejes L, a, b; sin embargo, en la práctica pueden ser omitidos) [53]. En este espacio de color, el eje L, graduado de +100 a -100, controla el brillo de la muestra; el eje a* mide la intensidad de color rojo (valores positivos) frente a verde (valores negativos) y el eje b* la del amarillo (positivo) frente al azul (negativo) (véase **Figura 1.7**). Se trata por tanto de un espacio de color *de valores cromáticos*, a diferencia del CIE XYZ que, como se dijo antes, es un sistema *triestímulo*. La conversión desde este último es directa (**ecuaciones 1.15 a 1.16**) [46].

$$L^* = 116f(Y/Y_n) - 16 \quad (1.15.a)$$

$$a^* = 500[f(X/X_n) - f(Y/Y_n)] \quad (1.15.b)$$

$$b^* = 200[f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n)] \quad (1.15.c)$$

Donde:

$$\begin{aligned} f(X/X_n) &= (X/X_n)^{1/3} && \text{para } X/X_n > (6/29)^3 && (1.16.a) \\ f(X/X_n) &= (841/108)(X/X_n) + 4/29 && \text{para } X/X_n < (6/29)^3 \end{aligned}$$

$$f(Y/Y_n) = (Y/Y_n)^{1/3} \quad \text{para } Y/Y_n > (6/29)^3 \quad (1.16.b)$$

$$f(Y/Y_n) = (841/108)(Y/Y_n) + 4/29 \quad \text{para } Y/Y_n < (6/29)^3$$

$$f(Z/Z_n) = (Z/Z_n)^{1/3} \quad \text{para } Z/Z_n > (6/29)^3 \quad (1.16.c)$$

$$f(Z/Z_n) = (841/108)(Z/Z_n) + 4/29 \quad \text{para } Z/Z_n < (6/29)^3$$

Los parámetros X_n , Y_n , Z_n son los valores correspondientes al *punto blanco* del sistema bajo las condiciones del iluminante empleado; para el caso de un iluminante D65, estos parámetros son:

$$X_n = 94.825; Y_n = 100; Z_n = 107.381$$

De esta forma, queda establecido un sistema de referencia absoluto donde los ejes coordenados, a diferencia del CIE XYZ, tienen una equivalencia física con el color y no son simplemente coordenadas imaginarias. Este hecho, junto a su conversión directa desde el también muy extendido CIE XYZ, que como se mencionó anteriormente presenta la propiedad de poderse cuantificar a partir de medidas físicas, ha contribuido notablemente a la expansión de su uso para casos prácticos.

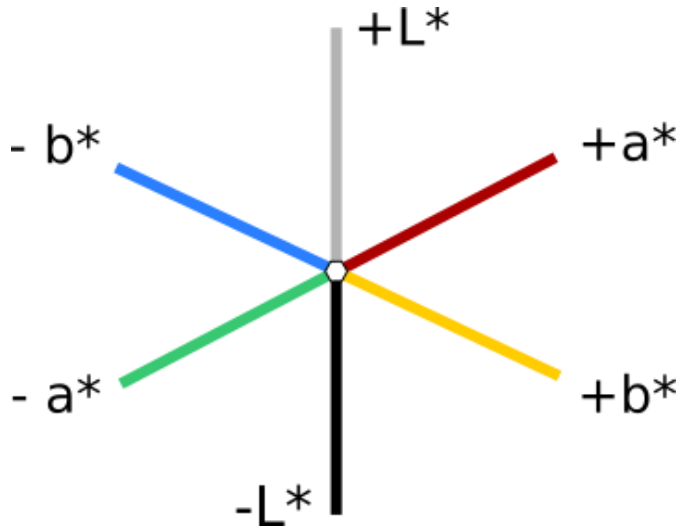


Figura 1.7 Representación esquemática del sistema de ejes coordenados CIEL*a*b*

1.2.2. El color en las nanopartículas: definición y propiedades ópticas

La IUPAC en sus recomendaciones de 2012 contiene la siguiente definición y anotaciones para el uso correcto del término *nanopartícula* [54]:

Partícula de cualquier forma con dimensiones entre 1×10^{-9} m y 1×10^{-7} m

Nota 1: Modificado de anteriores definiciones de nanopartícula y nanogel.

Nota 2: La base del límite superior de 100 nm se debe a que las propiedades novedades que diferencian a las nanopartículas del material en bruto se desarrollan normalmente para un diámetro crítico de 100 nm o inferior.

Nota 3: Debido a la existencia de otros fenómenos (transparencia o turbidez, ultrafiltración, dispersión estable, etc...) que pueden extender este límite superior, el uso del prefijo "nano" se acepta para dimensiones menores a 500 nm, siempre que se incluya una referencia a su definición.

Nota 4: Tubos y fibras con únicamente dos dimensiones menores a 100 nm se consideran nanopartículas.

De la definición, por tanto, se deduce que el único requisito necesario para que una partícula se considere *nanopartícula* es su tamaño: tanto su material como su forma pueden variar. Existen nanopartículas de los más variados materiales: por ejemplo, óxidos no metálicos como la sílice [55], cuyo carácter aniónico permite la formación de coloides estables sin necesidad de adición de un agente estabilizante externo; polímeros de las más variadas características, ya sean artificiales como el alquilcianoacrilato [56] o naturales y biodegradables como los polisacáridos [57], los ácidos láctico y glicólico [58] o el quitosano [59]; óxidos de distintos metales, como el hierro, el zinc o el estaño, algunos de los cuales dan lugar a nanopartículas paramagnéticas [60]–[62]; sulfuros y seleniuros, empleados en la fabricación de *quantum dots* (semiconductores de tamaño nanométrico, de composición habitualmente compleja, fuertemente emisores de luz entre otras propiedades) [63]; y, por supuesto, metales como el cobre [64], la plata [65] o el oro [66], ya sean puros o formando aleaciones [67].

Entre todos los posibles materiales, las nanopartículas de metales nobles, plata y oro, han recibido tradicionalmente una atención especial; en parte debido a su síntesis relativamente simple, que llevó a que fueran de los primeros coloides

sintetizados en laboratorio (la primera síntesis de nanopartículas de oro fue descrita por Faraday en 1857)[68], y en parte debido a sus excelentes propiedades ópticas. Entre ellas, la más obvia era su brillante color, rojo en el caso del oro y amarillo para la plata, que cambiaba a azul y rojo, respectivamente, en presencia de agentes aglomerantes, permitiendo saber a simple vista si un coloide determinado estaba formado por nanopartículas independientes o por nanoestructuras *agregadas* de varias partículas. Estas propiedades colorimétricas se deben a la presencia de una o varias bandas de absorbancia en la zona visible del espectro, debida a la oscilación de los electrones libres del metal en resonancia con la luz de determinadas longitudes de onda. Dichas bandas se denominan *Surface Plasmon Resonance Bands* (bandas de resonancia del plasmon superficial) y su número y posición en el espectro dependen fundamentalmente de cuatro factores: la naturaleza del metal, la simetría de la partícula, su tamaño y su entorno. Para nanopartículas presentando simetría esférica, solamente existe un modo de resonancia del plasmón superficial, que da lugar a una única banda de absorbancia; para el oro sin agentes funcionalizantes añadidos, esta banda se sitúa habitualmente entre 500 y 530 nm. Para nanopartículas anisotrópicas, como los nanorods, existen modos de resonancia adicionales, que dan lugar a bandas añadidas; en el caso de los nanorods de oro, aparece además una banda ancha sobre 600 nm que causa que su color sea azul intenso [69], [70]. Además de las habituales nanopartículas esféricas o alargadas, es posible obtener un amplio abanico de formas más complejas: entre ellas las *nanoshells*, que son capas metálicas depositadas sobre núcleos no metálicos, por ejemplo oro sobre sílice o látex [71], [72]; los *nanocubes*, que presentan forma cúbica [73]; o las *nanostars*, con una llamativa estructura de estrella [74].

Otro factor determinante en las características de una suspensión coloidal de nanopartículas es la presencia del agente protector (*capping ligand*) que impide la aglomeración del coloide, manteniendo la suspensión estable y permitiendo su manejo y almacenamiento durante ciertos periodos de tiempo. El agente protector se une a la superficie de la partícula (ya sea por interacción específica, por adsorción o por cualquier otro mecanismo) e impide el acercamiento de otras partículas. Generalmente, este efecto se da o bien por repulsión electrostática, como en el caso de las nanopartículas protegidas por citrato, o por impedimento estérico, como por ejemplo en las nanopartículas protegidas por dendrímeros PAMAM [75] o por tiopronina [76]. Diversos agentes protectores y su influencia sobre la estabilidad y las características de los coloides resultantes se han estudiado en

profundidad durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, y pueden consultarse en la **sección 3.3** de esta Memoria.

El cambio de color ligado a la agregación de los coloides de oro permite el estudio de la interacción de las suspensiones coloidales con ligandos que induzcan dicha agregación, bien por desplazamiento del agente protector o por formación de enlaces (por ejemplo, puentes de hidrógeno) entre varios ligandos adsorbidos causando la aproximación de las partículas y el acoplamiento de sus plasmones superficiales. Mediante la conversión entre la transmitancia de las suspensiones coloidales en todo el rango visible de longitudes de onda y los parámetros colorimétricos XYZ (véase **ecuaciones 1.14.a a 1.14.c**), y la posterior conversión de estos parámetros al sistema CIELab (**ecuaciones 1.15.a a 1.16.c**), es posible seguir la evolución de este cambio de color de forma matemática. El seguimiento de estos cambios en función de la concentración de ligando en el medio permite medir en última instancia la afinidad de un ligando determinado por las nanopartículas de oro; este estudio se ha desarrollado en la **sección 3.2** para diversos ligandos de naturaleza biológica y bioquímica, y en la **sección 4.1.2** para el caso concreto de la interacción AuNPs/Dendrímero PAMAM, de la que se ha llevado a cabo su caracterización completa.

2. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo global el estudio de una serie de interacciones ligando-receptor donde los ligandos son sustancias de interés biomédico, como el 5-Fluorouracil, y biológico, como la lisozima (una proteína modelo) o la adenosina (un nucleótido componente del ADN). Se han elegido para ello dos receptores modelo: los dendrímeros PAMAM y las nanopartículas de oro y plata, cuya probada eficacia como portadores de medicamentos y baja toxicidad los colocan en un lugar privilegiado en el campo de las aplicaciones médicas.

Para la consecución de este objetivo global, y como se detalla en la Introducción, se emplean las reacciones electroquimioluminiscentes (ECL) de alta energía, haciendo uso de las excelentes propiedades de los dendrímeros PAMAM para actuar como coreactivos en este tipo de reacciones. Se emplean además como apoyo técnicas tradicionales como la espectroscopía de absorbancia y la de fluorescencia, y para el estudio de las interacciones AuNPs-ligando se busca además explorar sus excepcionales características ópticas para el desarrollo de un sistema colorimétrico de seguimiento y cuantificación de interacciones no descritas hasta la fecha.

Por lo arriba expuesto, esta Tesis se divide en los siguientes Objetivos:

1. *Estudio de la interacción dendrímeros PAMAM (poliamidoamina)-sensibilizador: Se parte de un estudio anterior sobre la interacción L/R utilizando $Ru(bpy)_3^{2+}$ como ligando y dendrímeros aniónicos PAMAM de las generaciones (G) 1.5 y 4.5 como receptor en medio acuoso. Los resultados han puesto de relieve que los dendrímeros G1.5 y G4.5 actúan como coreactivos. Conjuntamente a este efecto las interacciones superficiales e intra-dendrímicas de carácter fundamentalmente*

electrostático son operativas.

Se pretende ahora ampliar el estudio anterior utilizando dendrímeros catiónicos de la serie PAMAM utilizando también $Ru(bpy)_3^{3+}$ como ligando. Esto es, dendrímeros G 1.0 - G5.0 a pHs 6.1 y 10, que garanticen la protonación o no de la superficie de los dendrímeros. Asimismo, se estudiará la interacción PAMAM GX.0 con 5-Fluorouracil, especie de interés por sus aplicaciones en el campo de la Biomedicina.

- 2. Estudio de la interacción NPs/R y determinación de constantes de equilibrio y energías de enlace a partir de medidas de absorbancia de la banda plasmon y de quenching de fluorescencia de los receptores supramoleculares que la presenten. Se buscará cuantificar la interacción de las nanopartículas con sustancias de interés biológico y biomédico como la lisozima. Además, se pretende poner a punto un procedimiento colorimétrico basado en la medición del color de las NPs para la determinación de energías de enlace.*
- 3. Estudio de la interacción L/R utilizando $Ru(bpy)_3^{3+}$ como ligando y AuNPs como receptor a diferentes fuerzas iónicas y pHs. Este estudio empleando reacciones ECLs será de importancia relevante pues permitirá poner en evidencia las características catalíticas de las AuNPs en función de la fuerza iónica, pHs que pueden condicionar o no la agregación de las NPs.*
- 4. Estudio de la interacción L/R utilizando $Ru(bpy)_3^{3+}$ como ligando y AgNPs como receptor a diferentes fuerzas iónicas y pHs. Se pretende poner en evidencia las principales diferencias ECLs de las NPs de Au y Ag.*

De los objetivos citados, el primero y el segundo han dado lugar a tres artículos (*Electrogenerated chemiluminescence reactions between the $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium*; *CIELab evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles* y *Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence*) publicados en revistas de primer cuartil que constituyen esta Tesis por Compendio de Publicaciones. Estas publicaciones se complementan con otros dos artículos (*Electrochemiluminescent (ECL) $Ru(bpy)_3^{2+}$ / PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation y Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIELab and deconvolution study*), actualmente en proceso de publicación, que amplían ambos objetivos y cuyo contenido se encuentra recogido en la **sección 4** (Trabajo Complementario). Los objetivos tercero

y cuarto han dado lugar a una serie de resultados experimentales de interés que se encuentran pendientes de ser recogidos en publicaciones, y que pueden asimismo ser consultados en la sección antes citada.

3. ARTÍCULOS PUBLICADOS

A continuación se enumeran los artículos que integran esta Tesis Doctoral. Se incluye un encabezamiento conteniendo los datos correspondientes a autoría, revista, editorial y fecha de publicación e índice de impacto de cada uno de los artículos; los documentos que corroboran la información aportada, junto con las declaraciones de co-autoría, justificación detallada de la aportación de cada autor y cualquier otra información requerida se pueden consultar en los **Anexos A y B**. Se incluye además, a efectos de evaluación, un resumen conteniendo un breve fundamento teórico de cada uno de los artículos presentados, metodología propuesta, discusión de resultados y conclusiones. Finalmente, una copia completa de los artículos originales puede ser consultada al final de la sección.

Se presentan como Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones los siguientes artículos:

- *Jimenez-Ruiz, A., Grueso, E., Perez Tejada, P.**. **Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium**. *J. Inorg. Biochem.*, 151 (2015) 18-25. DOI 10.1016/j.jinorgbio.2015.06.021
- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles**. *RSC Adv.*, 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H
- *Jimenez-Ruiz, A.*, *Perez-Tejada, P.*, *Grueso, E.*, *Castillo, P. M.**, *Prado-Gotor, R.**. **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence**. *Chem. Eur. J.*, 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117

La inclusión de los trabajos anteriormente citados se realiza en base a su relación directa con los objetivos 1 y 2 del Plan de Investigación de la presente Tesis Doctoral:

1. Estudio de la interacción dendrímeros PAMAM(poli-amidoamina)-sensibilizador: Se parte de un estudio anterior sobre la interacción L/R utilizando $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ como ligando y dendrímeros aniónicos PAMAM de las generaciones (G) 1.5 y 4.5 como receptor en medio acuoso. Los resultados han puesto de relieve que los dendrímeros G1.5 y G4.5 actúan como coreactivos. Conjuntamente a este efecto las interacciones superficiales e intra-dendrímicas de carácter fundamentalmente electrostático son operativas.

Se pretende ahora ampliar el estudio anterior utilizando dendrímeros catiónicos de la serie PAMAM utilizando también $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ como ligando. Esto es, dendrímeros G1.0 - G5.0 a pHs 6.1 y 10, que garanticen la protonación o no de la superficie de los dendrímeros. Asimismo, se estudiará la interacción PAMAM GX.0 con 5-Fluorouracil, especie de interés por sus aplicaciones en el campo de la Biomedicina.

2. Estudio de la interacción NPs/R y determinación de constantes de equilibrio y energías de enlace a partir de medidas de absorbancia de la banda plasmon y de quenching de fluorescencia de los receptores supramoleculares que la presenten. Se buscará cuantificar la interacción de las nanopartículas con sustancias de interés biológico y biomédico como la lisozima. Además, se pretende poner a punto un procedimiento colorimétrico basado en la medición del color de las NPs para la determinación de energías de enlace.

Específicamente, el primero de los artículos publicados (*Electrogenerated chemiluminescence reactions between the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium*) es resultado de la línea de investigación iniciada con el Objetivo 1, mientras que el segundo artículo (*CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles*) se obtuvo durante el desarrollo del Objetivo 2. El tercer artículo (*Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence*), es una revisión bibliográfica realizada a partir de la investigación en comportamiento y síntesis de

nanosistemas que se ha llevado a cabo durante el desarrollo de los Objetivos 2, 3 y 4.

El desarrollo breve de los artículos presentados como parte de esta Tesis se estructura en las siguientes partes:

- Ficha bibliográfica del artículo
- Resumen
- Introducción
- Procedimiento Experimental
- Resultados y Discusión
- Conclusiones

Es excepción a la estructura anterior el artículo tercero, por tratarse de un artículo de revisión sin parte experimental. En este caso, la estructura del desarrollo breve se ciñe a la de cada uno de los sub-apartados del artículo publicado.

3.1. Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium

Autores: A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, P. Perez-Tejeda*

Revista: Journal of Inorganic Biochemistry

Fecha de publicación: 2015

Volumen: 151

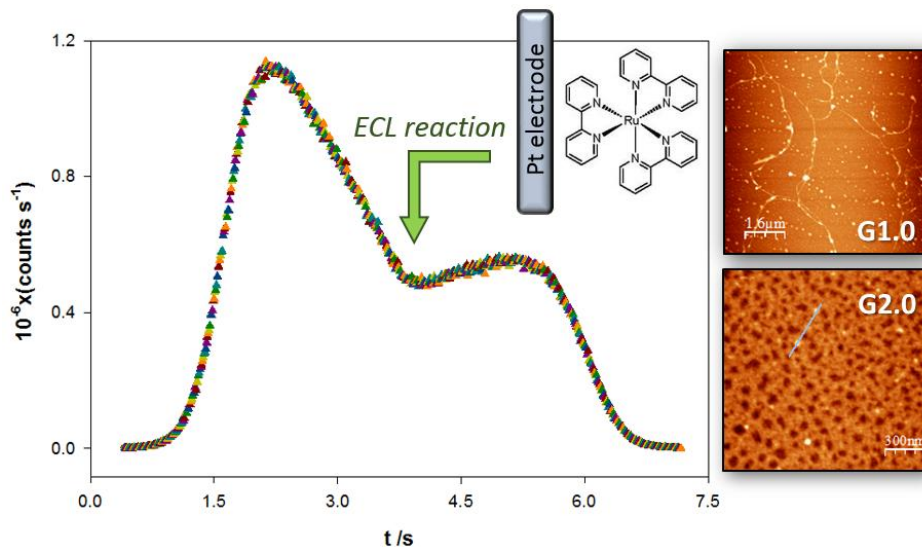
Páginas: 18-25

IF (JCR - 2014): 3.44

Cuartil (JCR - 2014): Primero

IF (SCIMago - 2014): 0.849

Cuartil (SCIMago - 2014): Primero



3.1.1. Resumen

El presente trabajo aborda el estudio de reacciones de alta energía electroquimioluminiscentes, ECLs, entre el rutenio (II) tris(2,2'-bipiridilo) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) y los dendrímeros PAMAM de generación completa G1.0 y G2.0 a pH 10. Se observa que en presencia de los dendrímeros existe ECL sin necesidad de

añadir ningún coreactivo clásico adicional. Se realizaron también medidas de microscopía de fuerza atómica (AFM) que demostraron la existencia de agregados verticales de tipo globular y también la formación de redes de fibras en el plano. La comparación de los datos de ECL y AFM sugiere que el efecto coreactivo de los dendrímeros, que se atribuye fundamentalmente a sus grupos amino terminales, se ve mejorado por la formación de los agregados verticales, y en general es posible explicar los efectos de ECL observados en todo el intervalo de concentraciones de dendrímero en función de la formación de estructuras autoagregadas tridimensionales, tanto de tipo z (vertical) como xy (horizontal) que se forman a distintas concentraciones de dendrímero. De esta forma, la variación de ECL puede emplearse como una medida del grado de agregación de los dendrímeros. Se determinó también la variación del potencial redox del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ en presencia de ambos dendrímeros a pH 10.

3.1.2. Introducción

Los dendrímeros son una clase relativamente reciente de polímeros orgánicos de tipo artificial, cuya estructura presenta un alto número de grupos funcionales y cavidades aptas para el estudio de su interacción con ligandos de diferente naturaleza [77]–[81] (**Figura 3.1**). El interés en su estudio ha venido en aumento en los últimos 20 años, debido a que las estructuras dendriméricas pueden emplearse como modelo para el estudio de diversas interacciones biológicas [82]. Esto se debe a las propiedades específicas que presenta cada uno de los tres entornos diferenciados de una molécula de dendrímero (núcleo, corteza y grupos externos). Las estructuras de tipo dendriméricas han sido empleadas para replicar con éxito las características físicas de los microentornos de la superficie de ciertas enzimas, habiéndose comprobado que la estructura ramificada resulta crucial a la hora de emular de forma controlada y modular una interacción de tipo enzimático ligando-receptor [83]. En otros campos, existen estudios que abordan la transferencia de energía controlada entre ramas dendríticas, y el autoensamblado de macroestructuras a partir de subunidades de dendrímeros[84]–[86].

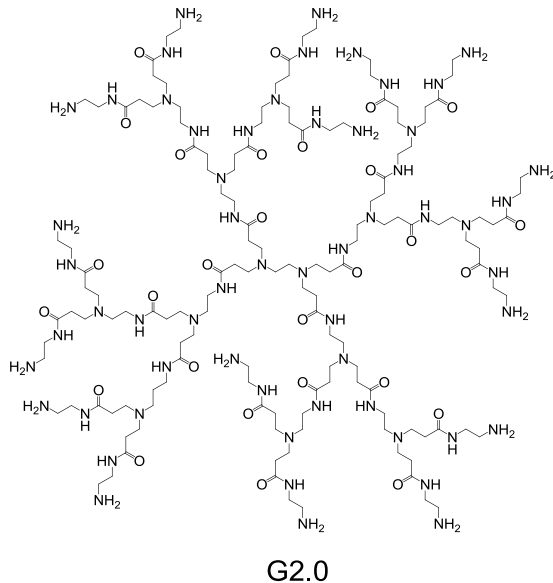


Figura 3.1: Estructura del dendrímero PAMAM G2.0

Un campo en el que los dendrímeros han demostrado ser de especial interés es el de la medicina, dado que su estructura los convierte en excelentes portadores de medicamentos, entre ellos de varios tratamientos anticancerígenos, y otras moléculas de interés biológico [77]–[81], [87]–[94]. Otras propiedades de interés incluyen su carácter anti-amiloidogénico* [95], [96] o como interferente en la formación de priones [97].

El estudio de las interacciones ligando-receptor en presencia de dendrímeros resulta, por tanto, de gran importancia en el contexto del desarrollo y modulación de las aplicaciones prácticas de éstos. El presente estudio se centra en el análisis de la interacción dendrímero-ligando empleando reacciones electroquimioluminiscentes, ECL, en presencia de dendrímeros de tipo PAMAM. A lo largo de este trabajo se comprobó además que el autoensamblaje de los dendrímeros a las concentraciones de trabajo en macroestructuras de distinta naturaleza tiene una influencia crucial en los valores ECL. Estas estructuras han

* Los depósitos amiloides son depósitos de proteínas incorrectamente plegadas, que resultan insolubles y cuya acumulación está relacionada con diferentes enfermedades neurodegenerativas.

sido estudiadas con anterioridad empleando microscopía electrónica de barrido, AFM, aunque dichos estudios tienden a centrarse en los dendrímeros de generación superior (G4.0 a G 10.0) [98], [99]. La existencia de agregados en forma de columna ha sido a su vez observada para las generaciones G4.0 y G8.0 [98]. Sin embargo, los dendrímeros de generaciones inferiores han recibido notablemente menos atención, a pesar de que sus propiedades físicas difieren de las de los dendrímeros de generación mayor: el pequeño tamaño y la baja ramificación de los dendrímeros G1.0 a G3.0 causan que su estructura sea abierta, y que no exista barrera física entre el exterior hidrofílico y el interior hidrofóbico, haciendo que la diferenciación entre los dos entornos sea mucho menos clara que en los dendrímeros de generación superior [79]. Son por ello más abiertos y flexibles, lo que representa una dificultad añadida a su pequeño tamaño a la hora de determinar su morfología exacta. Por ello, los estudios sobre autoensamblaje de dendrímeros de baja generación son escasos o inexistentes.

Como se expone en la **sección 1.1** de esta Memoria, las reacciones ECL hacen uso de una señal eléctrica aplicada a un electrodo de trabajo para generar estados de alta energía reactivos; la liberación de esta energía, bajo condiciones apropiadas, en forma de emisión luminosa posibilita el seguimiento de dichos procesos. La ECL depende de variables tanto espectroscópicas como eléctricas, por lo que es una herramienta más útil que la luminiscencia para el estudio de ciertos procesos [1], [2], [7], [9], [11], [14]–[17]. Las moléculas emisoras se conocen como *sensibilizadores* y entre ellas son destacables por sus excelentes propiedades los complejos de rutenio (II), de los cuales algunos, como el Ru(bpy)₃²⁺ (rutenio tris(2-2'-bipiridilo)) o el Ru(phen)₃²⁺ (rutenio tris(1-10'-fenantrolina)) se han convertido en estándares [1], [2]. El estado emisor Ru^{2+*} puede generarse tanto por la vía de aniquilación directa (generación de los estados Ru⁺ y Ru³⁺ en disolución mediante un barrido de potencial redox y de reducción) [1], [2] como mediante el empleo de un coreactivo (generación de un único estado Ru³⁺ o Ru⁺ en disolución que reacciona con una molécula auxiliar, denominada *coreactivo*; véase **sección 1.1**). Sin embargo, el estudio de reacciones ECL en ausencia de coreactivo en dendrímeros PAMAM de generación completa no ha sido, hasta hoy, llevado a cabo.

En el trabajo que se va a exponer se lleva a cabo el estudio de la influencia del tamaño y la concentración de dendrímeros PAMAM de las generaciones 1.0 y 2.0 en la eficiencia como coreactivos ECL de los mismos. Las disoluciones de trabajo se han preparado en medio acuoso regulado a pH 10 empleando un tampón de

fosfato-NaOH para asegurar la completa desprotonación de los grupos externos del dendrímtero, y por tanto su ausencia de carga [100], [101]. Los hallazgos fundamentales del mismo son:

1. Los dendrímteros de generaciones G1.0, G2.0 y G4.0 (empleado a efectos de comparación) permiten la obtención de medidas ECL en ausencia de coreactivo adicional. Este carácter coreactivo de los dendrímteros de generación completa no ha sido observado con anterioridad.
2. Se comprobó mediante medidas de AFM que los dendrímteros G1.0 y G2.0 forman estructuras macromoleculares tanto en forma de columnas en z como agregados en el plano xy. Se realizó además una medida aproximada de las dimensiones de estas estructuras y de la dependencia de las mismas con la concentración de los dendrímteros.
3. Se demostró la relación entre la formación de estas macroestructuras dendriméricas y la eficiencia ECL como coreactivos de los dendrímteros en disolución.

3.1.3. Procedimiento experimental

3.1.3.1. Reactivos

Todos los reactivos empleados (NaCl, Na₂C₂O₄, (CH₃CH₂)₂N₂, Na₂HPO₄, NaOH, NaH₂PO₄, Ru(bpy)₃Cl₂ y PAMAM G1.0, G2.0 y G4.0 al 20% peso en metanol) son de calidad analítica o superior, adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich y usados sin purificación adicional. Para la preparación de las disoluciones se empleó agua procedente de un sistema Milli-Q con una conductividad menor a 10⁻⁶ S/m. Las disoluciones de dendrímteros se prepararon de la forma habitual previa evaporación del metanol mediante una corriente de nitrógeno puro.

3.1.3.2. Medidas ECL

Las medidas ECL se llevaron a cabo empleando un potenciostato/galvanostato Biologic SP-50) junto con un espectrómetro de fluorescencia PTI. El montaje y acoplamiento de ambos aparatos, que permite la obtención simultánea de los voltagramas y los espectros y curvas de emisión-voltaje, fue llevado a cabo por MicroBeam S.A. El sistema consta además de un control de temperatura Peltier que permite trabajar a una temperatura constante de 298.15±0.01K en el interior de la

célula de trabajo. Para la adquisición y el análisis de los datos experimentales se emplearon los programas comerciales EC-Lab Express (voltagramas) y Felix32 (curvas de emisión/tiempo).

Las medidas ECL se llevaron a cabo en el interior de una célula electroquímica de 1 cm de sección empleando un sistema de tres electrodos: un microelectrodo de superficie de platino como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl/NaCl 3M como electrodo de referencia y un alambre de platino como electrodo auxiliar. El electrodo de trabajo se pule con alúmina y se lava con agua milli-Q varias veces previamente a cada medida ECL para eliminar cualquier deposición en su superficie. Todas las medidas ECL se registraron mediante la técnica de voltametría cíclica lineal (CV) con una velocidad de barrido de 100 mV/s, y con la determinación simultánea de la intensidad de emisión de luz en función del tiempo a todas las longitudes de onda. Tras la calibración de los aparatos, las eficiencias ECL relativas, ϕ_{ECL} , se determinaron a partir de la media de tres medidas de cuatro barridos cada una; de esta forma, los valores obtenidos presentan una incertidumbre menor al 10%. La concentración del complejo $Ru(bpy)_3^{2+}$ se fijó a 2.5×10^{-4} M y se empleó una disolución tampón conteniendo Na_2HPO_4 0.093 M y NaOH hasta una fuerza iónica final total de 0.23 M y pH 10.

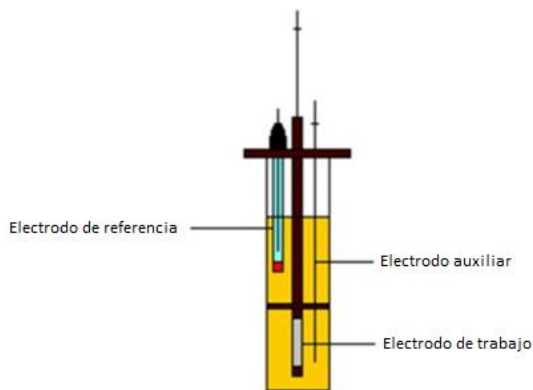


Figura 3.2: Representación esquemática de la célula electroquímica empleada para las medidas de ECL

La reacción de referencia empleada fue la del anión oxalato con $Ru(bpy)_3^{2+}$, debido a la baja intensidad y mala reproducibilidad de los resultados preliminares con etilendiamina, cuya naturaleza de amina primaria similar a la de los grupos terminales de los dendrímeros hizo que se considerase como referencia en un

primer momento. La eficiencia ECL asociada a una reacción estándar (ϕ^0_{ECL}) se determinó a pH 6 y en las siguientes condiciones: $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 0.015 \text{ M}$, $[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 0.0855 \text{ M}$, $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$ a una fuerza iónica total de 0.23 M ; $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$. En estas condiciones, $\phi^0_{\text{ECL}}(298.15\text{K}) = 0.0185$ [44].

Se obtuvieron además los espectros de absorción y emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en disoluciones de dendrímero y en las mismas condiciones experimentales que en el caso de las medidas ECL. No se observaron cambios en las bandas de absorción MLCT (*metal ligand charge transfer* – bandas de transferencia electrónica metal ligando) ni de emisión del rutenio en presencia de ninguno de los dendrímeros G1.0, G2.0 o G4.0. También se descartó la existencia de quenching de fotoluminiscencia del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ con estos dendrímeros.

3.1.3.3. Medidas electroquímicas

Los potenciales de pico, E_{pico} , del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ en disoluciones de dendrímero se determinaron a la temperatura de trabajo de 298.15K empleando la técnica de voltametría de pico diferencial (DPV).

3.1.3.4. Medidas AFM

Las imágenes AFM se obtuvieron con un instrumento Molecular Imaging PicoPlus 2500 AFM de Agilent Technologies y con cantilevers de silicona Model Pointprobe de Nanoworld de frecuencia de resonancia nominal de 240 kHz y constante de fuerza de 42 N/m . Todas las imágenes se obtuvieron en aire y en modo *tapping*, con velocidades de barrido de alrededor de 0.5 Hz y áreas de 256×256 píxeles. Se utilizaron al menos dos placas por cada punto obtenido, con un mínimo de seis áreas diferentes de cada placa barridas. El procesado y la obtención de medidas de las imágenes se llevó a cabo mediante el software gratuito WSxM y se presentan tal cual se obtuvieron, salvo por la eliminación del fondo mediante un comando *flatten* [102].

La preparación de las muestras, que contienen $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y dos concentraciones $[\text{GX}.0] = 10^{-4} \text{ M}$ y 10^{-3} M , a fin de mimetizar en lo posible las condiciones experimentales de las medidas de ECL, se llevó a cabo mediante la deposición de $100 \mu\text{l}$ de cada disolución sobre una placa de mica y dejando reposar durante 30 min en ambiente humedecido. Tras la incubación las muestras se lavaron en agua milli-Q para eliminar los restos de reactivos no adsorbidos, y para prevenir la formación de cristales de sal provenientes del tampón. Posteriormente

se dejaron secar hasta eliminación completa del agua de lavado.

La carga negativa de la mica a pH 6 causó que fuera éste el pH de trabajo elegido, dado que en estas condiciones la adsorción de cualquier dendrímero de generación completa, positivamente cargado, se realiza sin necesidad de funcionalización adicional de la mica. A pH 10, la carga neutra del dendrímero imposibilitó su correcta fijación a la superficie de mica, haciendo las medidas inviables. El análisis de las medidas obtenidas en estas condiciones dio resultados coherentes entre las distintas muestras.

3.1.4. Resultados

3.1.4.1. ECL

El empleo de la técnica de voltametría cíclica acoplada a la emisión-tiempo permitió la determinación de la eficiencia ECL a partir de la integración de las curvas de intensidad de corriente y de emisión, respectivamente, frente al tiempo (**Figura 3.3**)

Como se detalla en la Introducción de esta memoria (véase **sección 1.1.1**), la eficiencia de emisión ECL, entendida como la probabilidad de emisión de luz durante un proceso de transferencia de carga, es aproximadamente igual a la eficiencia coulombica, ϕ_{ECL} [8], [103]:

$$\Phi_{ECL} = \frac{\int_0^t Idt}{\int_0^t idt \left(\frac{N_A}{F} \right)} \quad (3.1)$$

Donde I es la intensidad de emisión de luz en fotones por segundo, i es la intensidad de corriente en amperios por segundo, y N_A y F son las constantes de Avogadro y de Faraday, respectivamente.

Sin embargo, con frecuencia se emplea en la determinación del valor de ϕ_{ECL} una reacción estándar [1], [103]. En ese caso:

$$\Phi_{ECL} = \Phi_{ECL}^0 \frac{Q^0 I}{Q I^0} \quad (3.2)$$

Siendo Q y Q^0 las cargas totales en culombios para la reacción de interés y la de referencia, y análogamente I e I^0 la intensidad en fotones integrada para las dos reacciones; ϕ^0_{ECL} es la eficiencia ECL de la reacción de referencia.

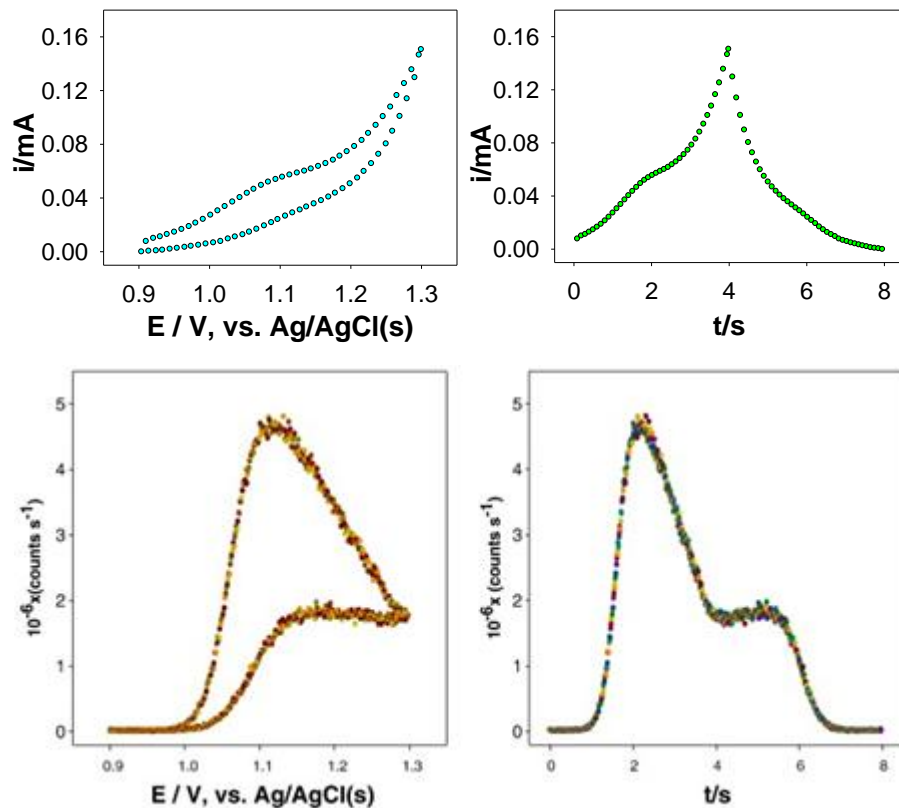


Figura 3.3: De izquierda a derecha y de arriba a abajo, curvas de intensidad de corriente frente a potencial, intensidad de corriente frente a tiempo, emisión frente a potencial y emisión frente a tiempo para una concentración de dendrímero $[G1.0] = 9.26 \times 10^{-5} M$.

$10^4 \times [G1.0]/M$	$10^2 \times \phi_{ECL}$	$10^4 \times [G2.0]/M$	$10^2 \times \phi_{ECL}$
0.239	0.73	0.219	0.66
0.461	1.4	0.418	1.38
0.692	1.73	0.639	2.6
0.828	3.42	0.812	3.42
0.926	4.23	0.975	5.36
2.5	6.4	2.19	3.77
5.03	3.4	4.67	1.18
10.2	1.7	9.75	0.27
20.4	0.68	–	–

Tabla 3.1: Eficiencias ECL relativas, ϕ_{ECL} , para una serie de disoluciones de dendrímeros PAMAM G1.0 y G2.0 a pH 10.

Se ha empleado la reacción de referencia detallada en la sección experimental, donde el ion $C_2O_4^{2-}$ actúa como coreactivo en presencia de $Ru(bpy)_3^{2+}$. Para la obtención de los valores experimentales de eficiencia relativa ϕ_{ECL} (Tabla 3.1) se ha realizado la suposición de que en presencia de dendrímero PAMAM actuando como coreactivo, la reacción se lleva a cabo con la transferencia de dos electrones por cada molécula de dendrímero. Esta aproximación se hace tomando como modelo el propuesto para otras aminas con carácter coreactivo como la tripropilamina [104], [105], y de forma análoga también al mecanismo de reacción estándar en presencia de oxalato sódico [9]. También se ha realizado una corrección para eliminar un pequeño efecto coreactivo del anión OH^- presente en el tampón.

3.1.4.2. Potenciales redox

La obtención del potencial redox del par $Ru(bpy)_3^{3+/2+}$ se realiza con miras a obtener información sobre el entorno del complejo de Ru(II) a diferentes concentraciones de dendrímero. Por razones prácticas, los potenciales redox se obtuvieron mediante la técnica de voltametría diferencial de pulsos (VPD), que mejoraba notablemente la definición de los picos experimentales obtenidos haciendo posible la obtención de valores de E_{pico} incluso en aquellos casos en que los valores de intensidad de corriente experimentales obtenidos mediante CV eran excesivamente pequeños (Figura 3.4).

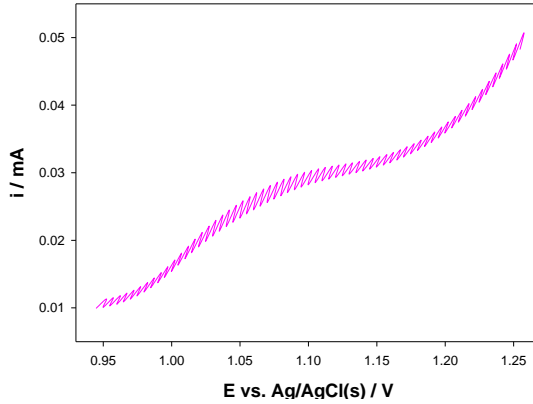


Figura 3.4: Voltagrama del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ obtenido mediante VPD para una concentración de dendrímero PAMAM G2.0 de $8.12 \times 10^{-5} \text{ M}$

$10^4 \times [\text{G1.0}]/\text{M}$	E_{pico}/V	$10^4 \times [\text{G2.0}]/\text{M}$	E_{pico}/V
0	1.262	0	1.262
0.239	1.29	0.219	1.29
0.461	1.29	0.418	1.29
0.692	1.29	0.639	1.284
0.828	1.284	0.812	1.274
0.926	1.284	0.975	1.263
2.5	1.26	2.19	1.341
5.03	1.307	4.67	1.316
10.2	1.316	9.75	1.302

Tabla 3.2: Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SEH), para una serie de disoluciones de dendrímeros PAMAM G1.0 y G2.0

En este caso, se realiza la aproximación de que en una reacción reversible [106]:

$$E_{\text{pico}} = E_{1/2} \pm \Delta E/2 \quad (3.3)$$

donde E_{pico} representa el máximo experimental de la curva voltamétrica de VPD, $E_{1/2}$ es el potencial de onda media del par redox, y ΔE es la amplitud del pulso aplicado, siendo la parte positiva correspondiente al barrido de oxidación y la negativa al de reducción. Como en nuestro caso, $\Delta E = 2.5$ mV, puede considerarse que $E_{\text{pico}} \sim E_{1/2}$. Las medidas obtenidas en estas condiciones tienen un error experimental de aproximadamente ± 5 mV. La Tabla 3.2 recoge los valores de los potenciales redox del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$.

3.1.4.3. Imágenes AFM

La **Figura 3.5** y la **Figura 3.6** muestran las imágenes topográficas obtenidas para los dendrímeros G1.0 y G2.0 a dos concentraciones diferentes. Se puede observar la formación de varias estructuras: agregados globulares de pequeño tamaño, columnas en z formadas por apilamiento de múltiples moléculas de dendrímero y estructuras en forma de hilo en el plano xy en el dendrímero de primera generación, que adoptan una forma más organizada en forma de malla para el dendrímero G2.0. Se comprueba que las estructuras formadas dependen claramente de la concentración de dendrímero de la muestra; en ambos casos, las disoluciones más diluidas dan lugar a apilamientos z de mayor altura con presencia además de estructuras en xy, mientras que las más concentradas presentan una disminución del tamaño de los agregados en z, que en el caso del G1.0 viene acompañada de la desaparición de las estructuras en xy. Son por tanto dos las cuestiones a explicar: por un lado, la influencia de la concentración de dendrímero en el tamaño de los agregados en z y por otro, cuáles son los factores que controlan la formación de hilos y mallas en el plano xy, así como la influencia de la generación de los dendrímeros, y por tanto de su tamaño y carga, en ambas situaciones. A la vista de las imágenes anteriormente citadas, resulta claro que existe una correlación entre el tamaño de los apilamientos en z y la concentración de dendrímero. Se puede observar que, contrariamente a lo esperado, la altura en z de los agregados disminuye marcadamente con la concentración de dendrímero, de aproximadamente 45 nm a $[\text{G1.0}] = 10^{-4}$ M y 35 nm para $[\text{G2.0}] = 10^{-4}$ M a una altura de 5 nm a $[\text{G1.0}] = 10^{-3}$ M y 20 nm para $[\text{G2.0}] = 10^{-3}$ M; por tanto, el cambio es mucho más marcado para la primera generación que para la segunda. Esta disminución viene en ambos casos acompañada de la aparición de agregados sobre el plano xy, que indican que a altas concentraciones de dendrímero el apilamiento en z deja de estar favorecido. Esta observación es coherente con otros estudios realizados con dendrímeros de generaciones mayores, G4.0 a G10.0 [99]. La

existencia de apilamientos de dendrímeros de gran tamaño puede ser explicada en base a la antes reseñada flexibilidad de los dendrímeros de generaciones menores, donde los grupos internos son accesibles y pueden interactuar entre sí a pesar de la repulsión generada por los grupos externos catiónicos [99], [107]. De esta forma, a pesar del pequeño tamaño de los dendrímeros (aproximadamente 2.2 nm de diámetro en el caso de los dendrímeros de primera generación, 2.9 nm para la segunda generación) [108], [109] estas interacciones dan lugar a columnas de gran tamaño, hasta 40 nm, en el eje z.

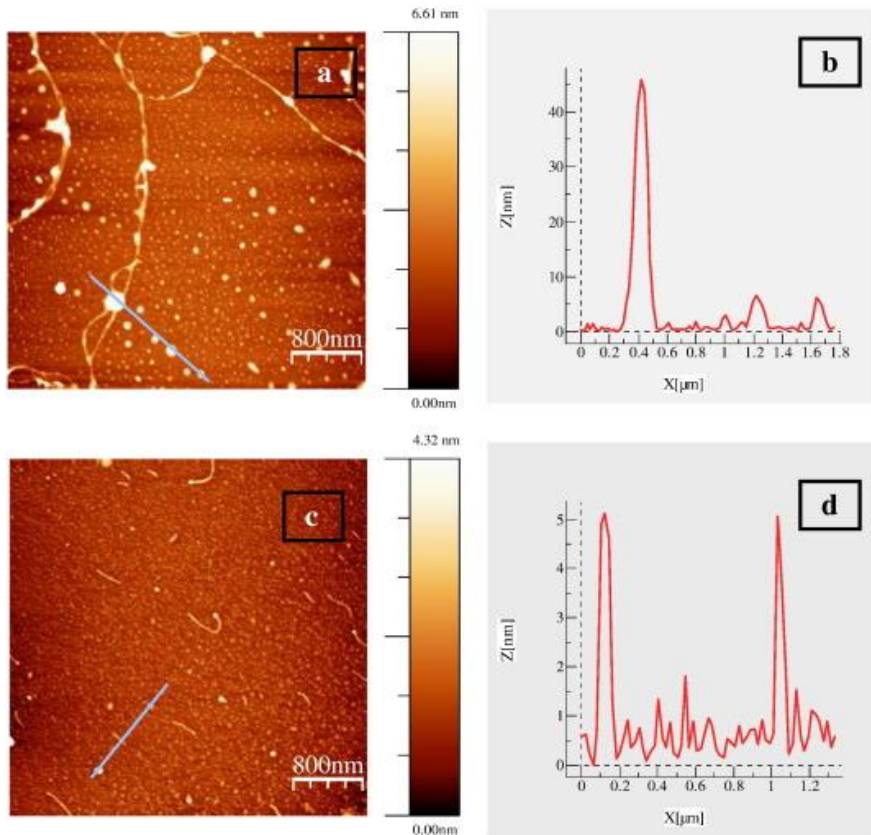


Figura 3.5: A la izquierda, imágenes topográficas obtenidas mediante AFM para concentraciones $[G1.0] = 10^{-4}M$ (arriba) y $10^{-3}M$ (abajo). A la derecha, cortes transversales de ambas imágenes a lo largo de las líneas marcadas.

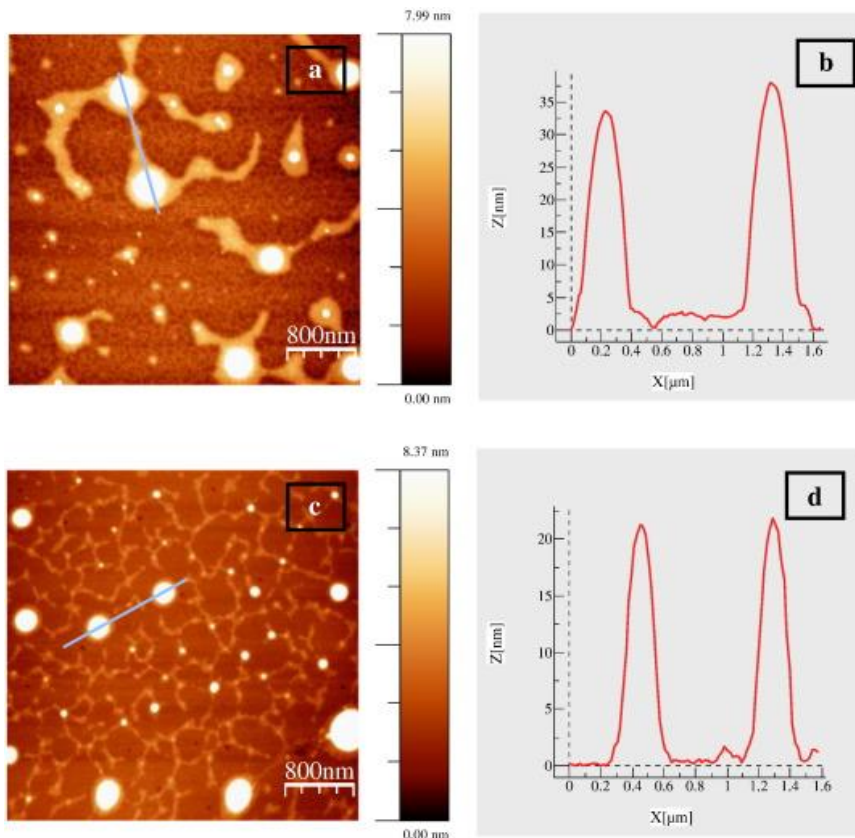


Figura 3.6: A la izquierda, imágenes topográficas obtenidas mediante AFM para concentraciones $[G2.0] = 10^{-4} M$ (arriba) y $10^{-3} M$ (abajo). A la derecha, cortes transversales de ambas imágenes a lo largo de las líneas marcadas.

La formación de agregados en forma de hilo sobre el plano xy resulta sin embargo menos intuitiva y, hasta la fecha, no se había observado en ausencia de polímeros u otras macromoléculas que puedan actuar como “moldes” de las estructuras dendríméricas. Existe de nuevo un precedente en dendrímeros de generación superior, G9.0, descrito por Tomalia y colaboradores en un trabajo donde se comprobaba la capacidad de estos dendrímeros para formar estructuras entrelazadas sobre la superficie de la mica [110]. En ese estudio, se atribuía la formación de dichas estructuras a la capacidad de formación de puentes de hidrógeno que presentan los grupos amino externos de los dendrímeros.

En el presente trabajo, se comprobó previamente que la presencia de las sales de rutenio $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ parece favorecer la formación de estructuras en hilos, algo que se ha observado para otros cationes metálicos previamente y que ha llevado a sugerir mecanismos de formación de estas estructuras, como el puenteo de dendrímeros mediante iones metálicos o la formación de estructuras de tipo quelato entre dos iones metálicos unidos a distintas moléculas de dendrímero. La influencia del rutenio en la formación de estas estructuras puede ser de dos tipos: por un lado, la interacción del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ con los grupos externos de los dendrímeros puede tener un efecto de puente análogo al reportado para el caso de los cationes metálicos [111], y por otro, estos complejos dendrímero-rutenio presentarían una carga positiva importante [112], cuya interacción con la superficie negativa de la mica se encontraría muy favorecida.

La influencia de la concentración y de la generación de los dendrímeros en estas estructuras en el plano xy es a su vez claramente importante. La mayor longitud y entrecruzamiento de los agregados en xy para el dendrímero G2.0, donde se forman redes, en contraste con los hilos aislados del G1.0 demuestran que la mayor área superficial y carga positiva de éste son cruciales a la hora de la formación de estas estructuras. A su vez, el dendrímero de generación mayor presenta el doble de grupos funcionales externos (16 frente a 8 del G1.0), lo que favorece su interacción tanto con el rutenio como con otros dendrímeros y, por tanto, el entrecruzamiento de estructuras.

Respecto a la influencia de la concentración, es notable que para el caso del G1.0, el aumento de la concentración causa la práctica desaparición de los hilos en xy, que pasan de tener un tamaño superior a $4\ \mu\text{m}$ a medir aproximadamente $0.6\ \mu\text{m}$ de largo. Sin embargo, en el caso del dendrímero G2.0 aparecen agregados en xy a ambas concentraciones sin que su tamaño (también superior a $4\ \mu\text{m}$) disminuya notablemente con el aumento de la concentración de dendrímero; sin embargo, su estructura cambia claramente, pasando de ser agregados altos y poco entrecruzados a cadenas más pequeñas pero formando estructuras en forma de malla. Es por tanto obvio que la formación de este tipo de estructuras xy se halla favorecida por las características físicas del G2.0, tanto por su mayor tamaño como por la presencia de un mayor número de grupos externos que favorecen el entrecruzamiento y aportan una mayor carga positiva, favoreciendo a su vez el anclaje del polímero a la mica y su interacción con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ que hace de agente entrecruzante.

3.1.5. Discusión

Como se ha dicho anteriormente, el hecho de que los dendrímeros PAMAM de generación completa G1.0 y G2.0 puedan actuar como coreactivos en ausencia de otros agentes como el oxalato o la tripropilamina (**Figura 3.3**) constituye de por sí un punto a destacar de la presente investigación. El hecho de que la estructura de estos dendrímeros presente aminas de tipo tanto terciario como primario lleva por tanto a plantearse qué grupos funcionales son los responsables de este comportamiento coreactivo, dado que tanto las aminas primarias [113] como las terciarias [104], [105] han sido previamente identificadas como capaces de dar reacciones ECL. Se conoce además que las aminas terciarias, como la tripropilamina, tienden a ser mejores coreactivos que las aminas primarias, debido a que existe cierta estabilización de los intermedios radicales formados por deslocalización en las cadenas alquílicas.

Para aclarar este punto, se llevaron a cabo experiencias adicionales de obtención de eficiencia ECL a pH 6.1. Debido a la estructura del dendrímero, a pH 10 todos los grupos internos, tanto terciarios como primarios, se hallan completamente desprotonados; sin embargo, a pH 6.1 la capa externa del dendrímero se encuentra protonada, mientras que los grupos internos permanecen prácticamente neutros [100], [101]. Experimentalmente se comprobó que tanto en el caso del G1.0 como del G2.0, el cambio de pH traía consigo una disminución drástica de la eficiencia ECL: por ejemplo, para $[G1.0] = 8.74 \times 10^{-5} \text{ M}$ a pH 6, el rendimiento cuántico es de 1.5×10^{-2} , frente a $[G1.0] = 8.28 \times 10^{-5} \text{ M}$ a pH 10, donde $\phi_{\text{ECL}} = 3.4 \times 10^{-2}$; es decir, el rendimiento cuántico disminuye a la mitad al bajar el pH. En el caso del dendrímero G2.0 el cambio es similar: $\phi_{\text{ECL}} = 0.34 \times 10^{-2}$ para $[G2.0] = 2.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ a pH 6, frente a $\phi_{\text{ECL}} = 0.88 \times 10^{-2}$ para $[G2.0] = 2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ a pH 10.

La disminución del rendimiento cuántico a pH 6.1 va además acompañada de una fuerte subida del potencial redox del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$; para concentraciones superiores a $[G1.0] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ o $[G2.0] = 7.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ el potencial redox rebasa el máximo del barrido de potencial en las condiciones de trabajo (1.3 mV frente al electrodo de referencia Ag/AgCl) lo que causa que la oxidación del complejo no sea completa y no se puedan obtener valores de ϕ_{ECL} . Ambos factores apuntan a la existencia de una repulsión electrostática importante a pH 6.1 entre el complejo de rutenio y el exterior protonado de los dendrímeros, que se encuentra ausente a pH 10. Sin embargo, el hecho de que el rendimiento cuántico disminuya a la mitad

resulta llamativo, dado que el cambio de pH no modifica significativamente la estructura de los grupos amino internos del dendrímico y, en consecuencia, no debería causar una disminución del 50% en la eficiencia ECL si éstos fueran los únicos responsables del efecto; es importante además recordar que debido a la estructura abierta de los dendrímeros de generación baja, los grupos interiores se encuentran accesibles a las moléculas de rutenio sin necesidad de atravesar la primera capa protonada como ocurriría en dendrímeros de generación mayor. Por ello, se concluye que el efecto de coreactivo de los dendrímeros PAMAM de generación completa proviene fundamentalmente de las aminas primarias de la capa externa de los mismos, y que la ramificación alquílica probablemente ayuda en la estabilización de los radicales intermedios por deslocalización de la carga de forma análoga a cómo ocurre en las aminas terciarias de tipo orgánico [104], [105].

Como se puede apreciar en la Figura 3.7, tanto para los dendrímeros G1.0 y G2.0 como para un dendrímico de generación superior, el G4.0, el patrón de comportamiento es similar: existe una zona lineal a bajas concentraciones de dendrímico, acompañado de una caída progresiva con el aumento de la concentración. Esta zona lineal corresponde con una prevalencia del efecto coreactivo de los dendrímeros, que es lineal con la concentración de forma análoga al caso de los coreactivos estándar, sobre el resto de efectos. Es notable además que en esta zona de concentración de dendrímeros no se observan variaciones significativas en el potencial de pico del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ (ligeramente más alto, alrededor de 30 mV, que el potencial medido en ausencia de dendrímico, lo que se puede atribuir a la influencia de los dendrímeros sobre la polaridad del medio [82], [83]; véase **Tabla 3.2**), lo que corrobora la ausencia de efectos adicionales en la zona diluida de concentraciones de dendrímico. La zona de caída, por su parte, no cumple ninguna de las dos condiciones: no es lineal y presenta efectos adicionales reflejados en el potencial redox del par, y obedece por tanto a la aparición de una influencia adicional sobre el efecto coreactivo de los dendrímeros. El comportamiento de las eficiencias ECL relativas es llamativo: a pesar del mayor número de grupos externos coreactivos que presentan los dendrímeros de segunda y cuarta generación sobre el de primera (16 y 64 respectivamente, sobre 8 del G1.0) este aumento no se ve reflejado en un aumento de la eficiencia ECL, aunque sí en un estrechamiento de la zona de correlación lineal entre concentración y eficiencia ECL: a mayor número de grupos externos, más estrecho es el rango lineal.

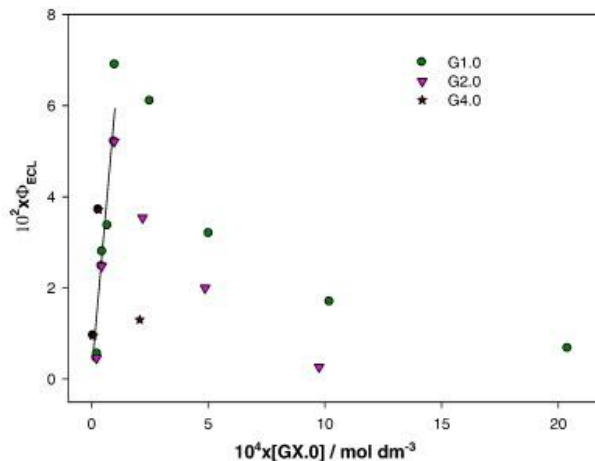


Figura 3.7: Eficiencia ECL en función de la concentración de dendrímero a pH 10

Para responder a la cuestión de los cambios observados en la zona de concentraciones de dendrímero más elevadas es preciso invocar las estructuras tridimensionales de los dendrímeros recogidas en la **sección 3.1.4.3**. Como se discutía en esta sección, a concentraciones diluidas de ambos dendrímeros se producen estructuras de mayor altura en *z* que para concentraciones concentradas, donde la altura disminuye. Estas estructuras en columna favorecen la disposición *hacia afuera* de los grupos amino externos, y presentan por tanto una alta densidad superficial de grupos coreactivos. En contraste, la formación de las estructuras en el plano *xy* tiene lugar mediante el bloqueo de estos grupos externos, que están sirviendo de puente interdendrímero con o sin mediación del ión $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y, por tanto, no quedan libres para servir de coreactivos: de esta forma, mientras los agregados en *z* favorecen el efecto coreactivo de los dendrímeros G1.0 y G2.0, los agregados en *xy* lo inhiben al retirar grupos reactivos del sistema. Este hecho explica a su vez el menor efecto coreactivo del G2.0, que tiene mucha más tendencia a formar estos agregados *xy* en detrimento de los apilamientos en *z* que el G1.0; este último, aunque a concentraciones bajas forma también algunos agregados *xy* en forma de hilos, presenta a la vez los mayores apilamientos en *z*, y la pérdida de estos claramente reduce de forma notable su eficiencia ECL.

Las variaciones de potencial de pico en la zona de concentraciones de dendrímero

más elevadas vienen asociadas a una pérdida de reversibilidad de la reacción, lo que dificulta de por sí su comparación con el resto de valores. Sin embargo, la presencia de agregados xy creando mallas, sobre todo en el caso del G2.0, puede dar lugar a la formación de un microentorno que permita la introducción de los iones $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en su interior; dado que la polaridad del entorno del interior de un dendrímero es menor que la del grueso de la disolución, [82], [83] este desplazamiento daría lugar a un aumento del potencial redox del dendrímero, como se observa experimentalmente. En esta situación se produce además una disminución del número de iones $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ libres para la oxidación en el electrodo, lo que a su vez causaría una bajada de la eficiencia ECL, situación que se comprobó anteriormente ocurre en el G2.0 respecto del G1.0.

En resumen, es posible explicar la variación de la eficiencia ECL de los sistemas dendrímero PAMAM/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ mediante las características de las macroestructuras dendriméricas formadas. A bajas concentraciones, la prevalencia de las estructuras en z favorece el efecto coreactivo, mientras que a concentraciones altas, la pérdida de estos apilamientos y la formación de estructuras en xy causan tanto la pérdida de grupos coreactivos como de rutenio libre que pueda ser empleado para la reacción ECL. Existe por tanto una relación clara entre las estructuras tridimensionales formadas por los dendrímeros a concentraciones diluidas y concentradas y el efecto ECL de los mismos, lo que constituye otro de los descubrimientos de este estudio.

3.1.6. Conclusiones

Se han determinado las eficiencias ECL de los dendrímeros PAMAM de primera y segunda generación en medio acuoso a pH 10, en ausencia de carga, así como los potenciales redox del par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$. Se comprueba que los dendrímeros actúan por sí mismos de coreactivos, efecto que se atribuye mayormente a sus grupos amino primarios externos, probablemente estabilizados por el esqueleto orgánico del dendrímero. Las estructuras de agregados tridimensionales en z y en xy de los dendrímeros modulan este efecto coreactivo, permitiendo explicar la variación de valores ϕ_{ECL} experimentales en el intervalo de concentraciones de dendrímero estudiado. De esta forma, las reacciones electroquimioluminiscentes constituyen una medida del estado de agregación de los dendrímeros PAMAM, y de los cambios que ocurren en el mismo al variar la concentración.

Texto completo del artículo original disponible para consulta y descarga en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013415300234>

3.2. CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles

Autores: R. Prado-Gotor*, A. Jimenez-Ruiz*, J. Carnerero, E. Grueso, I. Villa

Revista: RSC Advances

Fecha de publicación: 2015

Volumen: 5

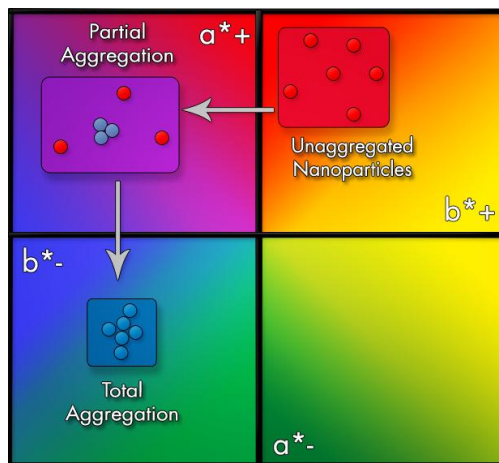
Páginas: 85039 - 85045

IF (JCR - 2014): 3.84

Cuartil (JCR - 2014): Primero

IF (SCIMago – 2014): 1.026

Cuartil (SCIMago – 2014): Primero



3.2.1. Resumen

El presente artículo aborda el desarrollo y puesta a punto de un sistema colorimétrico basado en el sistema de color absoluto CIELab para la determinación de constantes de interacción nanopartícula de oro (AuNPs)-biomolécula. Dicho sistema hace uso de las excepcionales propiedades colorimétricas de las nanopartículas de oro. Se realiza la determinación y análisis de los parámetros colorimétricos CIELab para la obtención, por primera vez, de la energía libre de

interacción de cuatro biomoléculas de distinta naturaleza con nanopartículas de oro de 17.3 nm protegidas por citrato sódico. Las constantes de interacción obtenidas se corroboran mediante el empleo de un método alternativo de análisis de espectros de absorbancia empleando procedimientos matemáticos de deconvolución.

3.2.2. Introducción

El estudio de la interacción de nanopartículas de oro con sustancias de naturaleza biológica ha sido objeto de gran atención en los últimos años, debido entre otras cosas a las excelentes propiedades ópticas, magnéticas y electrónicas que presentan. Estas propiedades van ligadas al tamaño nanométrico de las partículas metálicas y son, por tanto, un elemento que las distingue marcadamente de sus contrapartes macroscópicas y permite su uso en multitud de aplicaciones: por ejemplo, debidamente funcionalizadas son pieza clave en la construcción de sensores[114]–[117] de las más diversas sustancias, entre las que destacan el ADN de simple y doble hebra, las proteínas o las bases nitrogenadas. Esto hace que el estudio de la interacción de las sustancias detectadas con las nanopartículas de oro, sea cual sea su carácter (electrostático, específico, covalente...) implique un gran interés, dado que la cuantificación y conocimiento de dicha interacción permite, entre otras cosas, su modulación para responder a las necesidades de diseño de un sistema de detección concreto.

Como se detalla en la **sección 1.2.2** de esta Memoria, el color de las partículas de oro, cuando éstas son de tamaño nanométrico, viene determinado por los electrones de su superficie metálica, que son la causa de que presenten una banda aguda de absorbancia conocida como SPB (*Surface Plasmon (resonance) Band* – Banda (de resonancia) de Plasmón Superficial). Una de las consecuencias más llamativas de la relación entre el color de las nanopartículas y su nube electrónica externa son los cambios que se registran, incluso a simple vista, al disminuir la distancia interpartícula, es decir, al pasar de un estado libre a otro agregado, en el cual las partículas están a muy corta distancia o incluso en contacto. Esta distancia interpartícula, a su vez, depende del estado y las características superficiales de las partículas: en ausencia de un agente aglomerante, las nanopartículas se mantienen en suspensión estable por la acción de un agente protector (*capping agent*) quien, bien por repulsión electrostática (por presentar carga positiva o negativa) o bien por impedimento estérico, impide la aproximación y precipitación del sistema;

estas suspensiones estables, en el caso de las nanopartículas de oro, son de color rojo intenso. Sin embargo, la interacción AuNPs-biomolécula muy frecuentemente implica la neutralización o apantallamiento de las cargas externas y los grupos que protegen al coloide, permitiendo la aproximación de las partículas e induciendo por tanto un crecimiento que va acompañado de un cambio de color al azul.

Dado que la cuantificación de la interacción nanopartícula-biomolécula no siempre es sencilla y, tradicionalmente, implica la medición y seguimiento de una propiedad ligada bien a la biomolécula o bien al agente funcionalizante incorporado en la superficie de la nanopartícula, biomoléculas que no son coloreadas y no emiten fluorescencia presentan graves problemas a la hora de encontrar una vía para la determinación de su constante de interacción con AuNPs. Este problema se agrava en el caso de nanopartículas no funcionalizadas o cuyo agente funcionalizante no presenta a su vez ninguna propiedad óptica medible. En estos casos, se propone que el estudio del cambio de color de las suspensiones de nanopartículas en presencia de ligandos biológicos puede ser una pieza clave a la hora de abordar el estudio de su interacción, dado que se trata de una propiedad ligada al núcleo metálico de la partícula y que puede ser medida y cuantificada con independencia de la naturaleza de la biomolécula o del agente funcionalizante que presente la partícula.

Se emplea como sistema de referencia para la cuantificación del color de las suspensiones el sistema CIELab (véase **sección 1.2.1**). Los parámetros CIELab pueden ofrecer información a simple vista del color de un sistema; el signo de un determinado valor indica el color base que codifica, mientras que su valor numérico absoluto determinará la intensidad de color, y su valor relativo a su componente opuesta (a^* frente a b^*) determinará si el color que prevalece es el codificado por la componente a^* , por la b^* , o será resultado de una mezcla de ambos. Aunque los parámetros CIELab han sido usados previamente para el seguimiento de cinéticas en algunos campos de la química aplicada, por ejemplo el estudio de materiales [118], [119] o de química de alimentos [120]–[122], su uso en la determinación de constantes de interacción no cuenta con precedentes y constituye por tanto un nuevo avance en el campo.

Se han escogido como moléculas de prueba para la determinación de sus constantes y energías libres de enlace cuatro biomoléculas representativas de sus respectivas clases: la lisozima, una proteína modelo, de gran interés por su relación con diversas enfermedades como la leucemia, la meningitis o diversas

enfermedades renales [123]–[126]; la adenosina, un nucleósido cuya interacción con las superficies de oro, tanto como parte de la cadena de ADN como independientemente, ha sido estudiada previamente por diversos métodos [127]–[130] pero nunca cuantificada; la L-lisina, un aminoácido proteinogénico; y la tiourea, una molécula orgánica de pequeño tamaño que ha sido foco de un reciente estudio empleando parámetros colorimétricos [131]. La lisozima presenta una fuerte fluorescencia a 350 nm, mientras que las otras tres moléculas carecen de propiedades espectrofotométricamente medibles.

3.2.3. Procedimiento experimental

3.2.3.1. Reactivos

Todos los reactivos empleados en el presente trabajo son de calidad analítica o superior. La lisozima [L6876] y la adenosina [A9251] se adquirieron de Sigma-Aldrich; la L-lisina [1057000100] (en forma de monohidrocloreuro) procede de Merck y la tiourea [28615.231] de VWR Chemicals. Todos los reactivos se usaron sin purificación ni procesamiento adicional. Las nanopartículas de oro (protegidas por citrato) se prepararon siguiendo una síntesis descrita en bibliografía [132], por reducción directa de sales de HAuCl_4 [Sigma-Aldrich, 520918] con citrato sódico [Riedel-de-Häen, 32320] con calentamiento (95°C) y agitación magnética, y se caracterizaron mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) y analizadas empleando el software libre ImageJ. El coloide resultante presenta un diámetro de 17.3 ± 1.1 nm, y una circularidad media de 0.916 para un máximo de 1.000, lo que implica una esfericidad casi perfecta de las partículas.

3.2.3.2. Instrumentación

Las medidas de TEM para caracterización del coloide se obtuvieron en un microscopio Hitachi CM200 a 200kV. Las muestras se prepararon empleando rejillas de cobre cubiertas de película de carbono sobre las que se depositó una gota de la disolución problema, que posteriormente se dejó secar durante varias horas.

Los espectros de absorbancia se obtuvieron mediante el empleo de un espectrofotómetro de absorbancia Cary500, trabajando a $[\text{AuNPs}] = 2.8 \times 10^{-10}$ M y concentraciones variables de los ligandos. Los **espectros de emisión** se registraron

usando un fluorímetro Hitachi F2500, a concentraciones fijas de lisozima y $[\text{AuNPs}] = 0$ a $3 \times 10^{-9} \text{M}$.

La conversión de espectros de absorbancia a CIELab se hizo manualmente, con ayuda de una hoja de cálculo programada en Excel y empleando medidas y patrones normalizados CIE [51]. Se realizó previamente la obtención de los parámetros CIEXYZ a partir de los espectros experimentales (**sección 1.2.1, ecuaciones 1.14.a a 1.14.c**). La conversión de valores XYZ a Lab se realizó de forma directa (**ecuaciones 1.15.a a 1.16.c**) empleando los valores del punto blanco (X_n , Y_n , Z_n) para un iluminante D65 y un observador de 10° .

La deconvolución de los espectros de absorbancia experimentales se llevó a cabo empleando el programa de código abierto Fityk [133] mediante un ajuste empleando bandas de tipo Voigt a fin de tener en cuenta la distribución no gaussiana del pico de absorbancia de las nanopartículas libres. Para el ajuste se emplearon un mínimo de dos bandas y un máximo de cuatro: una correspondiente a la banda de absorbancia de las nanopartículas libres, centrada en 521 nm; una o dos (según necesidades del ajuste) bandas a $\lambda > 530$ nm, correspondientes a distintas distribuciones de tamaño de las estructuras agregadas; y una banda ancha, con centro en 300 nm, que corresponde a la dispersión causada por las nanopartículas a longitudes de onda cortas, así como a cualquier posible absorbancia residual de las sales de Au^{3+} no reaccionadas durante el proceso de síntesis [134].

3.2.4. Resultados y discusión

Se observa que para todas las biomoléculas estudiadas se produce un desplazamiento del máximo de absorbancia de la banda plasmon ($\Delta\lambda$) hacia el rojo, en presencia de una concentración suficiente (**Figura 3.8**). Dicho desplazamiento es diferente para cada una de las biomoléculas, ya que va ligado a la naturaleza e intensidad de la interacción AuNPs-biomolécula.

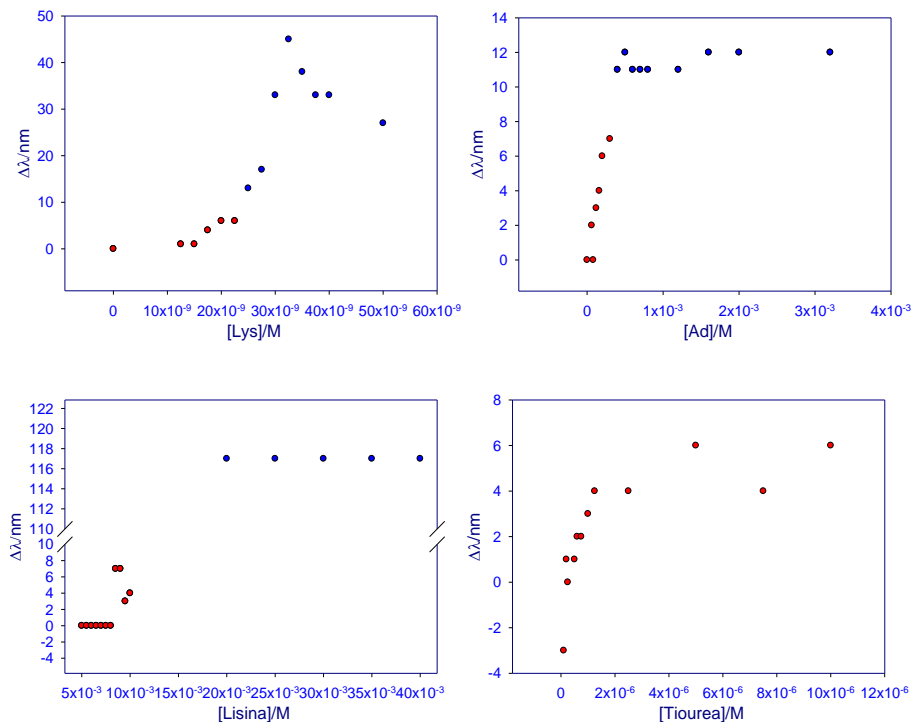


Figura 3.8: Valores de $\Delta\lambda$, expresado como $\lambda_{\text{agregador}} - \lambda_{\text{libre}}$, para las cuatro biomoléculas estudiadas (de izquierda a derecha y de arriba a abajo: lisozima, adenosina, lisina y tiourea). Los desplazamientos superiores a $\Delta\lambda = 10$ corresponden a disoluciones donde empiezan a aparecer colores morados o azules a simple vista y se encuentran marcados en color azul en la gráfica.

La conversión de los espectros de absorbancia de las suspensiones estudiadas a sus parámetros de color CIELab (**Figura 3.9**) ofrece información adicional sobre el estado de agregación de cada uno de los sistemas. Un cambio de color de rojo a azul como el observado durante la agregación de nuestros nanosistemas vendrá acompañado de un cambio de la componente a^* de valores positivos (rojo) a ligeramente negativos (verde) mientras que la componente b^* pasará de ser ligeramente positiva (amarillo) a negativa (azul). La mayor intensidad de las componentes roja y azul sobre sus contrapartes amarillas y verdes causa que los dos primeros sean los tonos percibidos a simple vista. Colores de igual intensidad

medidos por distintas coordenadas se mezclarán y darán lugar a tonos intermedios: por ejemplo, un valor positivo de a^* (rojo) y negativo de b^* (azul) codifica una tonalidad violeta. En el caso de nuestras disoluciones, el color es muy tenue debido a la baja concentración de AuNPs empleada; esto causa que los valores absolutos de a^* y b^* no sobrepasen en ningún caso el valor de 9, y que el tercer parámetro de luminosidad L (no detallado en el trabajo) presente un valor constante entre 90 y 92 para todas las suspensiones, sobre un máximo de 100 que correspondería al color blanco del sistema.

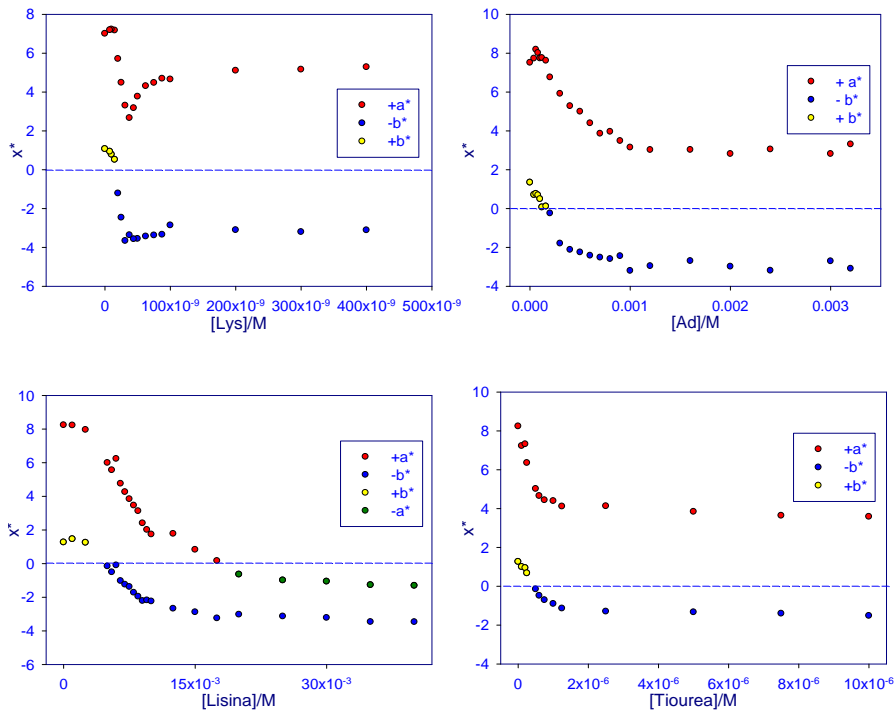


Figura 3.9: Parámetros CIE Lab obtenidos para las cuatro biomoléculas estudiadas (de izquierda a derecha y de arriba a abajo: lisozima, adenosina, lisina y tiourea). Los valores positivos y negativos de ambos parámetros se colorean empleando el tono que expresan respectivamente, mientras que su valor numérico es una expresión de la intensidad de dicho tono.

Como se puede observar en la **Figura 3.9**, la información obtenida de las medidas de desplazamiento de banda se complementa con la aportada por las gráficas CIELab; mientras que las primeras son una medida del tamaño aproximado de las estructuras formadas durante un proceso de agregación, pero no tanto de la proporción de nanopartículas que se encuentran formando parte de estos agregados, las segundas ofrecen información sobre el grado de agregación del sistema, reflejado en la intensidad de sus componentes de color, a cambio de sacrificar precisión en la información sobre el tamaño exacto de las nanoestructuras.

En el caso de nuestros sistemas, los parámetros CIELab aportan la siguiente información:

- La lisozima causa una agregación de las nanopartículas proporcional a su concentración, reflejado en un cambio de color de rojo (a^* positivo, b^* positivo) a violeta (a^* positivo, b^* negativo) hasta un valor de $[lis] = 3.75 \times 10^{-8} M$. Por encima de este valor, la componente b^* se estabiliza y la componente a^* crece, lo que indica una reaparición de los tonos rojos a concentraciones crecientes de lisozima. Este fenómeno va ligado a la ya mencionada reversión del grado de agregación en presencia de concentraciones altas de lisozima en disolución.
- La adenosina causa una agregación parcial de los nanosistemas, que permanecen de un claro color violeta donde las componentes a^* y b^* son aproximadamente iguales en valor absoluto ($a^* \sim 3$, $b^* \sim -3$)
- La lisina causa una fuerte agregación, que se refleja en el hecho de que la componente a^* vira hasta valores negativos; es decir, a altas concentraciones de lisina las disoluciones presentan un color completamente azul sin tintes ni rojos ni morados. En este punto, se puede hablar de una agregación prácticamente completa del sistema.
- La tiourea causa una agregación tenue; incluso a concentraciones altas, el mayor valor de a^* (4) respecto a b^* (-1) es indicativo de un color violeta con prevalencia de los tonos rojizos sobre los azulados.

De esta forma, se puede comprobar que existe una buena concordancia entre los datos aportados por las medidas de desplazamiento del máximo de absorbancia, que sitúan el orden de tamaño de los agregados en la siguiente secuencia:

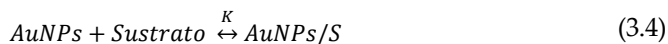
Lisina > Liozima > Adenosina > Tiourea

y las medidas de variación de parámetros CIELab, donde el grado de agregación varía de la siguiente forma:

Lisina > Adenosina > Tiourea

y donde la posición de la liozima no queda claramente definida, debido a que los fenómenos de reversión observados no permiten comparar la intensidad del cambio de color con la que se observa en los otros tres casos.

Hasta este punto se ha realizado una comparación cualitativa del tamaño de los nanosistemas y del grado de agregación de los mismos en presencia de agentes aglomerantes. Sin embargo, a efectos de esta comparación no se ha tenido en cuenta la concentración de cada biomolécula que es necesaria para inducir la agregación de los sistemas, que es marcadamente diferente y se encuentra directamente ligada a la intensidad de la interacción nanopartícula-biomolécula; por ejemplo, el leve cambio de color de la tiourea alcanza una zona estable para [Tiourea] = 2.5×10^{-6} M, mientras que el de la lisina, mucho más intenso, no ocurre hasta [Lisina] = 2×10^{-2} M. Es decir, se precisa una concentración casi diez mil veces superior de lisina para inducir un cambio, pese a que la intensidad de este cambio, cuando ocurre, es marcadamente superior. A fin de realizar una cuantificación real de las constantes y energías libres ligadas a los cambios de color observados, se ha realizado un estudio haciendo uso de dos modelos matemáticos de ajuste de uso habitual en estudios de absorbancia. El primero de ellos es el *modelo de pseudofase* o *modelo de dos estados*, que emplea la variación de una propiedad P medible que cambia a lo largo de un proceso de interacción ligando-receptor para calcular la constante de equilibrio de dicho proceso [135]. Se hace para ello la aproximación necesaria de que todos los sitios de interacción en la superficie de la nanopartícula son equivalentes:



$$[AuNPs]_{libre} = \frac{[AuNPs]_{total}}{1 + K[S]} \quad (3.5.a)$$

$$\left[\frac{AuNPs}{S} \right] = \frac{[AuNPs]_{total} K[S]}{1 + K[S]} \quad (3.5.b)$$

$$P_{obs} = \frac{P_{AuNps} + P_{AuNps/S} K[S]}{1 + K[S]} \quad (3.6)$$

donde P es la propiedad medida, y S la biomolécula, actuando como sustrato.

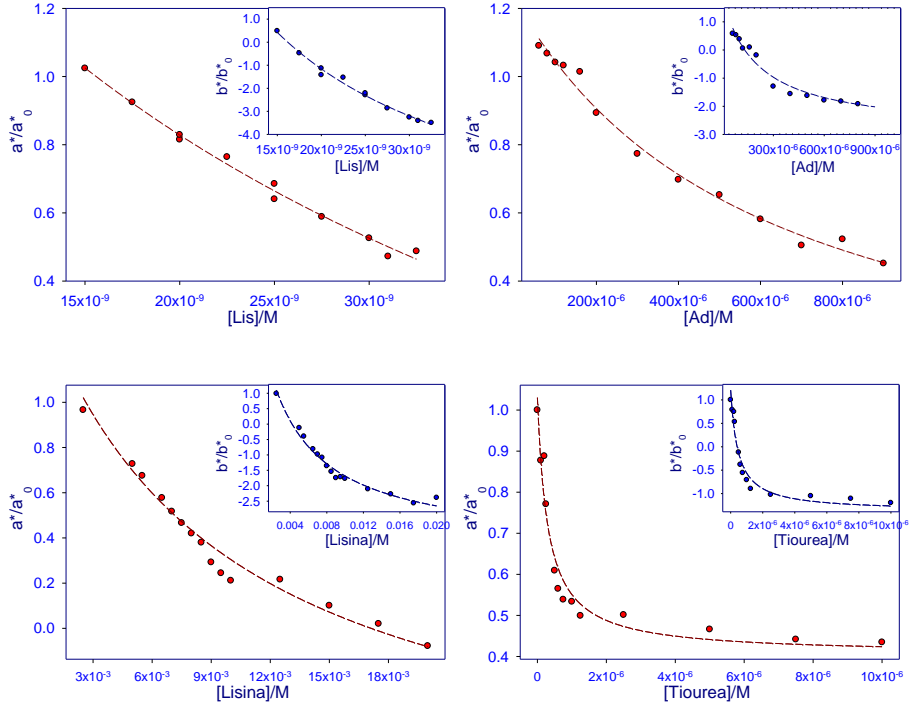


Figura 3.10: Ajustes empleando el modelo de dos estados para los parámetros normalizados (x^*/x_0^* , donde x_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) a^* y b^* de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, para $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} M$ $[Lis] = 0 - 3.75 \times 10^{-8} M$; $[Ad] = 0 - 9 \times 10^{-4} M$; para $[AuNPs] = 3.2 \times 10^{-10} M$ $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2} M$; $[Tiourea] = 0 - 1 \times 10^{-5} M$.

La suave variación de los parámetros CIELab con la agregación, y por tanto, indirectamente, con la concentración de biomolécula en el medio, permite su empleo como propiedad P observada a efectos de cálculo de la constante de interacción ligando-receptor de nuestro sistema (Figura 3.10). A partir de la constante de equilibrio calculada para los dos parámetros de cada una de las cuatro

biomoléculas, se obtiene de forma directa la energía libre, ΔG^0 aplicando la ecuación:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (3.7)$$

donde R es la constante de los gases ideales (8.314 J/Kmol) y T la temperatura de reacción.

Como se puede observar en la **Tabla 3.3**, el mayor error experimental se encuentra en las medidas correspondientes a las disoluciones de lisozima, y las medidas más precisas se obtienen para el caso de la tiourea. Este dato está estrechamente relacionado con la forma de las gráficas analizadas; la ecuación de dos estados codifica una ecuación curva, con una zona estable al final. Cuanto mejor se encuentren definidas las zonas de bajada y estable de la curva experimental, mayor será la precisión del modelo, como ocurre en el caso de la tiourea. Para la lisozima, la reversión causa un truncamiento de la curva en el punto donde cambia el comportamiento del sistema; de esta forma, el ajuste se realiza empleando únicamente una parte en vez de la curva completa, lo que provoca una incertidumbre añadida en los valores calculados.

Biomolécula	Parámetro	K/M ⁻¹	ΔG^0 /kJ.mol ⁻¹
Lisozima	a*	2.9 ± 1.3x10 ⁷	-42.5 ± 1.6
	b*	8.6 ± 5.7x10 ⁷	-45.2 ± 1.7
Adenosina	a*	1.7 ± 0.5x10 ³	-18.4 ± 0.7
	b*	4.8 ± 2.3x10 ³	-21.0 ± 1.2
Lisina	a*	1.2 ± 0.3x10 ²	-11.8 ± 0.7
	b*	2.7 ± 0.8x10 ²	-13.8 ± 0.7
Tiourea	a*	3.3 ± 0.8x10 ⁶	-37.2 ± 0.6
	b*	2.2 ± 0.5x10 ⁶	-36.2 ± 0.6

Tabla 3.3: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando el modelo de dos estados a los parámetros CIELab de las cuatro biomoléculas

A fin de comprobar los valores de energía libre obtenidos mediante el modelo de pseudofase, y de intentar compensar en la medida de lo posible el error experimental introducido por las características matemáticas de dicho modelo, se ha llevado a cabo un ajuste adicional empleando un modelo de tipo lineal, la ecuación de Benesi-Hildebrand [136] (**Figura 3.11**):

$$\frac{[AuNPs]_0}{P} = \frac{1}{K\varepsilon [S]_0} + \frac{1}{\varepsilon} \quad (3.8)$$

donde P es, de nuevo, la propiedad medida y S la biomolécula; K es la constante de enlace y ε es un coeficiente cuya naturaleza depende de la propiedad P medida.

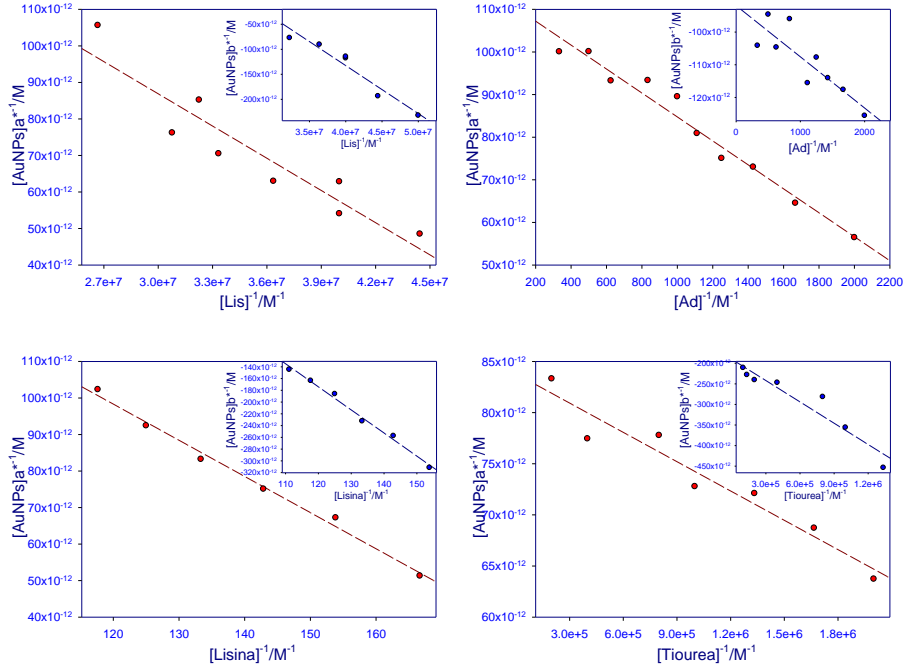


Figura 3.11: Ajustes empleando el modelo de Benesi-Hildebrand para los parámetros normalizados (x^*/x_0^* , donde x_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) a^* y b^* de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, para $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} M$ $[Lis] = 0 - 3.75 \times 10^{-8} M$; $[Ad] = 0 a 9 \times 10^{-4} M$; para $[AuNPs] = 3.2 \times 10^{-10} M$ $[Lisina] = 2.5 \times 10^{-3} M a 2 \times 10^{-2} M$; $[Tiourea] = 0 a 1 \times 10^{-5} M$.

La ecuación de Benesi-Hildebrand, al ser de tipo lineal, resulta en principio más precisa que la de dos estados. Sin embargo, el requerimiento de que la relación propiedad-concentración sea de tipo lineal causa una reducción del rango de medida válido respecto del que se obtiene mediante el modelo de dos estados, que no tiene tal restricción. En el primer caso, el error experimental, por ejemplo, tendrá

mayor peso al reducirse el margen de concentraciones medido, y por tanto aumentar la influencia de la dispersión de los puntos experimentales (**Tabla 3.4**).

Biomolécula	Parámetro	K/M^{-1}	$\Delta G^0/kJ.mol^{-1}$
Lisozima	a*	$6.0 \pm 1.1 \times 10^7$	-44.4 ± 0.5
	b*	$2.6 \pm 0.4 \times 10^7$	-42.3 ± 0.4
Adenosina	a*	$4.0 \pm 0.2 \times 10^3$	-20.6 ± 0.2
	b*	$5.9 \pm 0.6 \times 10^3$	-21.5 ± 0.6
Lisina	a*	$2.2 \pm 0.2 \times 10^2$	-13.4 ± 0.2
	b*	$0.76 \pm 0.01 \times 10^2$	-10.7 ± 0.03
Tiourea	a*	$8.8 \pm 0.3 \times 10^6$	-39.6 ± 0.1
	b*	$1.1 \pm 0.08 \times 10^6$	-34.5 ± 0.2

Tabla 3.4: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando el modelo de Benesi-Hildebrand a los parámetros CIELab de las cuatro biomoléculas

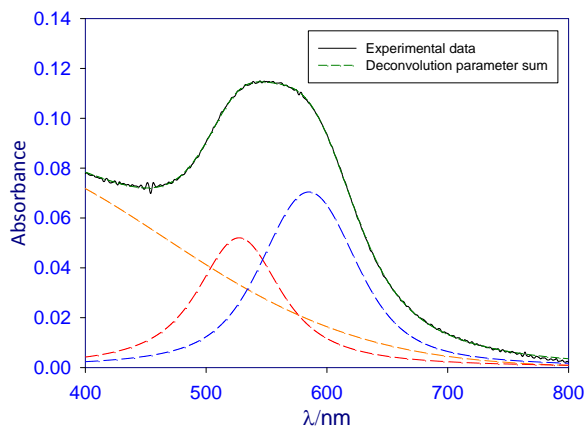


Figura 3.12: Ejemplo de deconvolución de espectro correspondiente a una disolución $[AuNPs] = 2.8 \times 10^{-10} M$, $[Lis] = 2.8 \times 10^{-8} M$. El pico rojo (521 nm) corresponde al pico de absorbancia de las nanopartículas libres y el azul (~600 nm) a la fracción agregada.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante el análisis matemático de los parámetros CIELab, se ha llevado a cabo un procedimiento adicional de procesamiento de los espectros de absorbancia experimentales consistente en realizar la

deconvolución de los mismos en picos de absorbancia individuales y analizar estos picos de forma independiente. El proceso de deconvolución se ha realizado empleando el software Fityk v0.9.8 de la forma detallada en la sección de *procedimiento experimental*. Un ejemplo del mismo puede verse en la **Figura 3.12**.

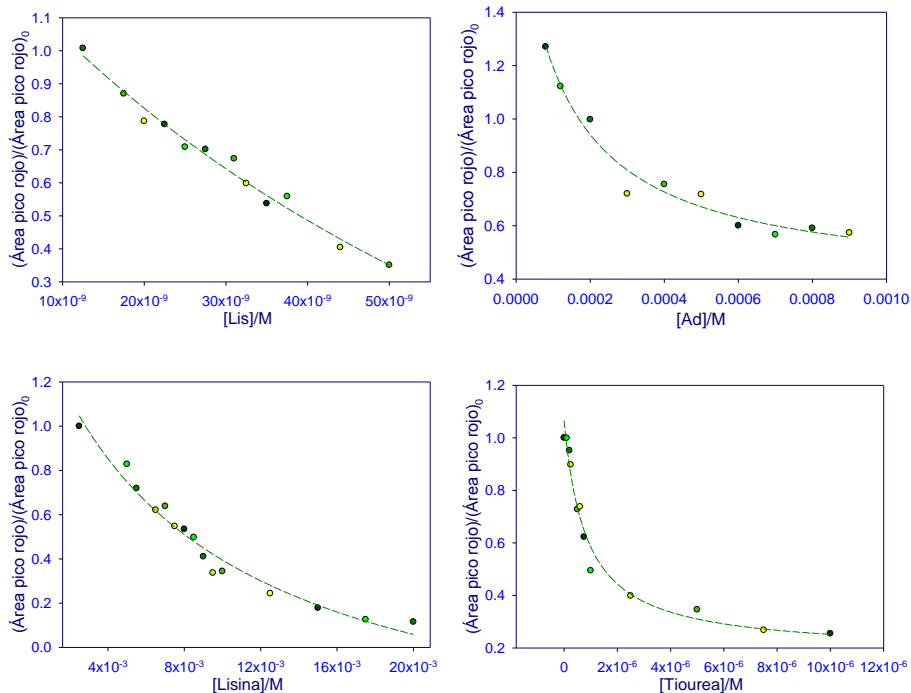


Figura 3.13: Ajustes empleando el modelo de dos estados para el área del pico correspondiente a la fracción de nanopartículas libres normalizada (área*/área*, donde área* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) de las cuatro biomoléculas estudiadas. De izquierda a derecha y de arriba abajo, $[\text{Lis}] = 1.3 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-8} \text{ M}$; $[\text{Ad}] = 0 - 9 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Lisina}] = 2.5 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{Tiourea}] = 0 - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$.

La **Figura 3.13** muestra los ajustes obtenidos aplicando el modelo de dos estados a la variación de área del pico de absorbancia de las nanopartículas libres a cada una de las concentraciones de trabajo. Es posible emplear otros parámetros para realizar el ajuste, por ejemplo el área normalizada del pico agregado. Sin embargo, éste experimenta desplazamientos y ensanchamientos al aumentar la concentración de

biomoléculas en el medio, llegando incluso en algunos casos a desdoblarse en dos picos correspondientes a dos estructuras agregadas de distinto tamaño. A fin de evitar imprecisiones ligadas a estos cambios de forma y posición, se emplea para los ajustes el pico libre de absorbancia, cuyos parámetros permanecen prácticamente constantes a todas las concentraciones y para todas las biomoléculas. A efectos de comparación de los valores obtenidos y de la precisión de los métodos de ajuste para ambos procedimientos, se realiza también un ajuste de los datos a la ecuación de Benesi-Hildebrand (**Figura 3.14**).

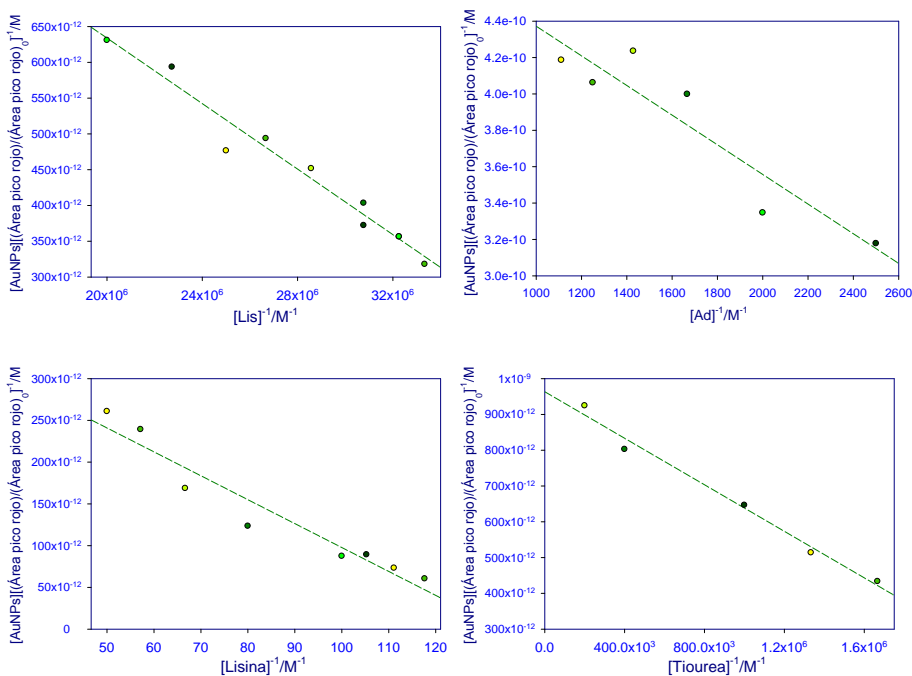


Figura 3.14: Ajustes empleando el modelo de Benesi-Hildebrand para el área del pico correspondiente a la fracción de nanopartículas libres normalizada ($\text{área}^*/\text{área}_0^*$, donde área_0^* corresponde al valor para la disolución de nanopartículas libres) de las cuatro biomoléculas estudiadas De izquierda a derecha y de arriba abajo, para [Lis] = 3×10^{-8} M a 6.25×10^{-8} M; [Ad] = 8×10^{-5} M a 5×10^{-4} M; [Lisina] = 2.5×10^{-3} M a 2×10^{-2} M; [Tiourea] = 0 - 1×10^{-5} M.

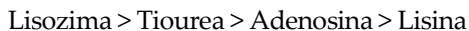
Los ajustes empleando datos procedentes de deconvolución de espectros de absorbancia y aplicando el modelo de dos estados presentan valores muy similares

entre sí (**Tabla 3.5**), observándose que, en todos los casos, la precisión conseguida con el método de Benesi-Hildebrand es superior a la del modelo de dos estados, a pesar de la dispersión de puntos que aparece en algunos de los ajustes.

Biomolécula	Modelo de ajuste	K/M^{-1}	$\Delta G^0/kJ.mol^{-1}$
Lisozima	Dos estados	$1.3 \pm 0.7 \times 10^7$	-40.0 ± 1.2
	Benesi-Hildebrand	$4.9 \pm 0.4 \times 10^7$	-43.8 ± 0.2
Adenosina	Dos estados	$8.2 \pm 4.2 \times 10^3$	-22.3 ± 1.3
	Benesi-Hildebrand	$6.4 \pm 1.3 \times 10^3$	-21.7 ± 0.5
Lisina	Dos estados	$1.2 \pm 0.4 \times 10^2$	-11.8 ± 0.8
	Benesi-Hildebrand	$1.3 \pm 0.2 \times 10^2$	-12.1 ± 0.4
Tiourea	Dos estados	$1.2 \pm 0.2 \times 10^6$	-34.7 ± 0.5
	Benesi-Hildebrand	$3.0 \pm 0.06 \times 10^6$	-36.9 ± 0.1

Tabla 3.5: Constantes de equilibrio y energías libres de enlace calculadas aplicando los modelos de dos estados y de Benesi-Hildebrand al área del pico libre normalizado para las cuatro biomoléculas

A efectos de facilitar la comparación de los valores de energía libre calculados entre modelos, se recoge en la **Tabla 3.6** un cuadro resumen de los valores obtenidos a lo largo de este estudio. El análisis de dicha tabla permite establecer la secuencia de afinidad de las biomoléculas estudiadas por las nanopartículas de oro sin funcionalizar, que queda finalmente de la siguiente manera:



siendo los valores medios de ΔG^0 de -42.9 ± 1.8 kJ/mol para la lisozima; -36.5 ± 1.9 kJ/mol para la tiourea; -20.9 ± 1.4 kJ/mol para la adenosina y -12.3 ± 1.1 kJ/mol para la lisina. De esta forma, se demuestra que el análisis mediante modelos matemáticos de los cambios colorimétricos y de absorbancia inducidos por la formación de agregados de nanopartículas en presencia de ligandos apropiados proporciona una forma viable de determinación de constantes y energías libres de los sistemas.

Lisozima	$\Delta G^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Modelo de dos estados (deconvolución)	-40.0 ± 1.2
Modelo de dos estados (CIELab)	-42.5 ± 1.6 (a*)
	-45.2 ± 1.7 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (deconvolución)	-43.8 ± 0.2
Método de Benesi-Hildebrand (CIELab)	-44.4 ± 0.5 (a*)
	-42.3 ± 0.4 (b*)
Adenosina	$\Delta G^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Modelo de dos estados (deconvolución)	-22.3 ± 1.3
Modelo de dos estados (CIELab)	-18.4 ± 0.7 (a*)
	-21.0 ± 1.2 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (deconvolución)	-21.7 ± 0.5
Método de Benesi-Hildebrand (CIELab)	-20.6 ± 0.2 (a*)
	-21.5 ± 0.6 (b*)
Lisina	$\Delta G^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Modelo de dos estados (deconvolución)	-11.8 ± 0.8
Modelo de dos estados (CIELab)	-11.8 ± 0.7 (a*)
	-13.9 ± 0.7 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (deconvolución)	-12.1 ± 0.4
Método de Benesi-Hildebrand (CIELab)	-13.4 ± 0.2 (a*)
	-10.7 ± 0.03 (b*)
Tiourea	$\Delta G^0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Modelo de dos estados (deconvolución)	-34.7 ± 0.5
Modelo de dos estados (CIELab)	-37.2 ± 0.6 (a*)
	-36.2 ± 0.6 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (deconvolución)	-36.9 ± 0.1
Método de Benesi-Hildebrand (CIELab)	-39.6 ± 0.1 (a*)
	-34.5 ± 0.2 (b*)

Tabla 3.6: Resumen de las energías libres de enlace con nanopartículas de oro obtenidas para lisozima, adenosina, lisina y tiourea a partir del análisis de parámetros CIELab y de deconvolución.

Se realiza además un estudio adicional de la constante de interacción lisozima-AuNPs empleando como herramienta la fuerte fluorescencia de la lisozima. Para ello, se mide la disminución de intensidad de esta fluorescencia (*quenching*) en presencia de concentraciones variables de nanopartículas de oro y a tres concentraciones fijas de lisozima: $[\text{lis}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $5 \times 10^{-7} \text{ M}$. Sin embargo, como se refleja en la **Figura 3.15**, el ajuste obtenido al aplicar el modelo de pseudofase no presenta un buen coeficiente de correlación; este fenómeno apunta a

la existencia de varios procesos afectando a la pérdida de intensidad de emisión de la lisozima, de forma que el *quenching* observado no sólo es resultado de la interacción lisozima-AuNPs, sino que presenta contribuciones adicionales.

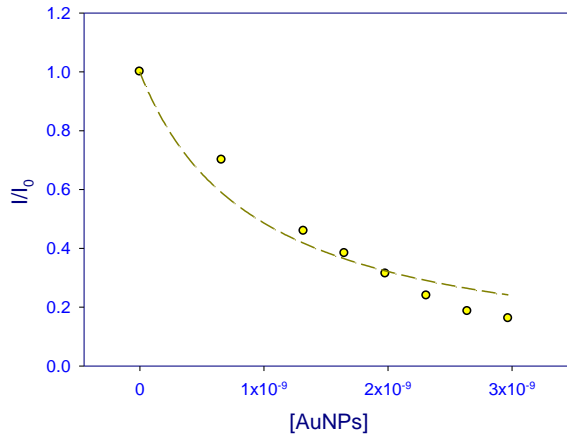


Figura 3.15: Ajuste, empleando el modelo de dos estados, de los datos experimentales de pérdida de emisión (expresados como I/I_0) para $[lis] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

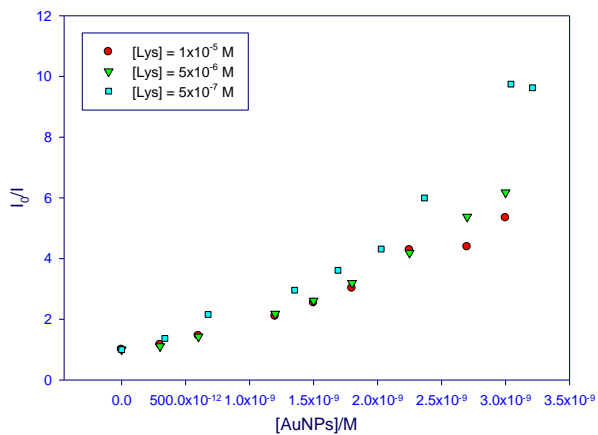


Figura 3.16: Representación de Stern Volmer para tres concentraciones diferentes de lisozima y concentración variable de AuNPs.

La representación de Stern Volmer (**Figura 3.16**) corrobora la existencia de una influencia adicional en la constante de quenching observada. La ecuación de Stern Volmer, de uso habitual en estudios de fluorescencia, establece una correlación lineal entre la inversa de la intensidad de emisión normalizada (I_0/I) y la concentración de un quenchers:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q] \quad (3.9)$$

donde K_s es la constante de Stern Volmer y Q la molécula causante del quenching. Como se puede observar, no existe relación lineal entre los parámetros para el caso del quenching de la lisozima con nanopartículas de oro; generalmente este fenómeno es indicativo de la existencia de dos procesos de quenching, uno dinámico y otro estático. En este caso se puede emplear una forma modificada de la ecuación para realizar un ajuste de segundo grado. Sin embargo, en nuestro caso el uso de dicha ecuación no condujo a resultados lógicos, lo que lleva a concluir que la desviación de la linealidad observada, en línea con la desviación del ajuste en el modelo de pseudofase, no es debida a la naturaleza del quenching sino a la presencia de influencias adicionales en el mismo que impiden su uso para la determinación de las constantes de interacción buscadas. Es de señalar que la constante de interacción que se encuentra empleando el modelo de pseudofase es de $K = 1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, que corresponde a $\Delta G^0 = 52.5 \text{ kJ/mol}$; este valor superior de la constante de interacción al registrado por otros medios, junto con la clara desviación negativa de los puntos más concentrados del ajuste, son coherentes con la existencia de una contribución adicional al quenching. Dicha contribución puede ser de muchos tipos: en el caso de disoluciones conteniendo nanopartículas de oro en suspensión las más habituales son la absorción o dispersión de parte de la luz emitida durante el proceso de fluorescencia por las nanopartículas, causando que el detector no registre el total de luz emitida. De esta forma se crea un falso *quenching* que se suma al real, causando que el valor expresado por la constante no se deba únicamente a la formación de un complejo no emisor.

3.2.5. Conclusiones

Se ha realizado un estudio de los parámetros colorimétricos CIELab ligados al grado de agregación de suspensiones de nanopartículas de oro-citrato de 17.3 nm en presencia de biomoléculas de diferente naturaleza. El análisis de dichos

parámetros CIELab permite la determinación sencilla de las constantes de interacción AuNPs-biomolécula, incluso en los casos en que dichas biomoléculas no son coloreadas ni fluorescentes. La precisión de los ajustes realizados resulta satisfactoria, encontrándose un error máximo de menos del 10% en los valores de energía libre calculados para cada uno de los sistemas estudiados.

Debido a la naturaleza de las nanopartículas, cualquier proceso de agregación causa la aparición de un cambio de color; la cuantificación y análisis matemático de dicho cambio empleando parámetros colorimétricos permiten la determinación de las constantes de interacción AuNPs-biomolécula con la ventaja de no depender del grado de agregación del sistema ni de la naturaleza de las estructuras formadas. Es decir, es posible determinar la constante de interacción de un sistema independientemente de la posición o forma de la banda de absorbancia formada o del color final de la disolución. La obtención de los parámetros es simple y puede realizarse de forma automática con el empleo de un colorímetro, lo que resulta una ventaja adicional respecto al método de deconvolución que requiere el análisis matemático individualizado de cada uno de los espectros de absorbancia que componen una serie de disoluciones. Dichos métodos de deconvolución arrojan además valores de la constante de interacción comparables con aquellos procedentes de los valores CIELab, lo que corrobora la utilidad de los mismos.

Texto completo del artículo original disponible para consulta y descarga en <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/ra/2015/c5ra15119h#!divAbstract>

3.3. Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence

Autores: A. Jiménez-Ruiz, P. Perez-Tejeda, E. Grueso, P. Castillo*, R. Prado-Gotor*

Revista: Chemistry – A European Journal

Fecha de publicación: 2015

Volumen: 21

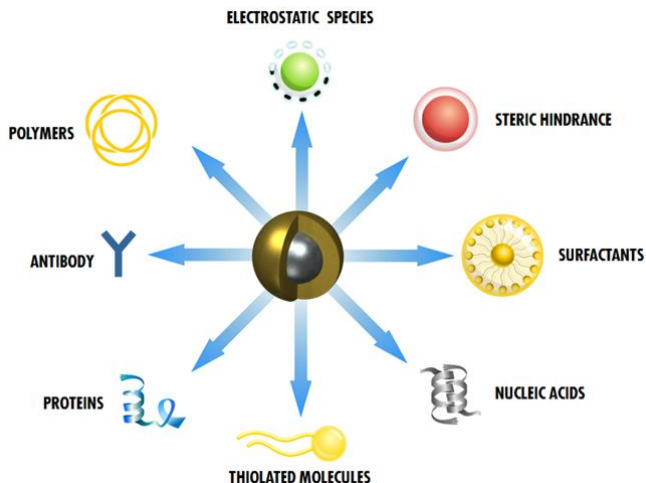
Páginas: 9596-9609

IF (JCR - 2014): 5.731

Cuartil (JCR - 2014): Primero

IF (SCIMago – 2014): 2.234

Cuartil (SCIMago – 2014): Primero



3.3.1. Resumen

En el presente artículo de revisión se realiza una exploración en profundidad de todos aquellos factores que pueden influir en el desarrollo y resultado de una síntesis de nanopartículas de oro, desde el pH o la temperatura hasta el agente estabilizante elegido. La importancia de estos factores radica principalmente en su influencia en la morfología final de las partículas, su tamaño, su forma y su

estabilidad, propiedades todas ellas que juegan un papel determinante a la hora de modular sus propiedades fisicoquímicas. Aunque el desarrollo y caracterización de nuevas rutas de síntesis de nanosistemas con propiedades específicas es un campo en constante expansión, no abundan los estudios donde se realice un seguimiento de los rasgos comunes de estas síntesis modelo. En este trabajo se ha aspirado a ofrecer una visión global del panorama actual de procedimientos de síntesis, con un foco especial en aquellas que se realizan en medio acuoso y sin funcionalización de las nanopartículas, y a ofrecer un catálogo breve de la influencia que tienen las condiciones de síntesis en la forma, reactividad y estabilidad de los nanosistemas.

3.3.2. Introducción

Las nanopartículas de oro son una herramienta prometedora en múltiples campos de la ciencia y la tecnología, con aplicaciones en campos tan dispares como los estudios medioambientales, la medicina, o el desarrollo de dispositivos electrónicos [68], [137]. Esta multidisciplinaridad se debe fundamentalmente a las excepcionales cualidades físicas y ópticas que presentan los nanosistemas[138]–[143]; cualidades que, a su vez, van ligadas íntimamente a los procesos de síntesis y modificación posterior a través de los cuales han sido obtenidos. Una de las propiedades más destacadas de las nanopartículas de metales nobles, entre ellas las de oro, es la presencia de la SPB [144]. Debido a la naturaleza de esta banda, cualquier cambio que afecte a la densidad electrónica de la nanopartícula, entre ellos la agregación, los cambios en la constante dieléctrica del medio o la interacción con ligandos o moléculas adsorbidas tendrá una influencia en la forma, anchura y posición de la SPB. Estos cambios pueden ser seguidos con la ayuda de un espectrofotómetro de absorbancia o, en algunos casos, incluso a simple vista y convierten a las nanopartículas en una herramienta extremadamente útil, hasta el punto de ser claves en el desarrollo de nuevas técnicas espectroscópicas como el SERS (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) [145], [146], el SEIR (*Infrared Increased Surface*) o la fluorescencia aumentada por superficie [147], [148].

La geometría de las partículas metálicas tiene un amplio grado de influencia en sus propiedades ópticas: específicamente, la distinción entre nanopartículas esféricas y no esféricas es de gran importancia debido al drástico cambio en sus propiedades ópticas que lleva aparejado. En el caso de las nanopartículas esféricas, la interacción uniforme de la radiación con los electrones externos del metal hace que aparezca

una única SPB. Sin embargo, en nanopartículas no esféricas, por ejemplo nanorods (de forma oval) existen dos ejes diferenciados, el longitudinal y el transversal, que dan lugar a dos frecuencias de resonancia diferentes y causan la aparición de una segunda SPB [69]. Esto hace además que sean capaces de absorber en la zona del infrarrojo cercano (NIR) lo que las hace claves en ciertas aplicaciones medioambientales y médicas; una de las más llamativas es su empleo en terapias anticancerígenas que emplean la luz IR absorbida por nanorods de determinadas características para la eliminación de células tumorales [143], [149].

Otro factor de importancia en la caracterización de nanopartículas es que sus propiedades no sólo dependen del núcleo metálico, aunque sea éste el principal factor modulador de sus propiedades ópticas; también existe una fuerte influencia de las moléculas, generalmente de carácter orgánico, que constituyen la monocapa responsable de la estabilización de las partículas en suspensión en nanopartículas no funcionalizadas, y de la modulación de sus interacciones en el caso de nanopartículas funcionalizadas. A lo largo del presente estudio se desarrollarán ambas influencias, la del metal y la del agente protector/funcionalizador, de forma concisa, a fin de proporcionar contexto a la influencia de los factores sintéticos en dichas propiedades.

Las nanopartículas en general son también de amplio uso en el campo de la catálisis [140], [150], [151]. La reactividad de las nanopartículas de oro a ciertos grupos funcionales comunes en la estructura de las biomoléculas abre un amplio campo de aplicaciones médicas, en aplicaciones que van desde sensores específicos de sustancias de interés al transporte de medicinas en el organismo humano [114], [139], [141], [152]–[155]. Es en el campo de la medicina donde las propiedades físicas de las nanopartículas juegan un interés vital, dado que modulan directamente su interacción con el cuerpo humano hasta el punto de ser la diferencia entre causar el efecto beneficioso buscado o perjudicar al paciente. En campos clínicos, por ejemplo, el diámetro de las nanopartículas se encuentra habitualmente restringido a entre 5 y 100 nm: nanopartículas mayores pueden causar oclusiones en el sistema cardiovascular, mientras que las menores son eliminadas por fagocitosis de forma natural sin alcanzar sus dianas terapéuticas [156]. Además del tamaño, en la toxicidad de las nanopartículas son claves su forma y el carácter iónico de su superficie [139]; por lo tanto, resulta claro que estos tres factores han de ser cuidadosamente monitorizados en toda síntesis que se realice con miras a una aplicación médica.

Fuera del campo de la medicina, múltiples aplicaciones de las nanopartículas de oro en la construcción de sensores se encuentran igualmente restringidas por el tamaño de las mismas: por ejemplo, sus propiedades como *quenchers* de fluorescencia mejoran cuando disminuye el tamaño de la nanopartícula y la distancia partícula-ligando [140], [157]. Por ello, se ha comprobado que el tamaño óptimo para estas aplicaciones se encuentra por debajo de 25 nm, y que la eficiencia del proceso de quenching disminuye marcadamente a tamaños superiores [157].

A la hora de abordar el diseño de una ruta de síntesis específica para un nanosistema, hay que tener en cuenta que el paso de disolución (de sales precursoras) a suspensión (de partículas) involucra necesariamente la existencia de un paso de precipitación de sólidos en disolución. Esta precipitación viene inducida por la aparición de condiciones de supersaturación como resultado de una reacción química, y es la razón de que factores como la velocidad de agitación, la temperatura o la velocidad y el orden de adición sean determinantes en la morfología del producto final. Además de los citados, otro factor de influencia en este paso de precipitación es la valencia de los contraiones en disolución, debido a la influencia de los mismos en la estabilidad de los coloides formados; se ha comprobado que la concentración de contraiones para inducir la floculación de un coloide de oro que presenta carga negativa es de 20 mmol/L para cationes monovalentes, 0.4 mmol/L para divalentes y del rango de 10^{-6} mmol/L en el caso de cationes trivalentes [158]. La precipitación de las sales que inicia el proceso de *nucleación* (formación de pequeños núcleos de oro de pocos átomos que crecen para generar nanopartículas) puede ser inducida por diversos métodos: reducción química, fotoreducción, oxidación, hidrólisis, etc. También es posible generar esta precipitación de los núcleos de oro mediante el control de parámetros que afectan a su solubilidad, como pueden ser el pH, la concentración o el orden de adición de los reactivos. La modulación de estos factores permite el control de la cinética de los procesos de nucleación y crecimiento y es, por tanto, clave a la hora de obtener una síntesis estable, monodispersa y del tamaño deseado [159], [160].

En el presente trabajo se realiza un análisis de todos aquellos factores que afectan no sólo a los procesos de formación de partículas, sino a su estabilidad final, con un énfasis especial en la influencia de los agentes reductores y estabilizantes, del pH y de la temperatura.

3.3.3. Agente reductor

3.3.3.1. Influencia de los procesos de reducción directa en los procedimientos de síntesis

La primera descripción histórica de los coloides de oro como tales fue realizada por Michael Faraday en 1857, en el contexto de su *Bakerian Lecture** “*Experimental Relations of Gold (and other metals) to Light*” [68]. Faraday consiguió coloides de oro estables mediante el empleo de fósforo para reducir sales de cloruro de oro y de sulfuro de carbono como agente estabilizante. Observó que las propiedades ópticas de las suspensiones de color rojo rubí que obtenía eran marcadamente diferentes tanto a las del oro metálico como a las de algunos estados inestables previamente obtenidos, de colores verde o violeta. Faraday ya observa en su clase la importancia de la relación fósforo/oro y de la adición controlada del sulfuro de carbono para la obtención de coloides rojos estables. Describe también que cuando se realiza la sustitución del fósforo por gas hidrógeno, el coloide resultante es de color azul intenso, cualidad que hoy se conoce como propia de las nanopartículas no esféricas. Otro efecto observado por Faraday es la influencia de la adición de sal en la coagulación de los coloides, también hoy bien conocida y estudiada. Hoy en día, algunas de las suspensiones sintetizadas por Faraday se encuentran en exposición en el laboratorio de Faraday, sede del museo del mismo nombre en la Royal Institution de Gran Bretaña [68], [137].

Las sales de oro empleadas como precursores no han experimentado cambios importantes desde los tiempos de Faraday; hoy en día, los precursores descritos para las síntesis son todavía mayoritariamente el ácido HAuCl_4 o sales como el KAuCl_4 . Por el contrario, el campo actual de los agentes reductores empleados es mucho más extenso, abarcando moléculas tan dispares como carbohidratos, aldehídos, alcoholes o diaminas; estas últimas son especialmente interesantes dado que además de su poder reductor, son capaces de actuar como agentes estabilizantes por impedimento estérico o repulsión electrostática, realizando de esta forma ambos papeles, el de reductor y el de protector.

Entre la multitud de síntesis descritas actualmente, destaca por su simplicidad la de

* Las Bakerian Lectures son clases magistrales cuya impartición constituye un premio y un reconocimiento otorgado anualmente por la Royal Society de Londres a un investigador destacado de un campo científico puntero.

Turkevich, hoy en día extensivamente en uso y fuente de numerosas variantes pese a datar del año 1954. Turkevich describe una síntesis en un único paso, mediante la adición de citrato trisódico a una disolución hirviendo y en agitación de sales de oro en medio acuoso. Tras unos minutos, se observa un cambio de color desde el inicial, gris oscuro, a rojo brillante, debido a la formación de los coloides de oro [161], [162].

Basándose en esta síntesis y en trabajos previos de Mie, Maxwell y otros investigadores, Turkevich y Enüstün realizaron un trabajo posterior sobre la estabilidad de los coloides obtenidos mediante su procedimiento de síntesis [163]. Asumieron, correctamente, que el citrato jugaba un doble papel, como agente reductor y como estabilizante, y estudiaron la variación observada en su potencial de estabilización cuando se añadían al medio electrolitos como el NaClO_4 . Calcularon la constante de Hamaker (A) y describieron la formación lenta de estructuras agregadas bidimensionales en presencia de bajas concentraciones de electrolitos, que pasaban a ser tridimensionales y a formarse mucho más rápido cuando la concentración de electrolito en el medio aumentaba. Estas observaciones dieron pie a la determinación del papel fundamental de la concentración de electrolitos en la doble capa eléctrica (EDL) de los coloides; a concentraciones bajas de electrolitos, la velocidad de formación de los agregados es lo bastante baja y la doble capa eléctrica es lo bastante grande como para mitigar la atracción interpartícula de los núcleos de oro y permitir la formación de agregados monodimensionales de oro bajo condiciones apropiadas. Turkevich y Enüstün determinan también la existencia de una concentración crítica de electrolito (W) que constituye el límite de estabilidad por encima del cual comienza la agregación. A potenciales atractivos altos, tanto la constante de Hamaker como la velocidad de agregación son altas, lo que limita la concentración de electrolito que puede añadirse al medio sin pérdida de estabilidad.

Más tardíamente (1985), Turkevich sería autor de un extenso artículo en el que define y analiza en profundidad los tres pasos básicos del mecanismo de formación de partículas coloidales a partir de suspensiones de sales; se incluía también un conjunto de datos experimentales originales conteniendo técnicas punteras, como la transmisión electrónica de alta resolución (HRTEM) que hicieron posible una de las primeras descripciones de las caras cristalinas de las partículas de oro [164]. En su artículo, Turkevich menciona dos aproximaciones habituales a la generación de coloides de oro: la desintegración de oro metálico mediante un arco eléctrico y la

reducción de las sales de oro en disolución mediante el empleo de métodos tanto físicos como químicos. Entre ellos, realiza una defensa de su ya publicado método de reducción por citrato, que permite la obtención de partículas de 20 nm, monodispersas y estables. La caracterización en profundidad de los coloides obtenidos mediante esta ruta de síntesis pone de manifiesto que ciertos parámetros como la temperatura, la concentración o la relación de concentraciones entre reactivos resultan claves para la obtención de coloides monodispersos, y que cualquier cambio no controlado de estas características tendía a resultar en un cambio en la distribución de tamaño de los coloides y en la pérdida de la monodispersidad. Basándose en estas observaciones, Turkevich propone un mecanismo de formación de los coloides a partir de sales en tres pasos fundamentales: *nucleación*, *crecimiento* y *coagulación*.

El paso de nucleación ya había sido explorado por Turkevich en un trabajo anterior (1951) que empleaba una ruta de síntesis a partir de sales de oro e hidrocloreuro de hidroxilamina con empleo de semillas (partículas de oro de muy pequeño tamaño) [161]. Las disoluciones de hidroxilamina y sales de oro permanecían estables sin mostrar reducción espontánea de las sales de oro; sin embargo, las semillas, al ser añadidas a la disolución, actuaban como catalizadores iniciando el proceso de reducción del oro. Mediante el control de las concentraciones iniciales de Au^{3+} y de las semillas añadidas, se podía controlar de forma sencilla el tamaño final de los coloides. Este efecto se expresó con una relación matemática:

$$D_f = D_n \left(\frac{Au_n + Au_g}{Au_n} \right)^{1/3} \quad (3.9)$$

donde D_f se refiere al diámetro final de la partícula; D_n al inicial; y Au_n y Au_g son las cantidades de oro presentes en las semillas y en el medio de reacción, respectivamente. Controlando estos parámetros, Turkevich y sus colaboradores describieron la síntesis controlada de coloides monodispersos entre 20 y 120 nm de diámetro.

Turkevich observó que la cinética de los procesos de nucleación quedaba descrita por una curva formada por tres pasos diferenciados: un periodo de inducción durante el cual prácticamente no había nucleación, un periodo de crecimiento autocatalizado y un periodo final de agotamiento en el que el proceso de formación de núcleos se detenía. Estas observaciones fueron interpretadas como que los procesos de nucleación no comenzaban inmediatamente después de la adición de

los reactivos, sino que venían precedidos de un paso previo de preparación. Durante esta primera etapa en que la nucleación es escasa o inexistente, se produce la polimerización de las sales de oro dando lugar a un polímero cuyo carácter orgánico o hidroxílico depende del pH. Cuando estos polímeros alcanzan un tamaño en que su energía superficial (de estabilización) es menor que la energía de red de la partícula resultante, se produce la reducción simultánea de todos los iones de oro del polímero para formar un núcleo de oro. El tamaño de estas primeras partículas fue estimado entre 1 y 2 nm por Uyeda y colaboradores, quienes identificaron además algunas estructuras cristalinas gemelas procedentes de núcleos de oro fusionados en el proceso de formación [165]. Como ya veía Turkevich, este primer paso de fusión de los núcleos de oro precede al crecimiento de las partículas; esto es debido a que el primer mecanismo de crecimiento no es la reducción directa de las sales de oro sobre la superficie de los núcleos formados, sino la coalescencia de varios núcleos para formar estructuras hasta un diámetro aproximado de 20 nm. Por encima de este diámetro, la adsorción de citrato en la superficie de las partículas empieza a impedir la aproximación de nuevos núcleos, y a partir de este punto, cualquier crecimiento adicional se debe a la reducción directa de las sales de oro sobre la superficie de las partículas.

El trabajo de Turkevich en el campo de la nanociencia resulta de importancia capital: no sólo por los procedimientos de síntesis a los que daría lugar, que son aún hoy en día referencia para el trabajo de laboratorio y para el desarrollo de nuevas rutas sintéticas; también por su trabajo de caracterización de la cinética y procesos de formación de partículas, que fue pieza fundamental en el desarrollo de la teoría de los tres pasos de formación de los coloides. Para dar cuenta de su importancia basta observar que las relaciones matemáticas desarrolladas por Turkevich hace más de 50 años se siguen empleando y son citadas por grupos de investigación punteros de todo el mundo.

El grupo de Chow realizaría una observación adicional a los procesos descritos por Turkevich en 1994, comprobando mediante diversas técnicas que en las condiciones descritas por el autor se produce un paso intermedio de reducción del tamaño de las nanopartículas por disociación de átomos de oro de su superficie; este proceso es la razón del cambio de violeta a rojo que puede observarse durante una síntesis por el procedimiento de Turkevich.

El procedimiento de obtención de nanopartículas de oro mediante reducción por citrato sódico es hoy en día uno de los más estudiados y empleados para todo tipo

de aplicaciones [166]–[169], en particular en el campo biomédico, donde se encuentran algunos ejemplos notables como la conjugación de partículas con anticuerpos [170] o su uso en la liberación controlada por la luz de NO [171]. La razón de esta importancia reside en la sencillez de uso de estas rutas para la obtención de partículas estables y de tamaño definido, con el añadido adicional de la escasa o nula toxicidad de los reactivos empleados.

Como ejemplo de una síntesis por citrato con funcionalización posterior, se puede citar la descrita por Kah para el anti-EGFR* [172] y basada en un trabajo previo por Hayat [152], donde se conseguía la síntesis de nanopartículas esféricas y monodispersas de 20 nm mediante el empleo de citrato sódico. En el mismo estudio se comprobó que la funcionalización de las nanopartículas con el anticuerpo provocaba un desplazamiento de la banda plasmon a longitudes de onda superiores a la inicial de 520 nm, que iba acompañado de una reducción de la intensidad de absorbancia de la banda. Ambos fenómenos se usaron como indicadores de que una funcionalización había tenido lugar.

Como se mencionó anteriormente, además del citrato existen una amplia variedad de agentes reductores apropiados para la síntesis de nanopartículas. Sau y Murphy emplean un conjunto de dos agentes reductores para obtener nanorods protegidos por CTAB (cloruro de cetiltrimetilamonio) [173]. Esta síntesis tiene lugar en tres pasos, y hace uso de una solución de semillas esféricas, preparadas previamente, y de una disolución stock. La preparación de las semillas se realiza empleando borhidruro sódico, NaBH_4 , como reductor fuerte sobre una disolución de CTAB y sales de oro, mientras que para la disolución stock se emplea ácido ascórbico añadido a una preparación previa de sales de oro y plata conteniendo también CTAB. La mezcla de las dos disoluciones conduce a la formación de nanopartículas elípticas, nanorods, de color azul intenso y cuyo crecimiento se detiene por adición de sulfuro de sodio cuando se ha alcanzado el tamaño deseado. Las medidas de microscopía electrónica, TEM, confirman que cuanto menor sea la concentración de semillas y mayor el tiempo de crecimiento, mayores nanorods se obtienen [174].

El procedimiento descrito anteriormente se apoya en una regla conocida: el empleo

* EGFR: *Epithelial Growth Factor Receptor*, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; receptor celular ligado a la regeneración celular, algunas de cuyas mutaciones pueden inducir crecimiento anómalo, resultando en diversos tipos de cáncer.

de sales de plata en cantidad mínima junto a las de oro en un proceso de síntesis enlentece la reducción del oro (debido al potencial de reducción de la plata, menos negativo que el del oro) causando que los nanorods obtenidos sean más homogéneos en tamaño y forma [169], [173], [175]. Estudiando un proceso de síntesis distinto, Xia y su grupo demostraron estas observaciones para nanopartículas esféricas mediante síntesis por citrato, comprobando que la adición de plata en cantidades traza mejoraba sensiblemente la esfericidad. Comprobaron también, de acuerdo con las observaciones de otros grupos anteriores, que mayores cantidades de citrato sódico añadidas a la disolución hacían que el coloide resultante presentase un menor tamaño medio de partícula.

3.3.3.2. El oro como catalizador – estrategias de crecimiento a partir de semillas

La influencia de las semillas de oro en la monodispersidad final de las síntesis en las que se emplean fue estudiada en profundidad por Natan y colaboradores, que realizaron un estudio comparativo en el que las características de una síntesis de nanopartículas de oro-citrato obtenidas por reducción directa con borhidruro sódico eran analizadas frente a las de otras dos síntesis empleando el mismo reductor y dos semillas diferentes, de 2.6 nm y 12 nm de diámetro [176]. Demostraron de esta forma que el empleo de semillas mejoraba sensiblemente la monodispersidad del coloide final, y que para un tamaño medio final idéntico, la monodispersidad de la síntesis que partía de las semillas de mayor tamaño era mucho mejor. Este hecho se atribuyó a que las semillas de 12 nm presentaban a su vez una polidispersidad menor que las de 2.6 nm. El mismo estudio realizaba un perfeccionamiento de un procedimiento anterior, a su vez basado en las observaciones de Turkevich sobre el crecimiento por semillas: se llevaron a cabo una serie de síntesis empleando hidroxilamina (NH_2OH) como reductor a temperatura ambiente. En ausencia de semillas, la hidroxilamina no reduce las sales de oro en disolución; sin embargo, la adición de núcleos de oro hace que la reducción de las sales empiece inmediatamente hasta que las sales de oro se consumen por completo. Este cambio conlleva la aparición y crecimiento de la banda SPB asociada a las partículas en formación, que a su vez permite comprobar el desarrollo del proceso con facilidad. Esta ruta sintética permite un control sencillo del tamaño final de la síntesis, ya que sucesivas adiciones de sal de oro hacen que las partículas formadas sigan creciendo, de tal forma que controlando el número de adiciones es posible llegar a un tamaño final exacto. Las síntesis desarrolladas por Natan demostraron que es posible aplicar este sistema a la

obtención de nanopartículas entre 13 y 115 nm, consiguiéndose coloides con una monodispersidad excelente. Curiosamente, en algunas de las síntesis desarrolladas por el mismo proceso se observó la formación de una pequeña fracción de nanopartículas alargadas, con un eje mayor entre 90 y 200 nm; el análisis cristalino de estos nanorods determinó que no se trataba de partículas procedentes de la fusión de dos o más esferas, y que además no existían estructuras intermedias entre rods y esferas. Por ello, se determinó que estos nanorods constituían una estructura secundaria, formada durante el mismo proceso, pero independiente.

Otra visión sobre la influencia de la concentración de semillas, el agente reductor, la fuerza iónica y la velocidad de adición sobre el resultado final de una síntesis procede de un trabajo del grupo de Murphy [177]. En él, se emplearon semillas de 12 nm, trabajando en condiciones de concentraciones de átomos de oro constantes (entendida como la suma de las concentraciones de los átomos en las partículas más los que se añadían mediante la adición de sales de oro), usando ácido ascórbico como agente reductor, y bajo tres condiciones distintas de adición de semillas: adición rápida, adición lenta y adición por alícuotas. Para la adición lenta y por alícuotas no se observaron diferencias apreciables; se comprobó que el tamaño final del coloide venía determinado por la relación de concentraciones semillas/sal de oro, con las disoluciones de mayor concentración de semillas dando lugar a los coloides de mayor tamaño final. La adición rápida daba lugar a coloides cuyo tamaño final era independiente del tamaño de las semillas empleadas, llegando incluso a observarse que para algunas relaciones semillas/sal el producto presentaba un diámetro medio menor que el de las semillas de partida.

Para entender las causas de estas observaciones, es preciso tener en cuenta que el ácido ascórbico, de forma análoga a la hidroxilamina, es un reductor suave que no reduce las sales de oro de forma espontánea; la adición de semillas cataliza el proceso al facilitar la transferencia electrónica del ascórbico al oro. Una adición lenta de semillas favorece que las sales de oro se reduzcan sobre los núcleos ya existentes, es decir, el crecimiento sobre la nucleación; una adición rápida causa un súbito aumento del número de núcleos en disolución, haciendo que éstos crezcan hasta tamaños menores que en el caso anterior, es decir, se favorece la nucleación sobre el crecimiento.

Se exploraron además diversos agentes reductores usando la metodología de adición rápida de las semillas. Para el citrato sódico, se obtuvieron en ambos casos partículas inestables de menor tamaño que las semillas iniciales, entre 2 y 10 nm.

Para la hidracina, estabilizada con SDS, se comprobó que el tamaño medio era de entre 2 y 5 nm en presencia de semillas y de entre 5 y 10 nm en ausencia, demostrando que el aumento de la velocidad de los procesos de nucleación observados con el ácido ascórbico también se da con la hidracina. En el caso del borhidruro sódico, el empleo de semillas dio lugar a coloides de mayor tamaño que aquellos formados en su ausencia, lo que evidencia que en ambos casos se encuentra favorecido el crecimiento sobre la nucleación.

La influencia de la fuerza iónica del medio en la formación de nanopartículas se exploró empleando concentraciones variables de NaCl en el medio de reacción. Para la adición rápida no se observaron cambios en el producto final respecto de aquellos obtenidos en ausencia de sal; sin embargo, en el caso de las adiciones lenta y por etapas se observó la formación de nanopartículas no esféricas, alargadas y con facetas. Para eliminar estas formaciones irregulares, se añadió una cantidad traza de AgCl en ausencia de reactivos que indujesen la formación de rods; como se vio anteriormente, las sales de plata inducen la formación de nanopartículas no esféricas en presencia de tensioactivos como el CTAB. Sin embargo, su adición en una proporción de 1:50 respecto al oro y en ausencia de reactivos adicionales hizo que la proporción de rods formados fuese mínima. Se atribuyó este efecto a la formación de pequeños cristales de sal de plata que pueden actuar como núcleos favoreciendo la formación de partículas esféricas de oro. Se comprobó además que no aparecían partículas de plata en la suspensión.

Ese mismo año, el grupo de Murphy publicó también un segundo trabajo en el cual se describía una estrategia de síntesis sencilla, consistente en hacer crecer partículas de oro por adición controlada de sales a partir de semillas de oro-citrato de 3.5 nm [178]. Se empleó para ello una “disolución de crecimiento” conteniendo HAuCl_4 y CTAB y la adición de ácido ascórbico como reductor débil; este último se eligió, de nuevo, por su incapacidad de reducir las sales de oro de forma espontánea, lo que aseguraba que no había formación incontrolada de partículas de oro en el medio. A concentraciones variables de semillas se obtuvieron dos síntesis de diámetros 5.5 nm y 8 nm, empleándose el segundo a su vez como semillas para una segunda etapa de crecimiento. Esta segunda etapa dio lugar a partículas esféricas de 17 nm. Una tercera etapa empleando a su vez como semillas las partículas obtenidas en la segunda dio lugar a una síntesis de 37.5 nm, esférica, conteniendo además algunos rods de dimensiones aproximadas 200×17 nm. Posteriormente a cada una de las síntesis, se empleó un procedimiento de extracción en tolueno para proteger las

nanopartículas con dodecanotiol. Se comprobó que todas las suspensiones estables presentaban una polidispersidad menor al 15% y que la concordancia con las ecuaciones de Turkevich era muy buena, lo que sugiere que no se produce nucleación adicional por adición de semillas (no predicha por Turkevich y que, por tanto, debería producir una desviación de los resultados experimentales frente a la predicción teórica) empleando esta ruta sintética. Por tanto, el procedimiento descrito por Murphy constituye una forma simple y directa de control efectivo del tamaño final del coloide obtenido, que resulta mucho más modulable que la mayoría de procedimientos clásicos de síntesis.

En el campo de las nanopartículas no esféricas, varios autores han estudiado el crecimiento de formas complejas, como pirámides o estrellas, empleando combinaciones variables de concentraciones de semillas de oro y tensioactivos [179], [180]. Takenaka y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el cual el crecimiento de nanorods, frente a su formación, se veía favorecido a altas concentraciones de HTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) debido a una disminución de los iones de oro libres en la disolución [181]. El tensioactivo podía luego eliminarse, como en otros estudios, por tratamiento con tioles, que frenan el crecimiento y añaden grupos funcionales $-\text{COOH}$ libres que pueden ser empleados posteriormente para funcionalizar las nanopartículas si se desea [182].

En el caso de nanopartículas de otros metales que presenten potenciales redox muy negativos, es generalmente necesario el empleo de reductores fuertes como el gas hidrógeno [183], la hidracina (N_2H_4) o compuestos de tipo ABH_4 , como el borhidruro sódico [184], que se mencionó anteriormente. Este último es un reductor de uso muy común en síntesis tanto acuosas como en medio orgánico, que en el caso del oro proporciona una reducción rápida y tiende a dar partículas de pequeño tamaño.

Un buen ejemplo de un procedimiento de síntesis de nanopartículas de oro que se lleva a cabo empleando borhidruro sódico es el método de Brust-Schiffrin, que da como resultado nanopartículas de oro de pequeño diámetro protegidas por dodecanotiol. En este caso, la reducción tiene lugar en tolueno y empleando TOAB (bromuro de tetraoctilamonio) como agente estabilizante y como reductor [185]. De esta forma, se obtienen nanopartículas esféricas, protegidas por tiol y de diámetros entre 1 y 3 nm.

Brust describe de forma extensa y completa un procedimiento de síntesis industrial

de nanopartículas empleando alcanotioles, borhidruro sódico y DTAB. El resultado de las rutas de síntesis de estas características, describen, se encuentra influenciado tanto por el orden de adición de los reactivos como por la naturaleza de las semillas, siendo por tanto dos de los factores que se pretende controlar y modular en este procedimiento experimental. Para ello, se prepararon semillas mediante la mezcla de sales de oro disueltas en agua con DTAB en tolueno; al mezclar se observó que la fase acuosa, que era eliminada, perdía el color y quedaba transparente, indicando que las sales de oro habían pasado a la fase orgánica. A partir de este punto se exploraron dos procedimientos que seguían órdenes de adición distintos para la generación de semillas. El Procedimiento I empleaba dodecanotiol seguido de borhidruro sódico, y daba como resultado semillas monocristalinas de 1.5 nm de diámetro. El procedimiento II invertía el orden: se añadía primeramente el borhidruro y se dejaba proceder la reducción de las sales de oro durante tres horas, antes de añadir el dodecanotiol. En este caso, se obtuvieron semillas de 3.5 nm con signos de coalescencia, que presentaban por ejemplo facetas gemelas. Ambos conjuntos se sometieron a un proceso de *annealing* (“recocido”) consistente en eliminar el tolueno por calentamiento a 463 K, que da como resultado un precipitado de color negro en una matriz de color naranja formada por DTAB fundido y restos de otras sales procedentes de la síntesis. Tras este procedimiento, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se resuspendieron en tolueno. Se comprobó que las semillas de 1,5 nm de diámetro daban lugar a una distribución de nanopartículas bimodal con dos máximos en 25 y 35 nm, mientras que las de 3.5 nm daban una distribución unimodal con un máximo en 5.8 nm. Curiosamente, la mezcla de partículas de ambos tipos daba como resultado una distribución muy similar a aquella obtenida para las semillas mayores (5.3 a 8 nm) donde no se formaron nanopartículas de tamaño grande.

La diferencia en comportamiento de las semillas de distinto diámetro observada por Brust es atribuida a las propiedades físicas de las propias partículas. El punto de fusión de las mismas es de 500 K para las más pequeñas, y 900 K para las mayores. Al calentar a 463 K para eliminar el tolueno se produce la fusión de los núcleos más pequeños, que recristalizan lentamente al enfriar y dan lugar a nanopartículas de gran tamaño irregulares. Las partículas de 3.5 nm no se funden, y su crecimiento, en ausencia de sales de oro añadidas, se debe a procesos de migración de átomos de oro entre partículas. En el caso de la mezcla, las partículas de 3.5 nm actúan como núcleos dirigiendo el crecimiento de nuevas partículas a partir del oro procedente de la fusión de las partículas de 1.5 nm, siendo esta la

razón por la que aparecen partículas de mayor tamaño que en ausencia de las segundas, pero mucho más pequeñas que las obtenidas cuando no existen núcleos en el medio. De esta forma, se puede conseguir la síntesis de tipo industrial, controlable y monodispersa de nanopartículas protegidas por tioles de aproximadamente 5 nm.

Basándose en el trabajo de Brust, la síntesis de Martin emplea también borhidruro sódico como agente reductor del oro, pero se lleva a cabo en medio acuoso y en ausencia de estabilizantes. Esto hace que sea preciso estabilizar previamente el HAuCl_4 en HCl durante tres semanas, y el borhidruro sódico en NaOH durante tres meses. Se trata por ello de un procedimiento muy lento, que da lugar a partículas estables entre 3 y 5 nm [186]. Existen otras variantes del método de Brust que emplean fosfinas, aminas, o ligandos de tipo carboxílico [66]; también es posible emplear otros disolventes orgánicos, como la dimetilformamida (DFM) o la formamida, que hacen un papel análogo al TOAB en la síntesis de Brust al actuar como agentes reductores [187].

3.3.3.2.1. Relación Oro/agente reductor

El cociente entre las concentraciones de oro y del agente reductor empleado en una síntesis es determinante en muchos casos en las características del producto final, incluso más que sus concentraciones absolutas [168]. Frens observa ya en un trabajo temprano (1973) que la relación entre citrato y sales de oro es clave en el tamaño final de la síntesis obtenida [188]; esto es debido a que los agentes reductores que actúan además como protectores tienen tendencia a adsorberse en la superficie de las partículas, formando la capa protectora que impide la agregación del coloide, pero que a su vez dificulta enormemente el crecimiento por coalescencia de varias partículas. De esta forma, cuanto menor es la concentración de citrato, mayor el tamaño de partícula obtenido.

Kimling va un paso más allá, definiendo las condiciones para la obtención de la mejor distribución de tamaños posible en el caso de la síntesis clásica de oro-citrato. Según sus estudios, es preciso trabajar a una temperatura de 100°C o lo más cercana posible (puede ser necesario trabajar a temperatura ligeramente inferior para minimizar también las pérdidas de disolvente por evaporación, en el caso del agua) y a concentraciones de oro menores de 0.8 mM; concentraciones mayores causan un crecimiento del tamaño de las partículas, que inestabiliza las suspensiones. Se establecía de esta forma un límite superior de concentración de las sales de oro de entre 1 y 2 mM para obtener suspensiones estables durante un mes o más.

3.3.4. Influencia del agente estabilizante

La adición de un agente estabilizante o protector (*capping agent*) a una síntesis de nanopartículas tiene como objetivo mejorar su estabilidad, evitando la agregación y precipitación del coloide. Esto se puede conseguir por dos vías principales, no necesariamente independientes: por repulsión electrostática (reactivos cargados positiva o negativamente) o por impedimento estérico (moléculas voluminosas que entorpezcan la aproximación de los núcleos). Su incorporación a la síntesis se puede dar en dos momentos, durante la misma o a posteriori; esta última vía requiere bien de un periodo de incubación del sistema con el agente en disolución o bien de una reacción química que lo una a los grupos funcionales que ya están incorporados a la superficie de la partícula, procedentes de la propia síntesis.

En el caso de las síntesis de tipo Turkevich, que emplean citrato sódico, éste actúa tanto como reductor como de agente protector, lo que explica la simplicidad del proceso, ya que no es necesario añadir un segundo compuesto estabilizante; las nanopartículas se forman y son protegidas por el citrato de forma simultánea [161], [168]. Este proceso es un ejemplo de protección por repulsión electrostática pura, ejercida por una molécula de pequeño tamaño pero con alta carga negativa. De hecho, el papel del citrato en este tipo de síntesis es triple, dado que actúa también como modulador del pH del medio [167]. En la misma vía, se pueden citar otros agentes como la L-lisina, también de pequeño tamaño y de carga dependiente del pH del medio; aunque no es un agente reductor, se puede emplear como protector por adición durante el propio proceso en síntesis donde se emplea como reductor el NaBH_4 , que no tiene propiedades estabilizantes [189].

Los tensioactivos como el CTAB, empleado comúnmente en la generación de nanorods, también presentan un papel doble [173], aunque en este caso no son reductores sino los agentes responsables de la forma no esférica de las partículas. Los mecanismos del crecimiento de partículas alargadas no están completamente definidos en la actualidad, pero su influencia se ha explicado por la tendencia del tensioactivo a adsorberse en caras cristalinas con una orientación determinada. Su adsorción en esas caras bloquea el crecimiento normal de la partícula, que crece entonces en las orientaciones no obstruidas, dando lugar a partículas de forma oval, alargada o acicular dependiendo de las concentraciones relativas y los tiempos de reacción [70], [179], [190]. En cualquiera de los casos anteriores, el propio tensioactivo se adsorbe en la superficie de la partícula durante el proceso, de

forma que si no se añade ningún otro agente estabilizante, se consigue una estabilización por el CTAB adsorbido que en este caso es de naturaleza estérica. Es posible usar tensioactivos como estabilizantes también en síntesis que dan lugar a partículas esféricas, simplemente controlando las condiciones de reacción; dos ejemplos claros anteriores son la síntesis de Murphy (semillas protegidas por CTAB se emplean para hacer crecer, mediante adición en etapas, partículas esféricas sin que se observe la aparición de rods para síntesis menores de 17 nm) y la de Brust (de nuevo, semillas protegidas por tensioactivo, en este caso DTAB, se hacen crecer hasta partículas esféricas protegidas por dodecanotiol) [191].

Otro tipo de agentes que pueden cumplir una doble función análoga a la del citrato sódico, pero donde la protección es de tipo estérico y no electrostático son polímeros de gran tamaño como el PVP (poli-(N-vinilpirrolidona)) o el BPEI (polietilenimina ramificada) [192]–[194]. Algunos, como el PEG (polietilenglicol) cumplen la función adicional de añadir grupos que se pueden emplear para una funcionalización posterior de la partícula [146], mientras que otros como el PDMA (poli[(2-dimetilamino)etilmecrilato]) o el PEO (polióxido de etileno) pueden ser usados para regular el tamaño de la síntesis final, habiéndose observado que a mayor tamaño de estos polímeros, menor tamaño de partícula se obtiene [195]–[197].

Este mismo efecto es común a otro agente reductor-estabilizante por impedimento estérico de naturaleza similar, el quitosano, un polisacárido natural [59]. De nuevo, cuanto mayor es la concentración de quitosano en una síntesis, menores partículas se obtienen.

En el campo de los agentes estabilizantes por impedimento estérico es interesante citar también la BSA (seroalbúmina bovina) una proteína que se adsorbe muy fácilmente en la superficie de las partículas [198], y los tioles, de los que un ejemplo clásico es la tiopronina (N-(2-mercaptopropionil)glicina); estos últimos, según su naturaleza, pueden ser reductores o no serlo, y pueden contener o no grupos cargados que contribuyan a la estabilización del coloide añadiendo una componente electrostática a la protección estérica. Son también una buena vía de adición de grupos funcionalizables en la superficie de las nanopartículas [199], [200].

Como colofón a este breve repaso, es interesante citar una síntesis de nanopartículas que hace uso de fibras de polímero conductoras, polianilinas, como

agentes reductores; estas síntesis han mostrado un gran potencial que puede ser explotado en el campo de la fabricación de dispositivos de almacenamiento de información. Esta síntesis fue fruto de un estudio desarrollado por el grupo de Kaner, determinándose en el proceso que los mejores resultados de conductividad se obtienen cuando se emplea una alta densidad de nanopartículas de pequeño tamaño [201].

3.3.5. Influencia del pH

El pH del medio de una síntesis es quizá uno de los factores más desconocidos tradicionalmente a la hora de hablar de su influencia en el resultado de la misma. Sin embargo, que esta influencia existe se conoce casi desde el principio: el propio Turkevich apunta, al hablar del paso de nucleación de las nanopartículas de oro, que la naturaleza del polímero de sales de oro previo a la reducción cambia cuando ésta tiene lugar a pH elevados, formándose polímeros hidroxilados [164]. La influencia del pH del medio en una síntesis es de hecho importante, aunque no se trate de un factor tan intuitivo como pueden ser los agentes reductor y protector.

Uno de los estudios más relevantes sobre la influencia del pH en el medio de reacción ha sido llevado a cabo recientemente (1999) por Goia [202], empleando una reacción modelo (reducción por ácido ascórbico, estabilización por goma arábica, un polímero de gran tamaño) llevada a cabo empleando valores de pH comprendidos entre -1.25 y 12.9. De esta forma, se obtenían coloides de oro de gran tamaño, entre 90 y 4600 nm de diámetro, formados por coagulación de partículas pequeñas de entre 16 y 29 nm; los coloides mayores aparecían a los valores de pH más bajos. Para explicar este fenómeno, se identificaron seis complejos diferentes posibles entre el oro y el medio de reacción, siendo el complejo mayoritario a pH neutro el AuCl_4^- procedente de la disociación de la sal de oro. A pH mayores, se formaban complejos en los que los iones cloruro eran sustituidos por OH^- , y a pH menores, se formaban complejos HCl-sal de oro. La variación entre la diferencia de potencial de estos complejos y el ácido ascórbico (expresada como ΔE) se citaba como la causa de la oscilación del tamaño de partícula inicial; sin embargo, el pequeño valor de ΔE dejaba claro que no podía ser la causa de la elevada disparidad de tamaños finales de los coloides. Éste segundo efecto se aclaró tras un análisis de los potenciales zeta de las partículas, comprobándose que se encontraban alrededor de -30mV para valores de pH superiores a 4, pero que

crecían drásticamente hasta aproximarse al 0 a valores menores. Se averiguó además que debido a la generación de iones Cl^- libres por la reducción de las sales a oro metálico, el pH de todas las suspensiones de nanopartículas (menos una, donde el complejo de oro generado era $\text{Au}(\text{OH})_4^-$) era más elevado que el de las disoluciones de partida, situándose en valores ácidos. De esta forma, la reducción de la carga superficial de las partículas, reflejada en los valores de potencial zeta y causada por la acidificación del medio de reacción, era la causa de la coagulación de las mismas hasta formar coloides de tamaño micrométrico. En aquellas disoluciones donde el pH era más elevado, la repulsión electrostática dificultaba la coagulación, dando lugar a partículas de menor tamaño.

Otro trabajo importante sobre la influencia del pH en la síntesis de nanopartículas fue desarrollado por Patungwasa y colaboradores, también recientemente [203]. De forma coherente con las observaciones de Goia, comprobaron empleando una síntesis de nanopartículas protegidas por citrato que los mayores tamaños de partícula aparecían a los menores pH de trabajo. De esta forma, valores de pH por debajo de 5 daban lugar a partículas grandes, formadas por deposición lenta y presentando facetas y formas poliédricas. Para valores entre 5 y 6, se observó la formación de partículas de menor tamaño, con presencia de formas esféricas pero también elipsoidales e irregulares en general. Finalmente, pHs entre 6 y 8 causaban síntesis esféricas con una distribución de tamaños estrecha, coherentes con las obtenidas mediante el método de Turkevich tradicional (cuyo pH, por la acción del citrato, es muy ligeramente ácido). La explicación se atribuye, de nuevo, a los complejos hidroxílicos y clorados que se forman, cuantificándose la variación de potencial de reducción de la sal en -59mV por unidad de pH, y citándose también el efecto de la concentración de citrato y su carga en la repulsiones interpartícula como factor dependiente del pH y determinante de la estabilidad y morfología de los coloides. Muangnapoh expandiría posteriormente estas investigaciones comprobando la dependencia del potencial zeta de las partículas de oro-citrato con el pH del medio de síntesis; se encontraron valores entre -60 y -40mV para coloides estables entre pH 5 y pH 9, y que estos valores subían por debajo de pH 5, lo que causaba inestabilización del coloide y pérdida de intensidad de la banda plasmon [204].

Finalmente, se citan dos ejemplos breves de la influencia del pH como modulador del resultado y utilidad de los coloides de oro. El primero, un trabajo desarrollado por el grupo de Duan, sintetizaba partículas de distinto tamaño bajo condiciones de

pH variable y estudiaba su influencia en la capacidad de *quenching* de una reacción fotoluminiscente de las mismas; de esta forma, comprobaron que nanopartículas de diámetro menor a 5 nm disminuían la intensidad de fluorescencia de la reacción, mientras que aquellas de tamaño mayor a 10 nm, pero menor a 25 nm causaban un aumento de la emisión al catalizar la reacción luminiscente [140].

El segundo estudio hacía uso de nanopartículas de TiO₂ recubiertas de oro por deposición-precipitación como catalizadores para la oxidación del CO. En este caso, se emplearon nanopartículas de sílice comerciales añadidas a una disolución de H₂AuCl₄ trabajando a dos pH distintos, 8.5 y 6. Se comprobó de esta forma que las nanopartículas obtenidas a un pH de trabajo más alto, de menor diámetro (2 nm) presentaban una mayor eficacia catalítica que las obtenidas a pH 6, que eran mayores (10 nm), un efecto habitual en catálisis que puede ser atribuido a la mayor área superficial de las partículas más pequeñas [205].

3.3.6. Otros factores

3.3.6.1. Temperatura

La temperatura es probablemente el factor de mayor influencia en una síntesis de nanopartículas. Existen muchas rutas de síntesis que emplean la temperatura como elemento modulador, pero incluso en aquellas donde no lo es, su control es una parte importante del proceso, dado que cambios bruscos de temperatura pueden causar problemas de reproducibilidad y estabilidad de las suspensiones. La fuente de calor empleada en los procesos de síntesis puede ser variada; la más común es el calentamiento simple, pero es posible emplear medios alternativos como la irradiación ultravioleta [168], gamma [206] o por láser [207].

En general, una reducción de nanopartículas ayudada por calentamiento, como es el caso de las síntesis clásicas de oro-citrato, se verá fuertemente influida por éste. Temperaturas más bajas de reacción, unidas a los gradientes de temperatura que aparecen en algunos sistemas, causan que el tamaño y la forma de las partículas obtenidas se puedan volver irregulares. En este sentido, el propio Turkevich realiza un estudio de la influencia de la temperatura en coloides de oro-citrato basándose en un estudio previo de Hauser y Lynn [208], donde se concluye que en estos sistemas una temperatura de reacción más baja causa que el tamaño final de la síntesis sea mayor y la velocidad de reacción menor [161]. Una posible forma de

controlar estos cambios es variar el pH del medio; hasta la fecha se han conseguido síntesis de oro-citrato esféricas y monodispersas empleando temperaturas de incluso 25°C (la original requiere aproximadamente 100°C), ayudándose de hidróxido sódico para bajar el pH del medio [209].

El grupo de Klabunde describe una síntesis a escala industrial donde se emplean como agentes estabilizantes tioles complejos (3-mercapto-1-propanosulfato sódico, la sal sódica del ácido 1-mercapto-3-tetrazolacético y el 3-mercapto-1,2-propanodiol). El procedimiento se conoce como de dispersión de átomos metálicos (Solvated Metal Atom Dispersion, SMAD) [210]. Durante la síntesis se produce la vaporización de oro metálico y acetona en recipientes individuales bajo condiciones de vacío, e independientemente, en el mismo sistema, se añade una solución del tiol elegido en agua, que no se vaporiza. Los vapores se depositan posteriormente en una cámara enfriada a 77 K con nitrógeno líquido de forma que quedan congelados en la pared; al retirar el nitrógeno, la acetona se va derritiendo poco a poco arrastrando al oro y cayendo sobre la solución acuosa, lo que da lugar a la formación de nanopartículas. Finalmente, se evapora la acetona bajo condiciones de vacío suave. De esta forma, se obtuvieron nanopartículas de 4.2 nm de diámetro medio empleando 3-mercapto-1-propanosulfato sódico, de 3.4 nm con la sal sódica del ácido 1-mercapto-3-tetrazolacético y de 6.6 nm con el 3-mercapto-1,2-propanodiol.

Los coloides terminados son sometidos a un proceso de maduración digestiva (*Ostwald ripening*) consistente en calentar las suspensiones obtenidas a reflujos durante 90 minutos. Los dos primeros coloides, cuyos ligandos tienen naturaleza iónica, se desestabilizan mientras que en el caso del tercero se observa un crecimiento de la banda plasmon y un cambio de color de marrón a violeta. Este proceso se atribuyó a un cambio del tamaño de los coloides sometidos a la maduración, que mejoraba sensiblemente tanto su tamaño de partícula como su polidispersidad.

En un trabajo anterior, el propio Klabunde proponía un proceso de síntesis industrial similar, pero empleando como disolvente el tolueno y como agente protector el dodecanotiol. En este trabajo, tras la evaporación de la acetona se observó un cambio drástico en el tamaño de los coloides, que pasaron de ser polidispersos, entre 5 y 40 nm a medir entre 1 y 6 nm de diámetro; este cambio se justificó por un posible proceso de sustitución de las moléculas de acetona unidas a la superficie del oro en la suspensión por dodecanotiol al evaporarse la primera; se

comprobó además que las variaciones en la longitud de la cadena tiolada no causaban cambios apreciables en la morfología de los productos finales. Sin embargo, los resultados mejoraron notablemente al emplear el proceso de maduración digestiva, que convirtió el coloide final en una suspensión monodispersa de 4 nm de diámetro medio.

En cuanto a los medios de síntesis que emplean la ablación láser de oro metálico, su polidispersidad tiende a ser mayor que la que se observa en síntesis que emplean otros procedimientos de calentamiento. El empleo de tensioactivos como el SDS tiende tanto a mejorar la estabilidad como a reducir la polidispersidad de las suspensiones resultantes [211].

Para cerrar esta breve exposición de la influencia de la temperatura en la síntesis de coloides de oro, es interesante citar brevemente los métodos de síntesis que se realizan a temperatura ambiente. Por ejemplo, existen precedentes del empleo de descargas de plasma sobre soluciones de oro, generándose nanopartículas sin necesidad de añadir ningún agente reductor [212]. Reductores-estabilizantes como el ácido tánico generan a su vez nanopartículas en disoluciones a temperatura ambiente, habiéndose conseguido síntesis de entre 2 y 10 nm mediante rutas de este tipo [213], [214]. Otro método notable emplea soluciones de líquidos iónicos, como el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazol, por un método de deposición a temperatura ambiente que genera nanopartículas de 2 nm, estables y fotoluminiscentes [215].

3.3.6.2. Agitación y orden de adición

Como ya se ha desarrollado a lo largo de este estudio, tanto la nucleación rápida como una velocidad de crecimiento lenta favorecen la monodispersidad de los coloides. Es por tanto lógico ligar tanto la velocidad como la forma de agitación (magnética, mecánica o incluso de distinta naturaleza) al resultado final de una síntesis; la falta de control apropiado de estos parámetros puede llegar a impedir la obtención de coloides estables y causar problemas de reproducibilidad de tamaños y formas de partícula durante repeticiones del mismo proceso.

La influencia del orden de adición de los reactivos se ha desarrollado en apartados anteriores. Como ejemplo, se puede citar la influencia del orden en la síntesis clásica de Turkevich: al comparar el proceso clásico, que añadía citrato a una disolución de oro caliente, con el inverso (disoluciones de sal de oro sobre citrato calentado) se demostró que la velocidad de oxidación era mayor en la segunda vía.

Esto causaba que las síntesis obtenidas tuvieran una distribución de tamaños mucho más estrecha, mejorando la monodispersidad [216]. Los estudios de Brust, ya desarrollados con anterioridad, demostraron que la influencia del orden de adición no se restringe a los métodos clásicos, sino que es un factor a tener en cuenta en el diseño y mejora de cualquier ruta sintética, con independencia de los reactivos, métodos y disolventes empleados.

3.3.7. Conclusiones y perspectivas

Debido a sus notables características ópticas, el estudio de la síntesis de nanopartículas de oro ha sido un campo de gran interés en los últimos años. Existen dos razones principales para ello: una es la presencia de la característica banda de absorbancia responsable del intenso color rojo de las nanopartículas y que puede ser empleada tanto para el control de los métodos de síntesis como para la caracterización de los productos finales. La segunda razón tiene que véase con la sencillez de funcionalización de las partículas de oro, dado que muchas biomoléculas comunes, como los tioles (tanto simples como complejos) o los ácidos carboxílicos reaccionan notablemente bien con la superficie de las partículas de oro, permitiendo su funcionalización por simple incubación.

	Año	Agente reductor	Agente estabilizante	Método	Diámetro (nm)	Forma
Faraday [68]	1857	Fósforo	Sulfuro de carbono	Reducción	Rojo rubí	(probablemente esféricas)
		H ₂			Azul	
Turkevich [161]	1951	Citrato sódico		Reducción térmica en monofase	20	Esféricas
			Cloruro de hidroxilamina	Semillas a TA	20-120	Esféricas
Frens [188]	1973	Citrato sódico		Reducción térmica en monofase	16-150	Esféricas
Brust-Schiffirin [185]	1994	NaBH ₄	TOAB/dodecanotiol	Bifase agua/tolueno con tiol	1-3	Esféricas

Goia[202]	1999	Ácido ascórbico	Goma arábica	Reducción a TA	90-4600	Esféricas
Natan [217]	2000	Citrato sódico		Semillas a TA	20-100	Esféricas
		NH ₂ OH		Semillas a TA (método iterativo)	12,7x11,7-116x112 (Esferas) 13,7x11,2-233,6x74,2 (Rods)	Esféricas Rods
Jana y Murphy [177]	2001	Ácido ascórbico		Reducción a TA	22	Esféricas
		Ácido ascórbico		Semillas	20	Esféricas
		NaBH ₄	Citrato	Reducción	3-4	Esféricas
		NaBH ₄	SDS	Semillas	5-30	Esféricas
		Hidracina	SDS	Reducción	5-10	Esféricas
		Hidracina	SDS	Semillas	2-5	Esféricas
Jana y Murphy [178]	2001	Citrato	CTAB	Semillas (método iterativo)	37 (Esferas) 200x17 (Rods)	Esféricas Rods
Mafuné [211]	2001	No	SDS	Ablación LASER	1-5	Esféricas
Klabunde [210]	2002	No	Dodecanotiol	Vaporización a vacío y reflujo (SMAD)	4	Esféricas
Sau y Murphy [179]	2004	NaBH ₄ /ácido ascórbico	CTAB	Semillas a TA	20-100 (proporciones 2:4)	Rods
Kimling [168]	2006	Citrato sódico (o ácido ascórbico)		Reducción termal, UV o reducción a TA	9-120	Esféricas
Klabunde [218]	2007	No	3-mercapto-1-propanosulfonato sódico	Vaporización a vacío y reflujo (SMAD)	4.2	Esféricas
			Sal sódica del ácido 1-mercapto-5-tetrazoleacético		3.4	Esféricas
			3-mercapto-1,2-propanodiol		6.6	Esféricas
Kah [172]	2008	Citrato sódico		Reducción térmica en monofase	20	Esféricas

Patungwasa [203]	2008	Citrato potásico		Reducción térmica en monofase a pH variable	18-100	Esféricas a poliédricas
Brust [191]	2009	NaBH ₄	DTAB/dodecanotiol	Semillas medio orgánico	25 y 35 (semillas 1.5) 5-8 (semillas 3.5)	Esféricas
Martin [186]	2010	NaBH ₄	HCl y NaOH	Reducción lenta del oro	3-5	Esféricas
Sivaraman [214]	2010	Ácido tánico		Reducción TA con pH variable	a 2-10	Esféricas
Kaner [201]	2011	Nanofibras de polianilina		Autorreducción a temperatura variable	<1 - >10000	Esféricas a microláminas

Tabla 3.7: Resumen de los procedimientos sintéticos desarrollados en el presente trabajo, ordenados por grupo y año de publicación

El énfasis realizado a lo largo del presente capítulo sobre los procedimientos clásicos de Turkevich es debido a la gran importancia que estas síntesis, con más de sesenta años de historia a sus espaldas, tienen aún hoy en día. Muchos de los esfuerzos realizados con vistas a la obtención de tamaños controlados y a la mejora de la polidispersidad de las síntesis resultantes, así como a la adaptación de las condiciones de reacción para la obtención de tamaños y formas específicas se han llevado a cabo empleando los parámetros desarrollados en este estudio. Es además interesante resaltar que en los últimos años, el desarrollo de nanosistemas ha ido evolucionando hacia la búsqueda de partículas de formas complejas para aplicaciones específicas en los más diversos campos, como la medicina, la biotecnología o la ciencia de materiales.

Como se ha expuesto en los párrafos anteriores, la síntesis de partículas de oro se puede conseguir por diferentes métodos, dependiendo de las características finales buscadas (tamaño, forma y funcionalización) y de las consideraciones prácticas del proceso, por ejemplo, de la necesidad de trabajar con la tecnología y los fondos económicos disponibles. Además, el control de los factores adicionales de la síntesis como el pH y la temperatura resulta crucial, debido a la influencia de estos parámetros en los distintos procesos que tienen lugar durante la formación de las partículas, como son la nucleación, el crecimiento o la maduración de Ostwald.

Hoy en día, la reducción de oro por citrato en medio acuoso sigue siendo una de las vías de obtención de nanopartículas esféricas más rápidas y simples. La adición de tioles o tensioactivos durante la síntesis suele conducir a una mejora de la estabilidad, a la obtención de formas no esféricas o a la introducción de grupos funcionalizables. Por su parte, las rutas de síntesis por semillas introducen pasos adicionales a cambio de una ganancia en la monodispersidad de los coloides finales, y proporcionan posibilidades mucho más amplias en cuanto al control del tamaño de la síntesis. Son también apropiadas para el desarrollo de nanopartículas no esféricas de dimensiones definidas.

Desde las primeras síntesis de partículas esféricas de Turkevich, pasando por los nanorods hasta las formas más complejas como nanoshells, la síntesis de nanosistemas es un campo en constante crecimiento y expansión, lo que se refleja en el enorme número de investigaciones, publicaciones y patentes que se desarrollan cada año. Hoy en día, existen tres áreas fundamentales de expansión: la mejora y refinamiento de las propiedades de la SPB, el desarrollo de coloides de uso en la fabricación de materiales biomiméticos y la fabricación de cristales anisotrópicos, que se espera jueguen un papel fundamental en el desarrollo de sistemas nanoelectrónicos. Con estos objetivos en mente, muchos estudios han desarrollado rutas de síntesis novedosas partiendo de un amplio abanico de materiales, pero la influencia de los parámetros como la temperatura o la concentración no es, sin embargo, foco habitual de estos estudios. En el presente trabajo nuestro objetivo ha sido cubrir esta deficiencia.

Texto completo del artículo original disponible para consulta y descarga en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chem.201405117/abstract>

4. TRABAJO COMPLEMENTARIO

En la presente sección se recogen aquellos resultados obtenidos durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral y que constituyen parte de la misma y de sus objetivos sin encontrarse recogidos en publicaciones en el momento de su presentación. Constituyen esta sección dos trabajos completos en proceso de publicación, correspondientes a los Objetivos 1 y 2 de la Tesis Doctoral, y los resultados experimentales que constituyen el estudio realizado para cubrir los Objetivos 3 y 4 y que se encuentran pendientes de ser recogidos en próximas publicaciones.

Para el desarrollo del contenido recogido en los trabajos completos se ha seguido el mismo esquema de redacción que para los trabajos ya publicados que constituyen el capítulo anterior de esta Tesis, con la excepción de la reseña bibliográfica:

- Resumen
- Introducción
- Procedimiento Experimental
- Resultados y Discusión
- Conclusiones

Se detallan a continuación los contenidos que componen este Trabajo Complementario:

Trabajos en proceso de publicación

- *Electrochemiluminescent (ECL) Ru(bpy)₃²⁺/PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation.* A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, P. Perez-Tejeda*, F. Muriel-Delgado, C. Torres-Marquez. 2016.
- *Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIELab and deconvolution study.* A. Jimenez-Ruiz*, J. M. Carnerero, P. M. Castillo, R. Prado-Gotor*. 2016.

Trabajo adicional no recogido en publicaciones

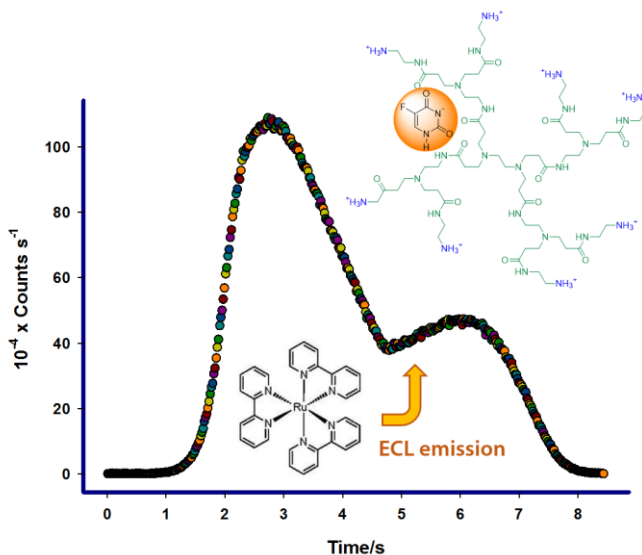
- Determinación de la influencia de las nanopartículas comerciales de oro-citrato de 5 nm en la eficiencia ECL de la reacción Ru(bpy)₃²⁺/C₂O₄²⁻
- Síntesis y optimización de la estabilidad de nanopartículas de plata-citrato de 5 nm y su influencia en la eficiencia ECL de la reacción Ru(bpy)₃²⁺/C₂O₄²⁻

4.1. Trabajos en proceso de publicación

4.1.1. Electrochemiluminescent (ECL) $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ / PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation

Autores: A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, P. Perez-Tejeda*, F. Muriel-Delgado, C. Torres-Marquez

Fecha de escritura: 2016



4.1.1.1. Resumen

Se llevó a cabo un estudio de las reacciones ECL entre el rutenio tris-(4,4')-bipiridilo y dendrímeros PAMAM de generación baja (G1.0 y G1.5) en medio acuoso, en presencia así como en ausencia de un ligando adicional que puede complejarse con el dendrímero, el 5-fluorouracil (5-Fu). Las reacciones se llevan a cabo a dos pH de trabajo, 6.1 y 10. En ausencia del ligando 5-Fu, se comprueba que la eficiencia ECL de los dendrímeros es entre 13 y 100 veces superior a la del oxalato. Se lleva además a cabo la comparación de esta eficiencia ECL con la obtenida en presencia

de 5-Fu para los dos dendrímeros a los dos pH. La variación de la eficiencia ECL con la concentración del ligando evidencia la existencia de una interacción no covalente dendrímero/5-Fu. De esta forma, uno de los hallazgos más importantes de este trabajo es la capacidad de los dendrímeros para actuar como sensores o biosensores de moléculas orgánicas en medio acuoso y sin la necesidad de emplear electrodos modificados. Se determinaron además los potenciales redox del par $\text{Ru}(\text{bpy})_2^{3+/2+}$ en ausencia y presencia del 5-Fu a ambos pH. La variación positiva o negativa observada en ausencia de 5-Fu en los valores del potencial redox del par en presencia de los dendrímeros respecto a su ausencia es consecuencia de la existencia de interacciones electrostáticas atractivas y repulsivas de corto y largo alcance que varían en función de la concentración de dendrímero y del pH del medio. En presencia de 5-Fu a una concentración determinada de dendrímero, las variaciones en el valor del potencial redox del par reflejan no solo la formación de un complejo dendrímero/5-Fu sino además que estos complejos son especies cargadas.

4.1.1.2. Introducción

Como se desarrolla en las secciones 1.1 y 3.1.2, de las dos vías posibles para la generación de una reacción ECL (*anihilación*, basada en la generación in-situ de la forma oxidada y reducida de una especie que se combinan dando la especie inicial en estado excitado; y *por coreactivo*, que se basa en la generación de una única forma, oxidada o reducida, que vuelve a la especie inicial en estado excitado por combinación con un compuesto auxiliar denominado *coreactivo*) [1], [2], [7], [9], [11], [14]–[19], [43] para la generación de una reacción electroquimioluminiscente, en medio acuoso la ruta más viable es aquella que emplea un coreactivo para la generación de la especie excitada. Esto es debido a que el potencial redox del agua, -1.23 V, es mayor que el potencial redox de la forma reducida de muchas especies sensibilizadoras: por ejemplo, el par $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+/1+}$ presenta un potencial redox de -1.43 V.

El desarrollo de la capacidad de los dendrímeros PAMAM para actuar como coreactivos se ha llevado a cabo en dos estudios anteriores por este grupo de investigación, uno de los cuales, dedicado a los dendrímeros PAMAM de generación completa, forma parte de la presente Tesis Doctoral (**sección 3.1**) mientras que el otro, dedicado a los de generación media, es de publicación anterior [44]. El presente estudio complementa los datos obtenidos durante el desarrollo de ambos trabajos, llevando a cabo la caracterización de la influencia del

pH del medio (y por tanto del estado de protonación del dendrímero) en la eficiencia como coreactivo ECL de los dendrímeros PAMAM G1.0 y G1.5, y la capacidad de dichos sistemas para actuar como sensores de un compuesto no involucrado en la generación de la reacción ECL basándose en la interacción del mismo con el dendrímero. Los dendrímeros tienen un amplio historial de estudios relativos a su capacidad de actuar como receptores de moléculas de diversa naturaleza, siendo tradicionalmente empleados en la replicación de los procesos que tienen lugar en sistemas biológicos debido a su capacidad de mimetizar ciertas propiedades de los mismos, como los microentornos que se forman en los sitios activos de las enzimas [83]. Además de estas aplicaciones, la capacidad de los dendrímeros para actuar como portadores de diversas sustancias de interés biomédico es bien conocida [77]–[79], [81], [87]–[93], [219]; entre estas tienen especial importancia aquellas sustancias con actividad anticancerígena, entre las que se incluye el 5-Fluorouracil. La estructura abierta de los dendrímeros de generación pequeña constituye una ventaja adicional que facilita su interacción con las moléculas de 5-Fu [101], a la vez que permite el estudio de la misma mediante reacciones ECL basadas en el efecto coreactivo de este tipo de dendrímeros.

El presente trabajo presenta dos puntos de especial interés: por un lado, se ha comprobado que los dendrímeros PAMAM G1.0 y G1.5 presentan un efecto coreactivo cuya intensidad depende del pH, habiéndose realizado un análisis de la capacidad coreactiva del G1.5 a pH básico para la que hasta la fecha no existían estudios. Se ha comprobado además que la eficiencia ECL varía en presencia de un ligando como el 5-Fu, cuya influencia puede ser estudiada a través de reacciones ECL a pesar de no intervenir directamente en las mismas.

4.1.1.3. Procedimiento experimental

4.1.1.3.1. Materiales

Todos los reactivos empleados en el presente trabajo (NaCl , $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, Na_2HPO_4 , NaOH , NaH_2PO_4 , $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ y los dendrímeros PAMAM G1.0 and G1.5 son de calidad analítica o superior, obtenidos de Sigma Aldrich y usados sin purificación adicional. Las disoluciones se prepararon en agua procedente de un sistema MilliQ con una conductividad $<10^{-6}$ S/m y previamente a la preparación de las mismas se evaporó el metanol de los dendrímeros comerciales empleando una corriente de nitrógeno gas puro.

Las disoluciones se mantuvieron al pH de trabajo mediante el empleo de dos

disoluciones tampón de fosfato de composición Na_2HPO_4 0.093 M + NaOH para las disoluciones a pH 10 y Na_2HPO_4 0.015 M + NaH_2PO_4 0.0855 M at pH 6.1, ajustándose en ambos casos la fuerza iónica total al valor de 0.23 M mediante la adición de las cantidades necesarias de NaCl.

4.1.1.3.2. Medidas ECL

La obtención de los valores de ϕ_{ECL} se llevó a cabo empleando los procedimientos y modos de trabajo descritos en la **sección 3.1.3.2**. Se realizaron medidas ECL en ausencia de 5-Fu y a concentración variable de dendrímero para dos series de disoluciones de G1.0 (pH 6.1) y G1.5 (pH 10). Se obtuvieron además cuatro series correspondientes a los dos dendrímeros y los dos valores de pH para una concentración fija $[\text{G1.0}] = [\text{G1.5}] = 10^{-4}\text{M}$ y concentraciones variables de 5-Fu. Durante todas las experiencias la concentración de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ se mantuvo fija a un valor de 2.5×10^{-4} M. Los valores del rendimiento cuántico fueron obtenidos en referencia a la reacción estándar empleando oxalato como coreactivo, también de la forma descrita en **3.1.3.2**.

Se registraron además los espectros de absorción y emisión fotoluminiscente del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a ambos pH de trabajo en presencia del dendrímero y de 5-Fu, comprobándose que no se producen cambios en la intensidad ni en la posición ni para las bandas de absorbancia MLCT ni para la emisión en relación con aquellas obtenidas en agua. Igualmente, no se observó quenching de fotoluminiscencia para el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en presencia del resto de especies.

4.1.1.3.3. Medidas electroquímicas

La determinación de los potenciales de pico se llevó a cabo mediante la técnica de voltametría diferencial de pulso (VPD) a 298.15 ± 0.01 K en las condiciones experimentales descritas anteriormente.

4.1.1.4. Resultados

4.1.1.4.1. ECL

La Figura 4.1 y la Figura 4.2 recogen la intensidad de emisión procedente de la fracción del estado excitado del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ obtenida mediante voltametría cíclica (CV). Estas curvas han sido registradas en función del potencial y del tiempo para las mismas condiciones de concentración de 5-Fu y dendrímeros y a los dos pH de trabajo.

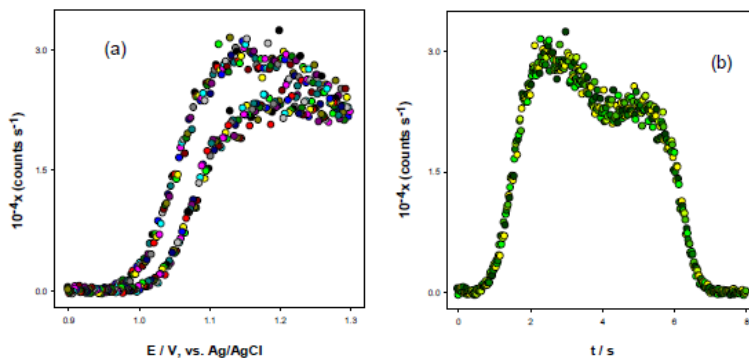


Figura 4.1 Curvas a) emisión/potencial y b) emisión/tiempo para $[5\text{-Fu}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $[G1.0] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ a pH 6.1

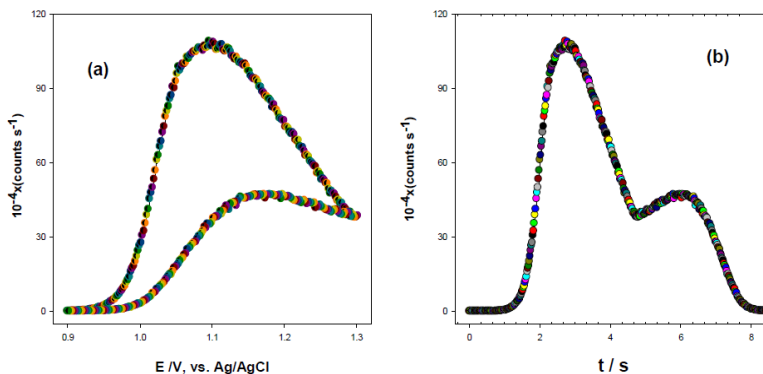


Figura 4.2 Curvas a) emisión/potencial y b) emisión/tiempo para $[5\text{-Fu}] 2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $[G1.0] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ a pH 10

A partir de los datos de emisión y de intensidad de corriente registrados, se determina la eficiencia ϕ_{ECL} de la forma desarrollada en la **sección 3.1.4.1**. Se realiza, asimismo, la corrección del pequeño efecto coreactivo ejercido por los iones OH^- . La lista completa de valores de ϕ_{ECL} obtenidos en ausencia y en presencia de 5-Fu se recoge en la **Tabla 4.1** y en la **Tabla 4.2** respectivamente. A fin de facilitar la comparación de los datos entre sistemas, la **Tabla 4.1** incluye datos recogidos en las publicaciones previas al presente trabajo [44], [220].

^a 10 ⁴ x[G1.0] (pH 6.1)	^a 10 ² xφ _{ECL} (pH 6.1)	^b 10 ⁴ x[G1.0] (pH 10)	^b 10 ² xφ _{ECL} (pH 10)	^c 10 ⁴ x[G1.5] (pH 6.1)	^c 10 ² xφ _{ECL} (pH 6.1)	^d 10 ⁴ x[G1.5] (pH 10)	^d 10 ² xφ _{ECL} (pH 10)
0.243	0.800	0.230	0.730	0.0310	2.30	0.250	1.08
0.873	1.57	0.461	1.40	0.398	6.50	0.500	1.87
1.50	1.70	0.692	1.73	0.698	10.2	0.750	4.90
3.08	5.15	2.50	6.4	1.20	14.1	1.00	4.77
4.97	6.40	---	--	---	--	2.50	12.5

Tabla 4.1: Valores de φ_{ECL} en ausencia de 5-Fu para los dendrímeros G1.0 y G1.5 a pH 6.1 y pH 10.

^a Presente trabajo. ^b Ref.[220] ^c Ref. [44] ^d Presente trabajo

10 ⁴ x[5-Fu]/M	G1.0 (pH 6.1)	G1.0 (pH 10)	G1.5 (pH 6.1)	G1.5 (pH 10)
0.00	1.42	3.23	12.1	4.77
1.00	3.23	3.94	11.3	3.55
2.50	5.50	7.32	7.90	5.57
5.00	5.54	7.96	8.70	6.17
25.0	2.89	3.77	---	5.80
50.0	---	2.37	7.20	---

Tabla 4.2: Valores de φ_{ECL} para concentraciones [G1.0] = [G1.5] = 10⁴M en presencia de concentraciones variables de 5-Fu a pH 6.1 y pH 10.

4.1.1.4.2. Potenciales Redox

Los resultados de las medidas de potenciales redox, obtenidos mediante análisis de los voltagramas de VPD (véase **Figura 4.3**) para las diferentes disoluciones en ausencia y en presencia de 5-Fu se encuentran consignados en la **Tabla 4.3** y en la **Tabla 4.4** respectivamente. La equivalencia entre los potenciales de pico determinados experimentalmente y los potenciales de onda media se ha descrito previamente en la **sección 3.1.4.2**.

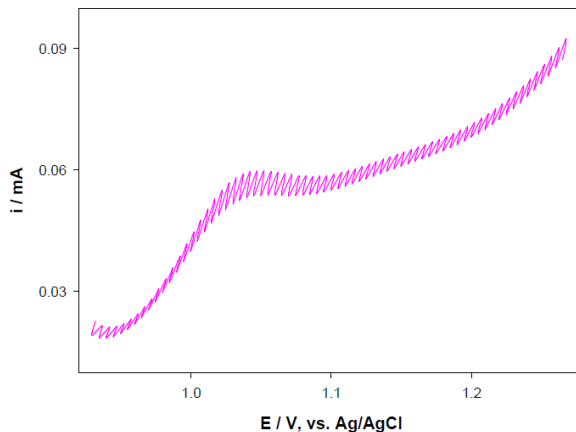


Figura 4.3 Voltagrama VPD del par $\text{Ru}(\text{bpy})^{3+/2+}$ en una disolución de $[\text{5-Fu}] = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{G1.5}] = 1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ a pH 10.

$^a 10^4 \times [\text{G1.0}]$ (pH 6.1)	$^a E_{\text{pico}}$ (pH 6.1)	$^b 10^4 \times [\text{G1.0}]$ (pH 10)	$^b E_{\text{pico}}$ (pH 10)	$^c 10^4 \times [\text{G1.5}]$ (pH 6.1)	$^c E_{\text{pico}}$ (pH 6.1)	$^d 10^4 \times [\text{G1.5}]$ (pH 10)	$^d E_{\text{pico}}$ (pH 10)
0.243	1.261	0.239	1.290	0.0310	1.256	0.250	1.184
0.873	1.264	0.461	1.290	0.398	1.241	0.500	1.189
1.50	1.263	0.692	1.290	0.698	1.274	0.750	1.194
3.08	1.266	2.50	1.284	1.20	1.272	1.00	1.207
4.97	1.295	---	--	---	--	2.50	1.239

Tabla 4.3 Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) para disoluciones de G1.0 y G1.5 a concentraciones variables y a pH 6.1 y 10. ^a Presente trabajo. ^b Ref.[220]. ^c Ref. [44]. ^d Presente trabajo.

$10^4 \times [\text{5-Fu}]/\text{M}$	G1.0 (pH 6.1)	G1.0 (pH 10)	G1.5 (pH 6.1)	G1.5 (pH 10)
0.00	1.264	1.290	1.272	1.207
1.00	1.266	1.274	1.258	1.187
2.50	1.264	1.234	1.251	---
5.00	1.265	1.242	1.243	1.194
25.0	1.264	1.259	1.244	1.239
50.0	---	1.274	1.252	1.252

Tabla 4.4 Potenciales de pico frente al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) para disoluciones de $[\text{G1.0}] = [\text{G1.5}] = 10^{-4} \text{ M}$ en presencia de concentraciones variables de 5-Fu a pH 6.1 y 10.

4.1.1.5. Discusión

4.1.1.5.1. Efecto coreactivo

Como se puede observar en la **Figura 4.1** y en la **Figura 4.2**, experimentalmente se confirma que existe un efecto coreactivo tanto del dendrímero PAMAM G1.0 a pH 6.1, en situación de protonación completa y carga positiva, como del G1.5 a pH 10, con una capa externa completamente desprotonada y cargado negativamente [100], [101]. Este efecto coreactivo, según datos de la **Tabla 4.1**, es mayor para el dendrímero de generación media que para el de generación completa, y además, se encuentra influido por el pH del medio; otras influencias como la formación de macroestructuras dendriméricas se han discutido con anterioridad en el contexto de esta Tesis Doctoral.

El análisis de los datos de eficiencia ECL en ausencia de 5-Fu refleja aspectos interesantes. A pH 6.1, ambos dendrímeros poseen una capa externa cargada: el G1.0 es catiónico, mientras que el G1.5 es aniónico. Dada la naturaleza catiónica del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_2^{2+}$, es de esperar que haya una repulsión electrostática de esta especie con el dendrímero G1.0 a pH 6.1, mientras que el efecto será de atracción electrostática en el caso del G1.5 a pH 6.1. De esta manera, los valores de ϕ_{ECL} deberán ser mayores para el G1.5 que para el G1.0, como de hecho se observa (véase **Tabla 4.1**) Además del efecto repulsivo o atractivo hay que señalar que los grupos $-\text{COOH}$ son mejores coreactivos que los $-\text{NH}_2$, lo cual acentúa las diferencias entre los valores ϕ_{ECL} de ambos dendrímeros a pH 6.1.

Es sin embargo llamativo el hecho de que para el dendrímero G1.5, un aumento de carga negativa (al pasar de pH 6.1 a pH 10) va acompañado de una bajada en la eficiencia ϕ_{ECL} . Para explicar esta diferencia, es preciso tener en cuenta que el efecto coreactivo de los dendrímeros se encuentra en competencia con la formación de un complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{G1.5}$, de naturaleza electrostática y que causa una disminución de la cantidad de sensibilizador libre en el medio, afectando negativamente a la eficiencia ECL [220]. La formación del complejo se ve favorecida por una mayor carga negativa del dendrímero a pH 10 respecto del pH 6.1.

La variación de potenciales redox con la concentración de ambos dendrímeros es a su vez interesante y apoya los puntos discutidos anteriormente. Como se puede véase en la **Tabla 4.3**, para el caso del G1.0 (pH 6.1) la repulsión electrostática causa un fuerte aumento del potencial redox del par. Este efecto puede explicarse en base a la siguiente ecuación:

$$E_{pico} - E^0 = RT/F \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}} \quad (4.1)$$

donde E_{pico} y E^0 representan los potenciales de pico y estándar, respectivamente, γ_{ox} y γ_{red} son los potenciales químicos de las especies oxidada y reducida y el resto de términos tienen el significado habitual. Esta ecuación predice que la presencia de una especie cargada positivamente como el dendrímero G1.0 en el entorno del par $Ru(bpy)_3^{3+/2+}$ causará un aumento del potencial químico, que será mayor para la especie más cargada; es decir, γ_{ox} aumentará en mayor grado que γ_{red} , debido a la mayor carga positiva de la especie oxidada, causando un aumento del potencial redox del par en presencia de dendrímero respecto de su ausencia.

A pH 10, el G1.0 se encuentra descargado y los potenciales redox son constantes. Para el G1.5, se encuentra una caída del valor de potencial de pico seguido de una subida a concentraciones altas. Estas variaciones pueden explicarse mediante la formación del complejo $Ru(bpy)_3^{2+}/G1.5$: a concentraciones bajas, las interacciones electrostáticas de largo alcance prevalecen (véase **ecuación 4.1**), causando la caída del potencial. Cuando la concentración de dendrímero aumenta, la interacción que prevalece pasa a ser la electrostática de corto alcance [22], [23], que causa un aumento de los potenciales. La mayor carga del dendrímero a pH 10 hace que estos efectos sean mucho más marcados que en el caso del dendrímero G1.5 a pH 6.1.

A fin de resaltar el efecto coreactivo de ambos dendrímeros y la influencia del pH en este efecto, los valores de ϕ_{ECL} en función de la concentración de dendrímero se representan en la **Figura 4.4**. Como puede verse en esta figura y en la **Tabla 4.5**, las pendientes de las representaciones aumentan en el orden:

$$G1.5 \text{ (pH 6.1)} > G1.5 \text{ (pH 10)} > G1.0 \text{ (pH 10)} > G1.0 \text{ (pH 6.1)}$$

También se observa en la tabla que los coeficientes de correlación son buenos en todos los casos, así como que el rango de comportamiento lineal decrece cuanto mayor es la pendiente.

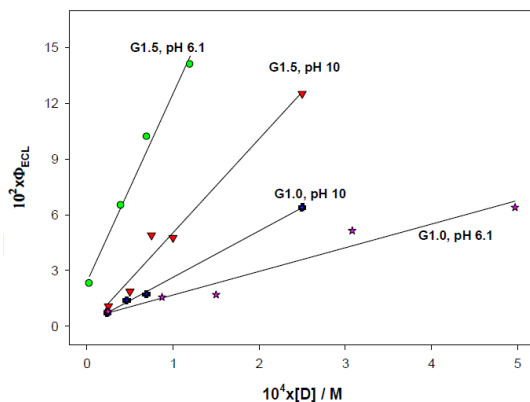


Figura 4.4 Valores de eficiencia ECL en función de la concentración de dendrímero para G1.0 y G1.5 a pHs 6.1 y 10.

D	10 ⁻³ × Pendiente / M ⁻¹	Coeff. Corr.	Rango lineal
G1.5 (pH 6.1)	1.02	0.991	≤ 1.20 × 10 ⁻⁴ M
G1.5 (pH 10)	0.564	0.990	≤ 2.50 × 10 ⁻⁴ M
G1.0 (pH 10)	0.250	0.999	≤ 2.50 × 10 ⁻⁴ M
G1.0 (pH 6.1)	0.127	0.976	≤ 5.00 × 10 ⁻⁴ M

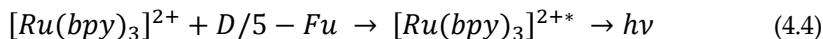
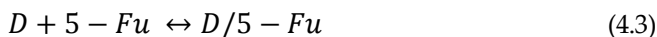
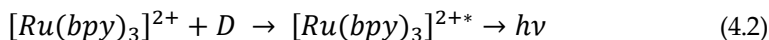
Tabla 4.5 Valores de pendiente, coeficientes de correlación y rango lineal para los datos recogidos en la Figura 4.4

Por comparación con la reacción ECL empleada como estándar, se comprueba además que los dendrímeros presentan un efecto coreactivo que es superior al del oxalato sódico a concentración 10⁻³ M en 100 (G1.5, pH 6.1), 60 (G1.5, pH 10), 26 (G1.0, pH 10) y 13 (G1.0, pH 6.1) veces, respectivamente. De esta forma, queda demostrado que la adición de un dendrímero a una disolución conteniendo Ru(bpy)₃²⁺ permite la construcción de un sistema ECL con una eficiencia hasta 100 veces superior a la del oxalato (trabajando a [ox] = 2 × 10⁻³ M), que puede ser utilizado para el desarrollo y construcción de sensores ECL aprovechando el potencial de los dendrímeros como receptores químicos y sin necesidad de trabajar con sistemas complejos o electrodos modificados.

4.1.1.5.2. Interacción dendrímtero/5-Fu

Como se puede observar en la **Tabla 4.2**, para el dendrímtero G1.0 a pH 6.1 y pH 10 y para el dendrímtero G1.5 a pH 10 la adición de 5-Fu a concentraciones bajas provoca un aumento de la eficiencia ECL hasta $[5\text{-Fu}] = 5.0 \times 10^{-4}$ M, valor a partir del cual el valor de ϕ_{ECL} desciende. Para el dendrímtero G1.5 a pH 6.1, este descenso se da en todo el intervalo de concentraciones analizado.

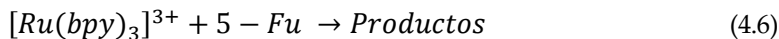
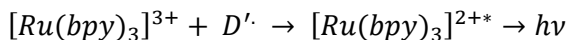
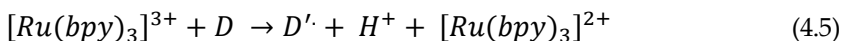
Para explicar estos fenómenos y su significado físico es necesario postular un esquema de reacción ECL simplificado:



donde D equivale a ambos dendrímteros y D/5-Fu a la complejación de los mismos con el 5-Fluorouracil. Las ecuaciones 4.2 y 4.4 se refieren a los procesos globales de generación de emisión ECL para las especies de dendrímtero libre y ligado al 5-Fu. Los procesos 4.2 y 4.3 son competitivos, mientras que 4.2 y 4.4 deben darse prácticamente en paralelo; esto significa que el proceso 4.3 debe ser prácticamente instantáneo. Como la formación del complejo D/5-Fu causa una pérdida de la eficiencia coreactiva del dendrímtero, debería verse una caída de los valores ϕ_{ECL} debido a la pérdida de coreactivo útil; sin embargo, ϕ_{ECL} aumenta. Por ello, el proceso 4.4 debe darse. Para G1.0 a pH 6.1 y para G1.5 a pH 10 el proceso que prevalece es el 4.4, mientras que en el caso del G1.5 a pH 6.1 el proceso principal es el 4.2. Dado que en este último caso la eficiencia ECL del dendrímtero es muy superior a la de los demás casos, es muy posible que la contribución del complejo D/5-Fu a la misma se vea enmascarada y no sea significativa respecto del total global de emisión ECL. Sin embargo, mientras estos procesos pueden explicar la zona de subida de la eficiencia ECL, la caída de los valores de ϕ_{ECL} no puede ser predicha empleando exclusivamente el esquema de reacción ECL anterior; por tanto, es necesario tener en cuenta la existencia de otros efectos adicionales.

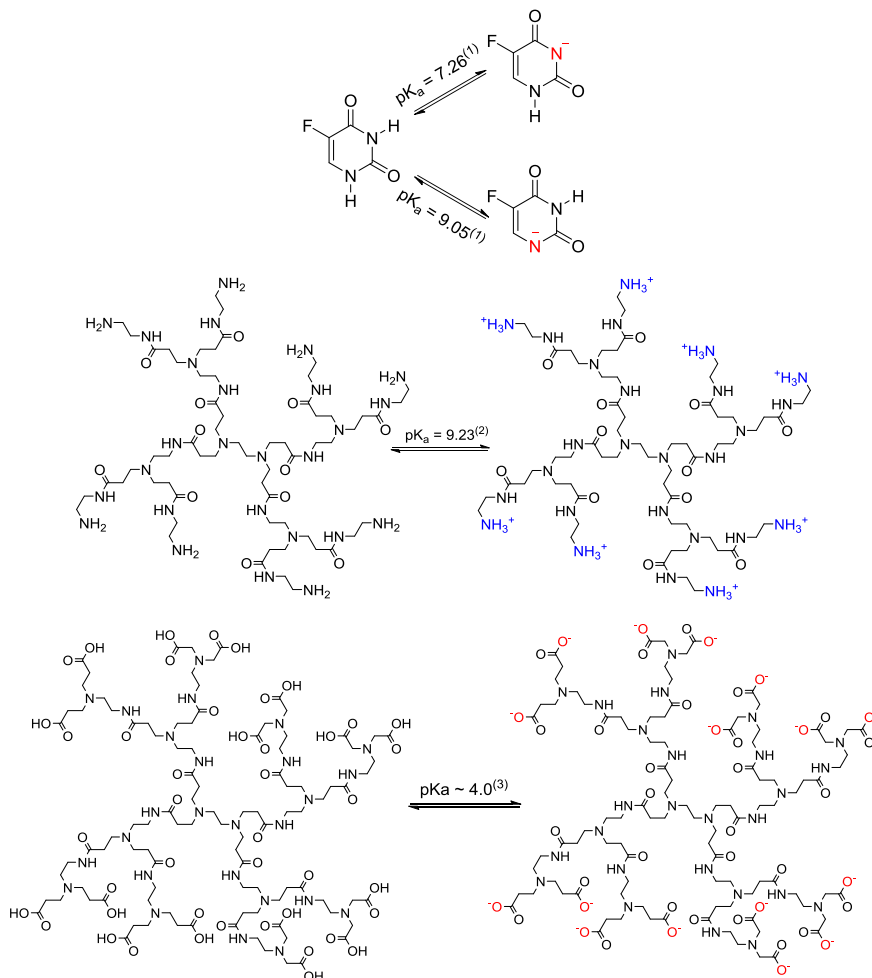
Para explorar la causa de la caída de ϕ_{ECL} a concentraciones altas de 5-Fu, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se registraba la eficiencia ECL de una serie de disoluciones en ausencia de dendrímtero y en presencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ y concentraciones variables de 5-Fu. En estas experiencias no se observó emisión ECL, es decir, el 5-fluorouracil no actúa como coreactivo; sin embargo,

para las disoluciones más concentradas se observó una fuerte subida de la corriente coulombiana. Se comprobó además que esta subida de la intensidad de corriente no aparece en disoluciones de 5-Fu en ausencia de rutenio. De esta forma, puede postularse la existencia de un efecto adicional que involucra una interacción Ru(bpy)₃²⁺/5-Fu. Sin embargo, desde un punto de vista experimental, es imposible separar la influencia de esta interacción de la del Ru(bpy)₃²⁺/D, ya que se trata de procesos competitivos y no independientes, aunque sí puede darse una interpretación del aumento de carga coulombiana observado. De hecho, el mecanismo ECL propuesto para la reacción Ru(bpy)₃²⁺/oxalato hace posible tal interpretación [9]. De acuerdo con este mecanismo ECL, se propone que existen dos reacciones catalíticas paralelas, 4.5 y 4.6; la primera conduce a la formación de una fracción de rutenio en estado excitado, y por tanto a emisión ECL, mientras que la segunda no.



Donde D y D' simbolizan a la molécula de dendrímero y a una especie radical intermedia que hace posible el efecto coreactivo, respectivamente. De esta forma, la prevalencia de 4.6 causa un incremento de la corriente electródica que no va acompañado de un aumento de emisión, siendo causa de la caída de los valores ϕ_{ECL} a concentraciones altas de 5-Fu.

Para comprender la naturaleza de la interacción D/5-Fu, es interesante tener en cuenta el signo de la carga global (Z) del complejo, que será resultante de las cargas individuales del dendrímero y del ligando L (véase **Esquema 4.1**). A pH 6.1, tanto el dendrímero G1.0 como el 5-Fu se encontrarán protonados completamente, lo que da como resultado una carga positiva del dendrímero y neutra del ligando. A pH 10 el dendrímero será neutro mientras que el 5-Fu se encontrará cargado negativamente. Por ello, la interacción ligando-receptor no puede ser de naturaleza electrostática en ninguno de los dos casos, y el complejo resultante será positivo en el primero y negativo en el segundo. Para el dendrímero de generación media, la carga es negativa a ambos pH, lo que da como resultado complejos aniónicos en ambos casos y, de nuevo, es imposible la existencia de una atracción electrostática.



Esquema 4.1 Equilibrios de protonación del 5-Fluorouracil y de los dendrímeros G1.0 y G1.5. (1) Datos obtenidos de Jang et al. *J. Phys. Chem. A* 2001, 105, 274-280 (2) Datos obtenidos de Sun et al. *Macromolecules* 2003, 36, 5725-5731 (3) Datos obtenidos de Duijvenbode et al. *Macromolecules*, 2000, 33, 46-52

De esta forma, se espera que esta interacción sea de carácter hidrofóbico o hidrofílico, y en ambos casos, presumiblemente, se situaría al ligando en el interior del dendrímero cargado, en concordancia con otros experimentos llevados a cabo para dendrímeros de generación mayor [93], [221]. La existencia de un *quenching* de

la emisión del dendrímero G1.5 en presencia de concentraciones altas de 5-Fu es una prueba a favor de este tipo de interacción. La fluorescencia de los dendrímeros ha sido identificada como procedente, en su mayor parte, de un complejo O₂-amino terciario del dendrímero de carácter no electrostático [222]. La entrada de un ligando adicional en el interior del dendrímero desplaza al O₂ causando una pérdida de la intensidad de emisión (**Figura 4.5**)

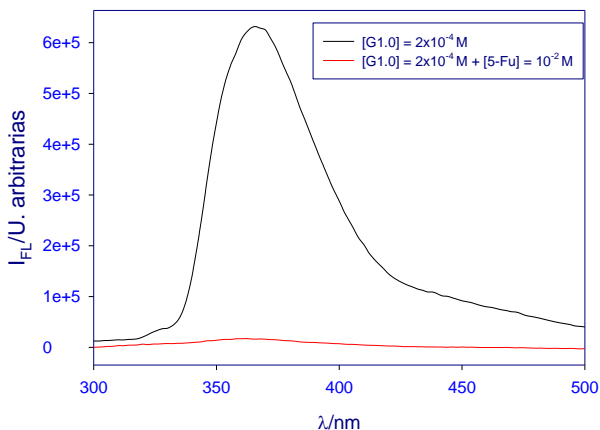


Figura 4.5 Emisión del dendrímero G1.5 excitado a 288 nm en ausencia y presencia de $[5-Fu] = 10^{-2} M$

Como antes se ha indicado, los complejos D/5-Fu pueden llevar carga positiva o negativa. Una forma de clarificar y corroborar esta hipótesis es a través de la variación de los potenciales redox del par $Ru(bpy)_3^{3+/2+}$ en función de la concentración de 5-Fu (**Tabla 4.4**). Estos potenciales siguen secuencias distintas a pH 6.1 y a pH 10. A pH 6.1, en presencia de G1.0 no se observa variación, y en presencia de G1.5 hay un ligero descenso, que se puede atribuir a la existencia de interacciones electrostáticas de largo alcance entre la forma oxidada y reducida del par $Ru(bpy)_3^{3+/2+}$ y el complejo (G1.5/5-Fu). Este mismo efecto aparece a pH 10 para ambos dendrímeros hasta $[5-Fu] = 2.5 \times 10^{-4} M$, por encima de la cual se produce un aumento del potencial. Esta zona de aumento corresponde al acoplamiento entre las interacciones $Ru(bpy)_3^{2+}/D$ y $Ru(bpy)_3^{2+}/5-Fu$, que es más predominante cuando $[5-Fu]$ aumenta. Por tanto, la variación de los potenciales redox (véase **Tabla 4.4**) reflejan la presencia de complejos cargados D/5-Fu, como se quería demostrar.

4.1.1.6. Conclusiones

Se ha determinado la eficiencia ECL de los dendrímeros PAMAM G1.0 a pH 6 y G1.5 a pH 10, llevándose a cabo la caracterización completa de su eficiencia ECL y de la variación de los potenciales redox del par $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ con la concentración de dendrímero. De esta forma, se ha determinado que para ambos dendrímeros a pH 6 y pH 10 se obtienen eficiencias ECL superiores a las de la referencia de oxalato sódico 10^{-3} M en 100 (G1.5, pH 6.1), 60 (G1.5, pH 10), 26 (G1.0, pH 10) y 13 (G1.0, pH 6.1) veces, respectivamente. Se determinó también la eficiencia ECL y los potenciales redox del par $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ trabajando a concentraciones fijas de dendrímero y en presencia del ligando 5-Fu. De esta forma se demuestra la formación de un complejo cargado entre el mismo y ambos dendrímeros, tanto en condiciones de protonación de la capa externa de los dendrímeros como en ausencia de la misma. Esta interacción se refleja tanto en una variación de la eficiencia ECL del dendrímero, que experimenta una subida respecto a la eficiencia ECL estándar de oxalato sódico a concentraciones diluidas de 5-Fu seguida de una bajada a concentraciones elevadas en tres de los cuatro casos estudiados, como en los cambios observados en los potenciales redox del par.

4.1.2. Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIELab and deconvolution study

Autores: A. Jimenez-Ruiz*, J. M. Carnerero, P. M. Castillo, R. Prado-Gotor*
Fecha de escritura: 2016

4.1.2.1. Resumen

La capacidad de los dendrímeros PAMAM de generación pequeña para adsorberse en la superficie de las nanopartículas de oro, acompañada de agregación de las partículas y por tanto de cambios en el color del sistema, es ya conocida y ha sido objeto de algunos estudios anteriores. En el presente trabajo se lleva a cabo la caracterización de esta interacción empleando técnicas de espectroscopía de absorción, colorimetría y espectroscopía de emisión. Los resultados demuestran que a pH 6.1 la interacción de los dendrímeros, cuya capa externa se encuentra cargada positivamente, con las nanopartículas aniónicas de oro-citrato no es exclusivamente de carácter electrostático sino que ocurre, al menos en parte, a través de los grupos amino internos del dendrímero, que carecen de carga al pH de trabajo. Se determina la dependencia del estado de agregación de las nanopartículas con la concentración de dendrímero en el medio de forma cualitativa mediante el análisis de la posición e intensidad de las bandas presentes en los espectros de absorbancia, y se corroboran los resultados mediante análisis de tamaño de los agregados de nanopartículas por microscopía de transmisión electrónica. Se realiza finalmente un desarrollo de las posibilidades del análisis colorimétrico y de la determinación de los valores CIELab para el cálculo de la energía libre de interacción oro-dendrímero, corroborándose los valores obtenidos mediante la aplicación de un método de deconvolución.

4.1.2.2. Introducción

Los dendrímeros son una familia de polímeros sintéticos de distinta naturaleza y estructura, pero que comparten una serie de rasgos comunes: tienen una composición molecular definida [79], presentan simetría radial, y se generan por pasos discretos de síntesis, ya sean sucesivos (el mismo grupo se va añadiendo de forma repetida a la capa externa del dendrímero) o alternados (dos o más grupos distintos se van añadiendo de forma alterna), a partir de un núcleo (*core*)

generalmente de naturaleza orgánica [223]–[226]. Estos pasos de síntesis dan lugar a lo que se conoce como la *generación* de un dendrímoro, que generalmente se denomina con un valor numérico y tiende a corresponder a las veces que se repite un determinado paso de síntesis. Dado que durante cada etapa de síntesis se añade un número conocido de grupos a la capa externa del dendrímoro, la generación de un dendrímoro es un indicador de su tamaño y, en el caso de las síntesis por pasos alternados, de la funcionalización que presenta el dendrímoro en su capa más externa. Por esta razón, en un dendrímoro un aumento lineal en el peso molecular se corresponde con un aumento geométrico de su volumen interno [227]. Químicamente, los dendrimeros se caracterizan y reciben su nombre por las unidades de repetición que se emplean en su crecimiento, así como del *core* a partir del cual éste se inicia. Dos de los dendrimeros más antiguos y mejor estudiados y caracterizados son los dendrimeros de tipo PAMAM (poli amido amina) y los PPI (poli propilén imino), ambos desarrollados a partir de diaminas [228]. En el caso de los dendrimeros PAMAM, que son el foco del presente trabajo, su síntesis clásica usa un núcleo de etilendiamina, y sus grupos terminales pueden ser grupos amino primarios o grupos carboxilo dependiendo de la generación: los dendrimeros de *generación completa* (GX.0) terminan en grupos amino, mientras que los de *generación media* (GX.5) son carboxílicos. En cualquier caso, la capa externa de los dendrimeros puede ser, y es a menudo, modificada tras la síntesis mediante la adición de grupos funcionales diferentes a su capa externa que modifiquen su reactividad con vistas a mejorar una determinada aplicación [30], [229]–[232].

Las propiedades de los dendrimeros han sido objeto de estudio desde su aparición: su movilidad electroforética [233], su viscosidad [234], sus propiedades espectrales [235], la difusión y el atrapamiento de moléculas en estructuras dendrimericas [236] y sus aplicaciones como portadores moleculares, en terapia génica o como vectores de medicamentos [237]–[239] son todas áreas de estudio que han recibido atención a lo largo de su historia. Entre ellas, el estudio de las interacciones ligando-dendrímoro es de especial interés, debido a la importancia que estas interacciones tienen en la mayoría de aplicaciones prácticas de los dendrimeros. En cuanto a sus interacciones con nanopartículas de oro de distinto tamaño y naturaleza, muchos de los estudios hasta la fecha se han centrado en el desarrollo de nuevas rutas de síntesis de estas partículas mediante el uso de dendrimeros como molde y agente protector, es decir, en el crecimiento de nanopartículas confinadas en dendrimeros de distinto tamaño y volumen interior. El campo de la interacción dendrimeros-oro abarca además estudios que emplean dendrimeros de otra naturaleza, como los

híbridos PPI-PAMAM, estudios de simulación de interacciones mediante mecánica clásica o estudios donde se emplean los dendrímeros como auxiliares en la síntesis, por ejemplo para la transferencia de nanopartículas formadas en el transcurso de una síntesis entre fases acuosas y orgánicas. Sin embargo, hasta la fecha, los estudios sobre interacción directa de nanopartículas de oro sin funcionalización adicional con dendrímeros PAMAM son escasos, y la cuantificación de estas interacciones aún no se ha llevado a cabo por ningún método.

El presente estudio pretende realizar la caracterización estructural y fisicoquímica de estas interacciones entre nanopartículas de oro-citrato aniónicas sin funcionalizar y dendrímeros PAMAM de generación 1.0, de carga positiva al pH de trabajo [100], mediante el empleo de las propiedades colorimétricas de las nanopartículas y de la emisión intrínseca del dendrímero. Esta emisión fue detectada por Wang y colaboradores, que observaron que los dendrímeros PAMAM, tanto los terminados en grupos amino como los carboxílicos (es decir, de generación completa y media) presentaban una emisión de luz visible azul (aprox. 450 nm) al ser excitados cerca de su máximo de absorbancia en el ultravioleta [222], [240]. Esta emisión crecía cuando el pH del medio era inferior a 6 y con el tiempo de reposo de las disoluciones y disminuía notablemente si se llevaba a cabo el estudio en atmósfera de gas nitrógeno, lo que llevó a concluir que provenía de un complejo dendrímero-O₂ de formación lenta. Paralelamente, con solo dos meses de diferencia el grupo de Bard publicaba otro estudio en el que dendrímeros PAMAM terminados en grupos hidroxilo, -OH, presentaban una fuerte emisión de fluorescencia cuando se trataban con un oxidante químico [241]. Sin embargo, estas propiedades emisivas del dendrímero no han sido realmente usadas a la hora de abordar los estudios de caracterización de la interacción de los dendrímeros PAMAM con sustratos de distinta naturaleza.

Por otro lado, el desarrollo de un método colorimétrico de cuantificación de las interacciones AuNPs-sustrato ha sido desarrollado previamente por nuestro grupo y forma parte de los contenidos y objetivos de esta Tesis Doctoral (véase **sección 3.2**). En el presente estudio se intenta aplicar este mismo método, junto con su contraparte de deconvolución, a la determinación colorimétrica de las constantes y energías libres de interacción AuNPs-dendrímero.

4.1.2.3. Materiales y métodos

4.1.2.3.1. Materiales

Los dendrímeros PAMAM de generación 1.0 y 1.5 (referencias 412384 y 470457 respectivamente) en disoluciones comerciales al 20% peso en metanol se adquirieron en Sigma Aldrich y se emplearon tras un proceso de secado para eliminar el disolvente previamente a la preparación de las disoluciones de trabajo. Para la síntesis de las nanopartículas de oro se empleó como precursor el HAuCl_4 [Sigma Aldrich, 520918] y como reductor y agente protector el citrato sódico [Riedel-de Haën, 32320]. Las sales Na_2HPO_4 [Sigma Aldrich, 71650], NaH_2PO_4 [Merck, A760846] y NaCl [Merck, 1.06404] empleadas en la preparación del tampón se emplearon sin purificación adicional. Todos los reactivos son de calidad analítica o superior, y todas las disoluciones se prepararon con agua procedente de un sistema Milli-Q de conductividad $< 10^{-6}$ S/M y se ajustaron a pH 6 empleando un tampón fosfato de fuerza iónica 0.0234 M.

La síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro se llevó a cabo empleando los procedimientos descritos en la **sección 2.3.2.1**. Para la caracterización de las partículas obtenidas se emplearon medidas de microscopía de transmisión electrónica (TEM). Se obtuvo un coloide monodisperso con un diámetro medio de 17.3 ± 1.1 nm, y cuya circularidad se encontró por encima de 0.8 en todos los casos analizados, considerándose por tanto que se encuentra compuesto de partículas casi perfectamente esféricas.

4.1.2.3.2. Instrumentación

Medidas de TEM – Las muestras para microscopía de transmisión electrónica se prepararon mediante deposición de una gota de muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de película de carbono, que se dejó secar hasta completa evaporación del disolvente. Estas muestras se midieron en un microscopio Hitachi CM 200 trabajando a 200 kV. Posteriormente, las imágenes se analizaron empleando el software libre ImageJ.

Espectroscopía de absorción uV-vis – La obtención de espectros de absorción se realizó en un espectrofotómetro Cary 500 a 298.2 K, registrándose la absorción de las disoluciones de trabajo en el margen comprendido entre 200 y 800 nm.

Espectroscopía de emisión – Los espectros de emisión se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Hitachi F-2500 y otro Photon Technology International, ambos

conectados a equipos informáticos para la adquisición y análisis de los espectros de emisión. Se realizaron medidas a dos concentraciones constantes de dendrímero, $[G_{1.0}] = 1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $3.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ y las disoluciones de trabajo se dejaron reposar un mínimo de 4 horas para permitir la obtención de espectros de emisión de los dendrímeros estables y de buena intensidad. La longitud de onda de excitación empleada fue 288 nm, y las concentraciones de oro se encuentran en el rango de $2.3 \times 10^{-10} \text{ M}$ a $3.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ para la primera serie y de $1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ a $2.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ en la segunda.

Obtención de parámetros CIELab y de deconvolución – Tanto los parámetros colorimétricos como la intensidad y posición de las bandas deconvolucionadas se determinaron siguiendo los procedimientos detallados previamente en la **sección 3.2.3** de esta Tesis Doctoral.

4.1.2.4. Resultados y discusión

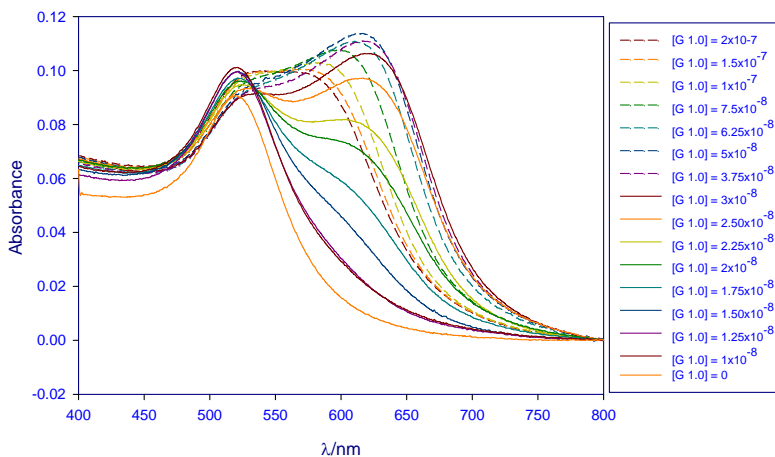


Figura 4.6 Espectros de absorción normalizados de una serie de disoluciones conteniendo $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ y concentraciones variables de dendrímero PAMAM G1.0. Las concentraciones a las que se produce una reversión de la banda hacia longitudes de onda menores se encuentran marcadas con trazo discontinuo.

La **Figura 4.6** muestra los espectros de absorción correspondientes a la SPB de una concentración $2.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ de nanopartículas de oro en presencia de concentraciones crecientes de dendrímero PAMAM G1.0. Como se puede observar,

la adición del dendrímero causa la formación de una segunda banda de absorbancia que crece y se desplaza hacia el rojo al aumentar su concentración. Este cambio es debido a la formación de agregados de nanopartículas en presencia del dendrímero, y viene acompañado de un viraje del color de las suspensiones, que pasan de rojo a azul. Este fenómeno de agregación de nanopartículas en presencia de dendrímero ha sido observado previamente en sistemas de carga opuesta al de nuestro sistema, donde dendrímeros PAMAM de generación media, aniónicos, interaccionaban con nanopartículas estabilizadas con cloruro de 3-mercaptopropiltrimetilamonio, de carácter catiónico. Es interesante notar que la longitud de onda de máxima absorción, λ_{\max} , presenta un máximo a una concentración de dendrímero $[G_{1.0}] = 3 \times 10^{-8} \text{ M}$, y que a concentraciones elevadas de dendrímero se produce una reversión del desplazamiento de la banda con cierta pérdida de intensidad de la misma, observación que es también coherente con las observaciones de los autores del estudio anterior.

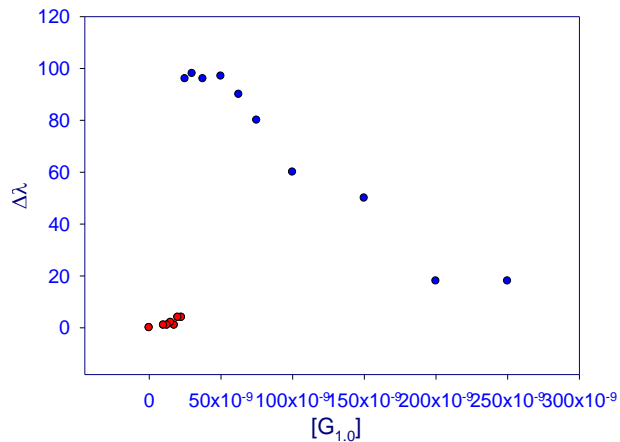


Figura 4.7 Desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción respecto al blanco ($\Delta\lambda$, expresado como $\lambda_{\max} - \lambda_{\text{libre}}$) para concentraciones variables de dendrímero PAMAM G1.0.

El fenómeno de reversión de banda puede observarse con más claridad en la Figura 4.7, que muestra el desplazamiento $\Delta\lambda$ del máximo de absorbancia de cada una de las disoluciones D1-AuNPs objeto de estudio. Los valores de $\Delta\lambda$ experimentan un cambio brusco a bajas concentraciones, que coincide con el momento en que la intensidad de la banda de agregación (creciente con la concentración en ese primer intervalo) supera a la de la banda libre. Este cambio va

seguido de una zona de máximo $\Delta\lambda = 100$ nm que abarca desde $[G1.0] = 3 \times 10^{-8}$ a 5×10^{-8} M, y para concentraciones superiores se comprueba la reversión del desplazamiento de la banda hasta alcanzar una segunda zona estable $\Delta\lambda = 20$ nm para las concentraciones más elevadas. Es de notar que pese a que esta reversión va ligada a una bajada de la intensidad de la banda de agregación, en ningún momento ésta es menor que la banda libre, como sí sucede a las concentraciones más diluidas. En otras palabras, la pérdida de intensidad de la banda de agregación no implica una recuperación de la intensidad de la banda libre.

La reversión de la banda de absorbancia ligada a los agregados de nanopartículas a concentraciones elevadas es un efecto similar al que se observó en el Capítulo 3 de esta Tesis para el caso de las disoluciones de lisozima en agua (véase **Figura 3.8**). Como ocurría en el caso de la lisozima, el dendrímero es una macromolécula de alta carga positiva y con gran tendencia a interactuar con las nanopartículas de oro incluso a concentraciones bajas. Por la relación directa existente entre $\Delta\lambda$ y el tamaño de las nanoestructuras, es posible determinar que, a concentraciones altas de dendrímero, el tamaño de los agregados formados disminuye notablemente respecto a los formados a concentraciones medias. El hecho de que la banda de absorbancia de la fracción libre no recupere su intensidad anterior a concentraciones altas del dendrímero es indicativo de que el grado de agregación de las partículas no disminuye, y no aparece una población de partículas libres que coexistan con los agregados de mayor tamaño. El desplazamiento de la banda va ligado a la fragmentación de los agregados mayores en clústeres de menor tamaño a altas concentraciones de dendrímero; es decir, aunque la fracción de nanopartículas agregadas no disminuye, sí lo hace el tamaño medio de los agregados formados.

Los dendrímeros PAMAM, aunque no presentan grupos fluoróforos convencionales, pueden llegar a exhibir fluorescencia bajo determinadas condiciones, que involucran generalmente su oxidación bien espontánea o bien química, como se detalla en la Introducción. Es interesante notar que debido a que no existen diferencias fundamentales entre la emisión procedente de los dendrímeros PAMAM de generación media (terminados en grupos carboxilo, COO) y los de generación completa (terminados en grupos amino) cuando ambos se estudiaron bajo las mismas condiciones experimentales. Debido a que la oxidación de ambos grupos se da de forma diferente, se atribuyó la capacidad emisiva a los grupos aminos terciarios del esqueleto del dendrímero, comunes a

ambas estructuras y cuya reactividad es similar. Esta fluorescencia ha sido sin embargo poco usada a la hora de caracterizar las interacciones ligando-dendrímico.

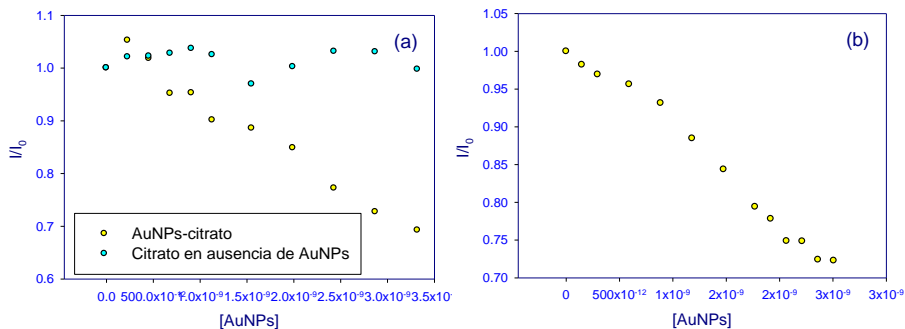


Figura 4.8 Intensidad de emisión máxima corregida y normalizada para disoluciones de dendrímico de concentraciones a) $[G_{1.0}] = 1.4 \times 10^{-4}$ M y b) $[G_{1.0}] = 3.5 \times 10^{-4}$ M y concentraciones variables de AuNPs

La **Figura 4.8** recoge la intensidad de emisión normalizada para dos concentraciones diferentes, fijas, de dendrímico G1.0 en presencia de concentraciones variables de AuNPs. El hecho de realizar la experiencia por duplicado obedece a demostrar que la disminución de la intensidad de emisión del dendrímico se produce con independencia de la concentración del mismo, y por tanto de la intensidad I_0 registrada. Es interesante notar que el efecto de disminución de la intensidad de emisión va ligado a la presencia de núcleos metálicos en el medio; concentraciones de citrato sódico equivalentes a las presentes en las suspensiones de AuNPs no causan ningún cambio apreciable en la intensidad de emisión del dendrímico. Asimismo, es importante resaltar que debido a la presencia de una banda de absorbancia ligada a la concentración de nanopartículas en la zona del máximo de emisión del dendrímico (450 nm), las medidas presentadas han sido corregidas para eliminar el efecto de la absorción por las partículas coloreadas de una fracción de la luz emitida por el dendrímico, que causa un falso efecto de *quenching* en las observaciones experimentales. Sin embargo, como puede verse en la **Figura 4.8**, incluso tras la corrección de esta absorbancia se puede observar una disminución de aproximadamente el 30% de la emisión del dendrímico en presencia de las nanopartículas. Este efecto remanente no puede ser atribuido a una pérdida de intensidad de emisión por absorción, sino que se trata de una pérdida real de la emisión del dendrímico debida a la

interacción dendrímero-AuNPs. La disminución de intensidad de emisión relativa es demasiado pequeña para permitir la determinación de la constante de interacción a partir de medidas de emisión; sin embargo, el simple hecho de que ésta se produzca puede ayudar a caracterizar la interacción dendrímero-AuNPs.

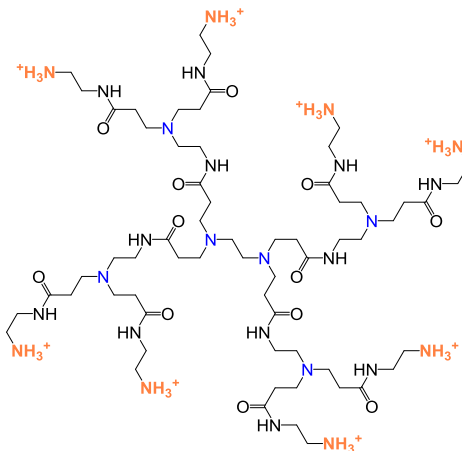


Figura 4.9 Estructura del dendrímero PAMAM de primera generación a pH 6. Los grupos amino primarios terminales, en naranja, presentan carga positiva mientras que los grupos amino terciarios internos, en azul, están desprotonados (datos obtenidos de Cakara y colaboradores, referencia [100])

La interacción dendrímero-AuNPs puede ser de carácter electrostático, entre los grupos amino externos catiónicos del dendrímero y los grupos citrato aniónicos de la superficie de la partícula, o de carácter no electrostático si involucra a los grupos internos del dendrímero, descargados, con o sin mediación de los citratos. Este último modo incluye a su vez varios modos de interacción, desde la posible formación de puentes de hidrógeno entre el citrato de la superficie de la partícula y los grupos amido del interior del dendrímero hasta una interacción directa de los nitrógenos terciarios con la superficie de oro. Sin embargo, sea cual sea la naturaleza de esta interacción, resulta claro que tiene como efecto una disminución de la emisión del dendrímero, es decir, el complejo emisivo formado con O_2 es parcialmente desplazado por la partícula durante el proceso de adsorción. Como se desarrolló anteriormente, la formación de este complejo se atribuye mayoritariamente a los grupos amino terciarios del interior del dendrímero; de esta forma, una interacción electrostática pura que solamente se llevase a cabo a través de los grupos cargados externos no debería involucrar un desplazamiento del

oxígeno del interior del dendrímtero y no daría por tanto lugar al *quenching* de fluorescencia observado. Por tanto, se propone que uno de los mecanismos de adsorción del dendrímtero sobre la superficie de la nanopartícula tiene lugar a través de interacciones tipo amino terciario-partícula de carácter no electrostático. Estas interacciones podrían a su vez coexistir con las interacciones electrostáticas amino primario-citrato, que podrían ser a su vez responsables de la formación de agregados o simplemente una vía que facilite el acercamiento del dendrímtero a la partícula.

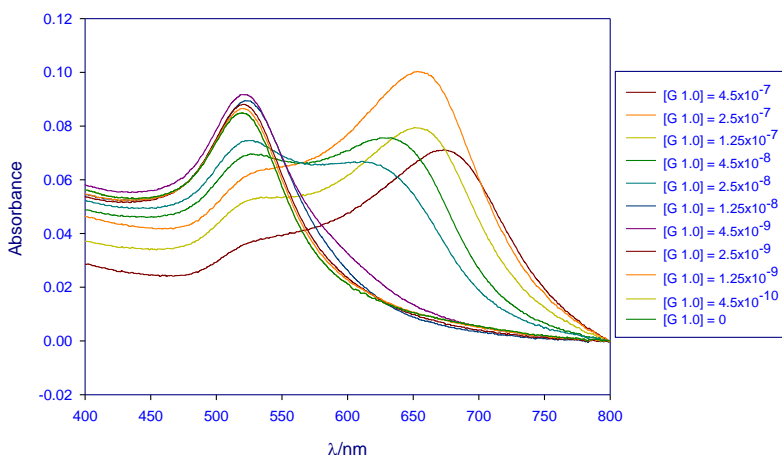
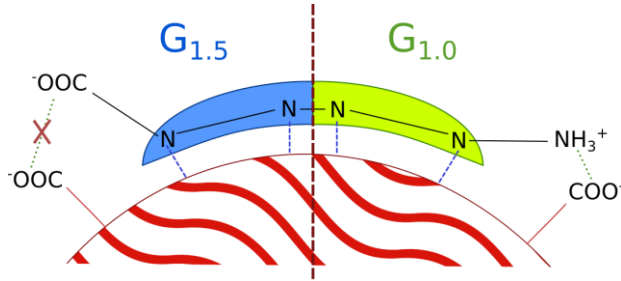


Figura 4.10: Espectros de absorción normalizados de una serie de disoluciones conteniendo [AuNPs] = $2.6 \times 10^{-10} M$ y concentraciones variables de dendrímtero PAMAM G1.5.

A fin de comprobar la hipótesis anterior, se llevaron a cabo experimentos adicionales en los cuales un dendrímtero de generación media, PAMAM G1.5, terminado en grupos carboxilo y presentando carga negativa al pH de trabajo se hacía interaccionar con nanopartículas de oro de las mismas características y bajo las mismas condiciones de trabajo anteriores. Los dendrímteros de generación media presentan carga externa negativa a pH 6 [100], con lo que la influencia de la interacción electrostática en la formación del complejo dendrímtero-nanopartícula es nula. De esta forma, en ausencia de interacciones de tipo no electrostático la formación de agregados de partículas debería ser mínima o inexistente. Como se muestra en la **Figura 4.10**, los espectros de absorción de una serie de disoluciones

de dendrímtero G1.5 a concentración fija de nanopartículas presentan una segunda banda de absorción, indicativa de la formación de estructuras agregadas, a concentraciones de dendrímtero superiores a 2×10^{-8} M.

A la vista de los espectros de absorbancia, es posible resaltar varios detalles. Por ejemplo, la concentración de dendrímtero a la cual la agregación empieza a tener lugar es ligeramente superior en el dendrímtero G1.5 que en el G1.0 (2.5×10^{-8} M para el primero, aniónico, frente a 1.5×10^{-8} M del segundo, catiónico). Sin embargo, resulta aún más llamativo el hecho de que no existe reversión de la banda a las concentraciones más altas estudiadas de G1.5, siendo estas superiores a la concentración de reversión del G1.0; en su lugar se produce un desplazamiento del máximo, $\Delta\lambda$, bastante más acusado, de 152 nm frente a los 99 nm observados en el caso del dendrímtero catiónico. Ambas observaciones apuntan a que en presencia de dendrímtero PAMAM G1.5, la formación de agregados de nanopartículas se da de forma más lenta y a lo largo de un rango más amplio de concentraciones, y que los agregados resultantes son mayores, sin que en el rango de concentraciones estudiado lleguen a observarse los efectos de disminución del tamaño que sí se dan en el caso del dendrímtero catiónico. Pese a que el tamaño del dendrímtero G1.5 es ligeramente superior, encontrándose cercano a los 2.9 nm de su contraparte catiónica (G2.0) frente a los 2.2 nm del G1.0 [108], [109], la ausencia de interacción electrostática en este caso supone que el dendrímtero debe situarse en una orientación plana sobre la partícula, que permita la interacción de los grupos internos del mismo con la superficie sin la interferencia de los grupos externos (**Esquema 4.2**). Dado que el grosor de ambos dendrímteros es similar, la contribución del diámetro de los mismos al tamaño de las estructuras agregadas es prácticamente irrelevante. Tanto el mayor valor de $\Delta\lambda$ como la ausencia de reversión apuntan a que la interacción del dendrímtero G1.5 con las nanopartículas es ligeramente menor que la que tiene lugar en presencia del dendrímtero G1.0, dando lugar a agregados de mayor tamaño a lo largo de un rango de concentraciones más amplio. Este efecto se puede explicar por el hecho de que la interacción repulsiva entre los grupos carboxilo externos del dendrímtero y los del citrato no favorece el acercamiento del dendrímtero a la nanopartícula, cosa que sí ocurre en el caso del dendrímtero catiónico. En todo caso, la formación del complejo dendrímtero-AuNPs tiene lugar tanto en presencia de interacciones electrostáticas favorables como desfavorables, lo que apunta de nuevo a los grupos terciarios internos como parte fundamental de dicho proceso.



Esquema 4.2 Modelo de interacción “plano” dendrímico-nanopartícula propuesto. Las líneas azules discontinuas indican interacciones amino-partícula de tipo no electrostático (con o sin intervención de los grupos citrato) mientras que las líneas verdes punteadas marcan las interacciones electrostáticas de los grupos externos de ambos dendrímeros con los citratos adsorbidos sobre la superficie de las nanopartículas.

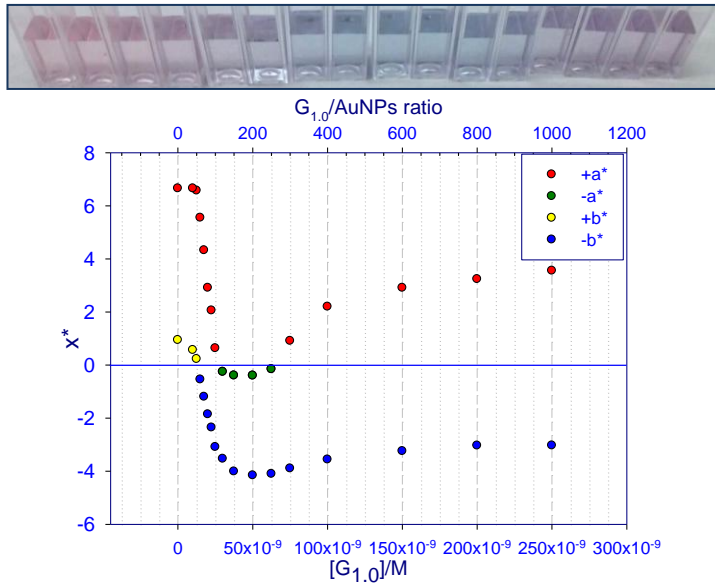
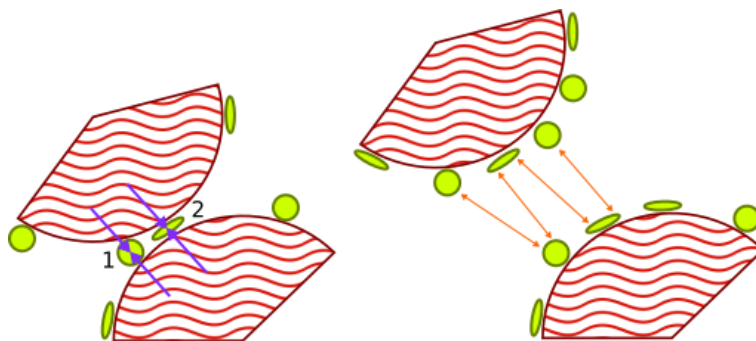


Figura 4.11 Variación de los parámetros CIELab para una serie de disoluciones conteniendo [AuNPs] = 2.5×10^{-10} M y distintas concentraciones de dendrímico G1.0. Los puntos de la gráfica están coloreados según parámetro y signo de acuerdo con el tono que representan. La fotografía muestra el color de las disoluciones para $[G_{1.0}] = 1 \times 10^{-8}$ a 2.5×10^{-7} M.

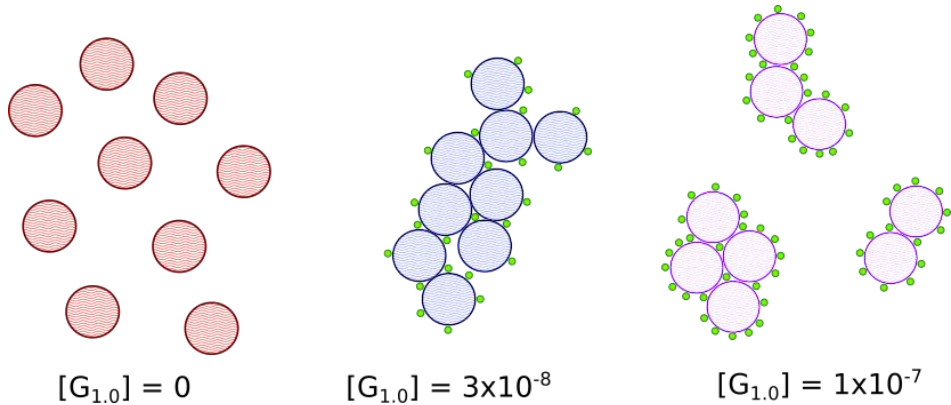


Esquema 4.3: A la izquierda, mecanismos de agregación de las nanopartículas a concentraciones bajas de dendrímero: (1) interacción de tipo electrostático NH_3^+ /citrato, (2) interacciones de tipo no electrostático amino/partícula. A la derecha, mecanismo de desagregación por repulsión electrostática NH_3^+ / NH_3^+ a concentraciones altas de dendrímero.

Como ya se ha desarrollado, el color de una suspensión de nanopartículas es un indicador clave de estado de agregación: una suspensión estable en la que las partículas se encuentren separadas será de color rojo, mientras que la aproximación de las mismas por cualquier método causará un cambio de color hacia el azul, debido a la aparición de la segunda banda de absorbancia plasmon que se señaló anteriormente (**Figura 4.6**). Los parámetros de color CIELab, que permiten la comparación cuantitativa de los cambios de color de las suspensiones, se pueden obtener de forma directa a partir de los espectros de absorbancia (véase **sección 1.2.1**) y la **Figura 4.11** muestra estos parámetros para la serie de suspensiones de nanopartículas a concentración creciente de dendrímero cuyos espectros de absorbancia se recogen en la **Figura 4.6**. Como se puede observar, incluso a bajas concentraciones de dendrímero el parámetro b^* cambia de valores positivos a negativos, indicando un cambio de tono del amarillo al azul debido al comienzo de la formación de agregados. A la vez, se produce una disminución del valor de a^* , que para disoluciones entre $[\text{G1.0}] = 3.25 \times 10^{-8} \text{ M}$ y $[\text{G1.0}] = 6 \times 10^{-8} \text{ M}$ se vuelve negativo, indicando la ausencia total de tonos rojos; estas disoluciones son completamente azules a simple vista. Para concentraciones de $[\text{G1.0}] > 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ se produce de nuevo un aumento de ambos parámetros; sin embargo, aunque los valores de a^* vuelven a ser positivos, b^* permanece negativo, dando como resultado de nuevo el color violeta que se puede apreciar en la fotografía de la **Figura 4.11** para las disoluciones más concentradas. Es interesante resaltar que el máximo observado en $\Delta\lambda$ (**Figura 4.7**) aparece también al trabajar con parámetros

colorimétricos, aunque la transición en el caso de los segundos es mucho más gradual y definida.

Los dendrímeros PAMAM de generaciones altas (4.0 y superiores, con un número de grupos externos >64) son prácticamente esféricos y presentan dos entornos diferenciados: el exterior, de carácter hidrofílico y un interior más hidrofóbico. Sin embargo, en los dendrímeros de generaciones menores, debido a su relativamente bajo peso molecular, esta diferenciación es mucho menos clara: los dendrímeros PAMAM G1.0, con solo ocho grupos terminales, son prácticamente planos y no presentan una barrera física entre las zonas interior y exterior de la molécula. Este hecho, unido a que su diámetro de sólo 2.2 nm [108], [109] es mucho menor que el de las partículas de oro, de 17.3 nm, lleva a concluir que la formación de los complejos dendrímero-AuNPs no se lleva a cabo mediante el atrapamiento de las partículas en el interior de la macromolécula, como es el caso cuando se emplean dendrímeros como grupos protectores en procesos de síntesis de partículas a partir de sales [242]–[244]. En su lugar, se plantea que la agregación de las partículas observada, sobre todo a bajas concentraciones, procede de un “puenteo” dendrímero-nanopartícula en el cuál cada molécula de dendrímero interacciona con dos o más partículas separadas, haciendo que se aproximen.



Esquema 4.4 Estructuras agregadas de nanopartículas a concentraciones crecientes de G1.0. Concentraciones menores de dendrímero dan lugar a agregados mayores con un $\Delta\lambda$ marcado y color azul, mientras que concentraciones más altas a las que la repulsión interdendrímero empieza a ser importante dan lugar a agregados de menor tamaño, con menor $\Delta\lambda$ y color morado.

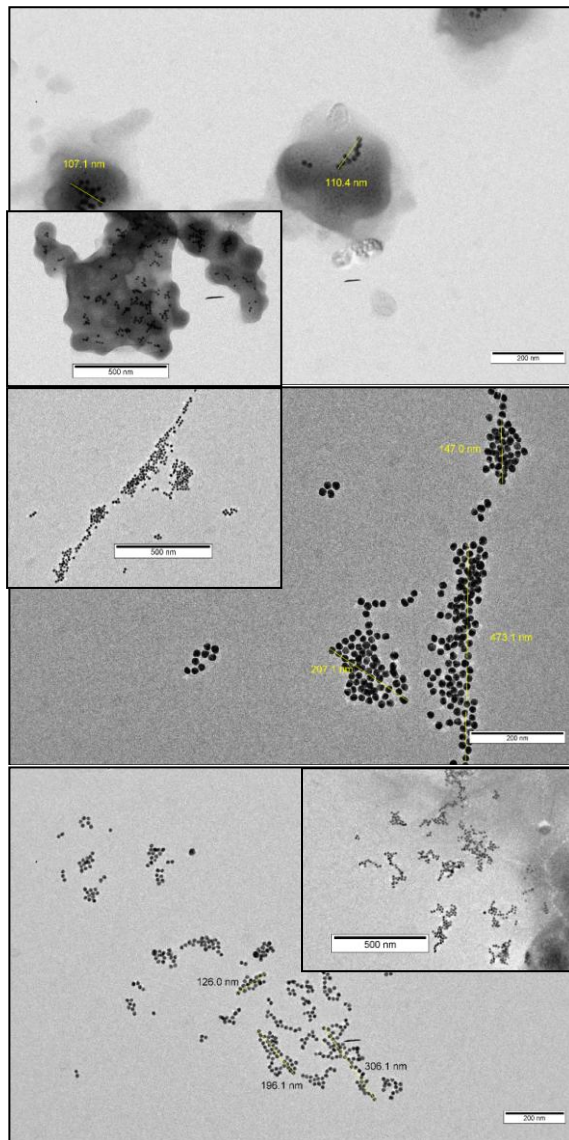
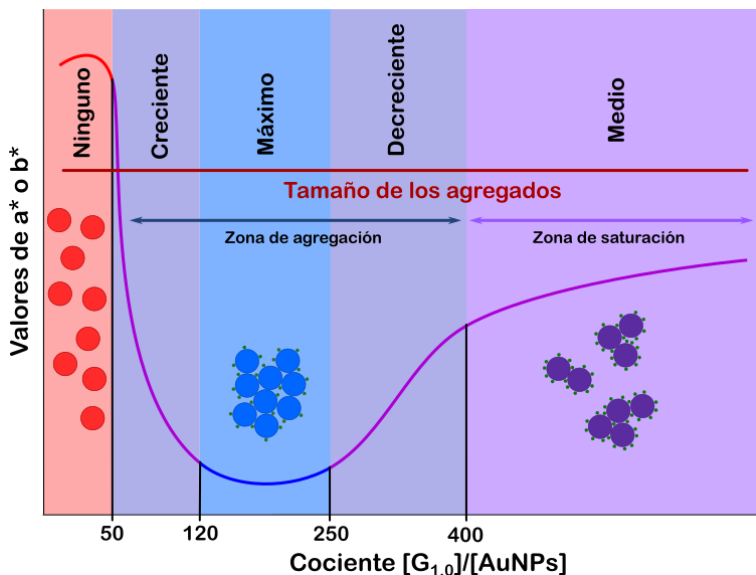


Figura 4.12 Imágenes TEM y medidas para $[Au] = 2.5 \times 10^{-10} M$ y $[G_{1.0}] = 1.5 \times 10^{-8} M$ (arriba), $[G_{1.0}] = 2.8 \times 10^{-8} M$ (centro) and $[G_{1.0}] = 8.3 \times 10^{-8} M$ (abajo). Las imágenes interiores han sido tomadas con menor magnificación.



Esquema 4.5 Tamaño de los agregados en función del cociente $[G_{1.0}]/[AuNPs]$.

Como se expuso anteriormente, la interacción dendrímero-AuNPs puede involucrar tanto el desplazamiento de iones citrato de la superficie de la partícula como el apantallamiento de su carga por la introducción de la carga positiva del dendrímero; ambos efectos afectan a la carga de las partículas y por tanto influyen en la estabilidad del coloide. Este tipo de interacción tiene un doble efecto: por un lado, se elimina parte de la repulsión citrato(-)/citrato(-) en la superficie de las partículas, lo que desestabiliza el coloide; y por otro, se añade carga positiva a la superficie de la partícula, lo que permite la aparición de interacciones dendrímero(+)/citrato(-) que contribuyen directamente al acercamiento de las partículas. A concentraciones de dendrímero bajas o medias, la mezcla de cargas positivas y negativas en la superficie de las partículas causa la agregación de las mismas, con la aparición de la banda de absorbancia en el rojo. A concentraciones altas, un exceso de dendrímero adsorbido causa que aparezca un efecto adicional en la forma de repulsiones dendrímero(+)/dendrímero(+); las nanopartículas tienen un exceso de carga positiva en su superficie, y este exceso causa un desplazamiento de la SPB a valores menores. En estas condiciones, aunque sigue apareciendo agregación, los agregados formados son de menor tamaño, debido a estas interacciones repulsivas (**Esquema 4.4** y **Figura 4.12**). Este efecto ha sido descrito

con anterioridad por el grupo de Okugaichi, trabajando con nanopartículas de carga positiva y dendrímeros PAMAM de generación media aniónicos [245]; en su trabajo, los investigadores observan que a bajas y medias concentraciones de dendrímero aparecían agregados de tipo cadena, de gran tamaño, mientras que un aumento de la concentración de dendrímero daba lugar a agregados puntuales de menor tamaño. La aparición de los segundos iba acompañada de una reversión de la banda de absorbancia hacia menores longitudes de onda, como en el caso de nuestro sistema.

Como se puede observar en la **Figura 4.11**, la máxima agregación empieza a aparecer a concentraciones de dendrímero $[G1.0] = 3 \times 10^{-8}$ M. Como $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M en estas experiencias, se requieren aproximadamente 120 dendrímeros por nanopartícula para alcanzar esta zona de máxima agregación, definida como el punto en que a^* y b^* son mínimos y $\Delta\lambda$ es máximo. Dado que el diámetro del dendrímero es de aproximadamente 2.2 nm, si se considera una forma plana un dendrímero presentaría un área de 3.8 nm². Las nanopartículas de 17.3 nm tienen un área superficial de 940 nm², por lo que un recubrimiento completo, asumiendo que se forme una monocapa, requeriría aproximadamente 250 dendrímeros. Adiciones sucesivas de dendrímero no causan cambios en el tamaño de los agregados hasta que la razón $[D1.0]/[AuNPs] = 250$, momento en que comienza a producirse la disminución del tamaño de los agregados hasta $[D1.0]/[AuNPs] = 400$. En este punto, se alcanza una zona pseudoestable de saturación de las partículas y la adición sucesiva de mayores concentraciones de dendrímero no modifica los valores de a^* ni de b^* (**Figura 4.11** y **Esquema 4.5**). A la vista de estos datos, resulta claro que la máxima agregación se produce a concentraciones de dendrímero menores de las necesarias para un recubrimiento completo; es decir, las interacciones dendrímero-nanopartículas se ven favorecidas por una situación en que las partículas presentan una mezcla de cargas positivas y negativas en la superficie. La zona de saturación de las partículas se encuentra sin embargo a concentraciones mayores que las requeridas para un recubrimiento completo, siendo el valor experimental de 400 dendrímeros/AuNPs para un valor teórico de 250 dendrímeros/AuNPs. Esta situación puede tener dos explicaciones: asumiendo que se forma una monocapa de dendrímero, es indicación de que no todo el dendrímero añadido interactúa con las partículas, sino que existe una fracción del mismo que permanece en disolución. Alternativamente, puede producirse el apilamiento de varias moléculas de dendrímero sobre la superficie de la partícula, pudiendo formarse zonas con más de una capa a concentraciones elevadas.

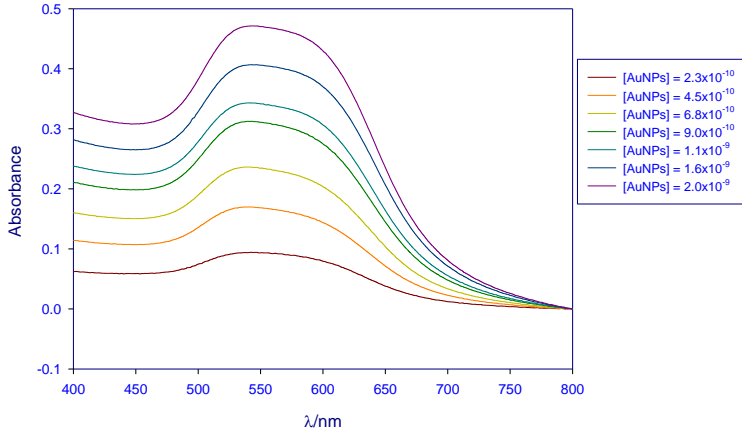


Figura 4.13 Espectros de absorbancia normalizados para disoluciones $[G1.0] = 1.4 \times 10^{-4} M$ y concentraciones variables de nanopartículas.

Una vez que se ha alcanzado la saturación, esta estabilidad se mantiene durante varios órdenes de magnitud, como se puede véase en la **Figura 4.13**, que muestra los espectros de absorbancia normalizados para una serie de disoluciones donde $[G1.0] = 1.4 \times 10^{-4} M$. Para todas las disoluciones, con independencia de la razón $[G1.0]/[AuNPs]$, se obtuvo un $\Delta\lambda$ de entre 21 y 23 nm, mientras que el valor del mismo parámetro para $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10} M$ y $[D1.0] = 1 \times 10^{-7} M$ es de 18 nm. La forma de las bandas de absorbancia no se ve afectada por la variación de las concentraciones de AuNPs, y el máximo de absorbancia permanece estable.

Para la determinación de la energía libre para el sistema G1.0/AuNPs se han seguido los modelos de dos estados y de Benesi-Hildebrand, ambos detallados en la **sección 3.2.4**. El empleo del modelo de dos estados aplicado a los parámetros colorimétricos presenta un buen ajuste, aunque con cierto error añadido al hecho de que como también ocurría en el caso de la lisozima, la reversión de los valores a concentraciones altas de ligando impide llegar a la zona estable final predicha por el modelo. Se obtuvieron valores de $43.2 \pm 2.0 \text{ kJ/mol}$ (a^*) y $-44.5 \pm 1.5 \text{ kJ/mol}$ (b^*) (**Figura 4.14**)

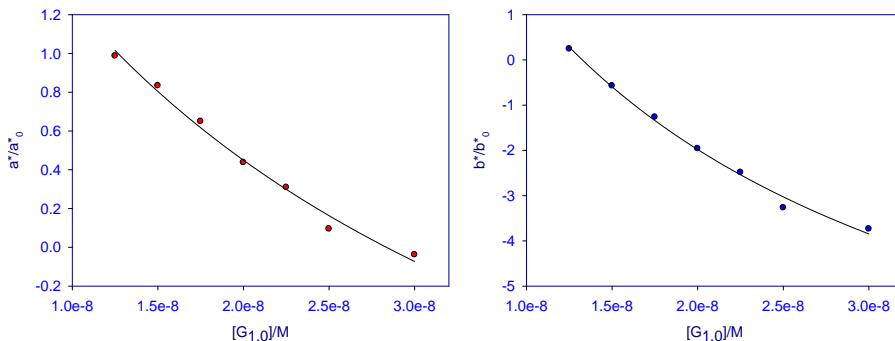


Figura 4.14 Ajuste según el modelo de dos estados para los parámetros a^* y b^* normalizados de disoluciones conteniendo $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10} M$ y concentraciones variables de G1.0.

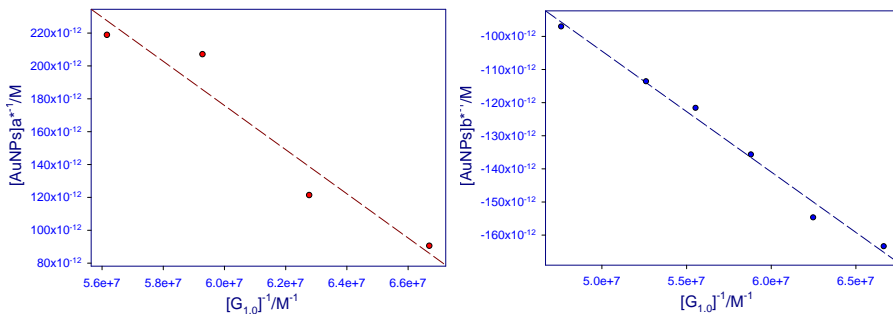


Figura 4.15 Ajuste según el modelo de Benesi-Hildebrand para los parámetros a^* y b^* normalizados de disoluciones conteniendo $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10} M$ y concentraciones variables de G1.0.

En el caso del modelo de Benesi-Hildebrand, debido a la ecuación de ajuste, el cambio de signo de a^* causa la aparición de comportamiento asintótico para aquella zona comprendida entre $-1 < a^* < 1$ (Figura 4.15). Dado que este cambio de signo se da hacia la mitad del intervalo de medida, la zona lineal del ajuste se ve marcadamente reducida; es posible ajustar antes o después de la asíntota, pero la zona central queda excluida. Debido a que el intervalo de cambio es de por sí bastante estrecho, no es posible introducir más valores entre medidas para mejorar la definición sin que la diferencia entre concentraciones acabe siendo menor al propio error experimental. Esto, sin embargo, no ocurre con los valores de b^* , dado que para ellos el cambio de signo se da al principio de la medida y no interfiere con

el intervalo lineal. Los valores de ΔG^0 obtenidos mediante este ajuste son de -44.9 ± 0.9 kJ/mol para los valores de a^* y de -41.8 ± 0.5 kJ/mol para los de b^* , confirmándose que a pesar de la estrecha zona de medida para el parámetro a^* los valores obtenidos de su análisis se encuentran en buena concordancia con aquellos procedentes del ajuste según el modelo de pseudofase.

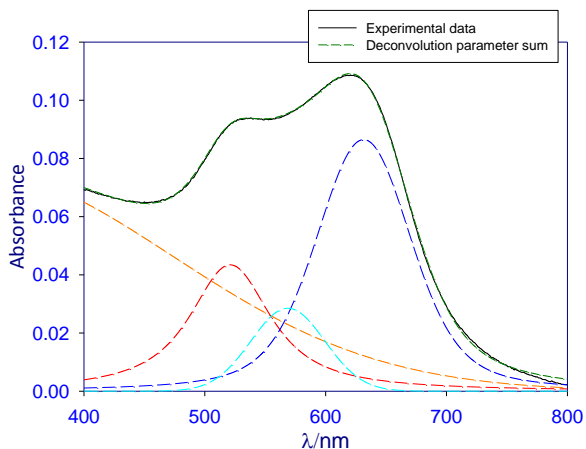


Figura 4.16 Ejemplo de deconvolución para el espectro de una disolución $[AuNPs] 2.5 \times 10^{-10} M$, $[G_{1.0}] = 3 \times 10^{-8} M$. El pico rojo corresponde a la fracción de nanopartículas libres, y los dos picos en azul claro y oscuro a dos estructuras agregadas con distribuciones de tamaño diferentes.

A fin de corroborar los valores obtenidos, se empleó un procedimiento de deconvolución análogo también al descrito en la **sección 3.2.3**. El ajuste de los datos obtenidos según el modelo de Benesi-Hildebrand presenta en este caso la ventaja de no verse afectado por cambios de signo, dado que la deconvolución da valores de área de pico que lógicamente son siempre positivos (**Figura 4.16**). Sin embargo, la dispersión de los puntos también aumenta, debido a que la precisión de los procedimientos de deconvolución es en realidad algo menor que la que se obtiene cuando se trabaja con parámetros CIELab. Es esta misma dispersión la que imposibilita el ajuste de los picos mediante el modelo de pseudofase: dado que la precisión del modelo se ve ya de por sí afectada por la ausencia de una zona final estable, la adición del error extra debido a la dispersión de los puntos acaba causando que la curva no se encuentre lo bastante bien definida como para poder

obtener un valor de energía libre válido. El valor obtenido del ajuste de Benesi-Hildebrand para los valores del área de pico correspondiente a las nanopartículas libres fue de -43.3 ± 0.5 kJ/mol (**Figura 4.17**). En general, los valores de energía libre obtenidos se encuentran en buena concordancia, con independencia del método que se emplee para su obtención (**Tabla 4.6**).

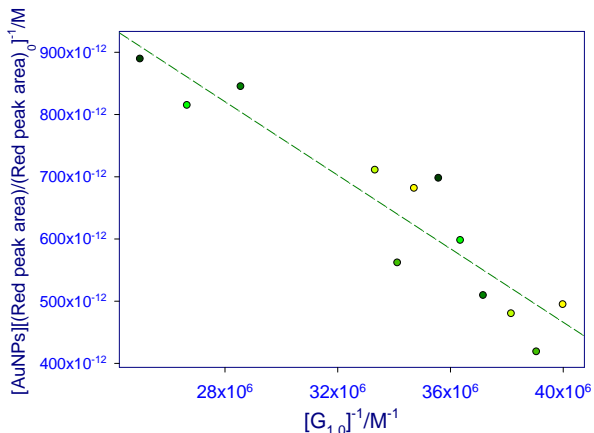


Figura 4.17 Ajuste según el modelo de Benesi-Hildebrand para el área normalizada (definida como el cociente área/área en ausencia de G1.0) del pico correspondiente a la fracción libre de nanopartículas para una serie de disoluciones donde $[AuNPs] = 2.5 \times 10^{-10}$ M.

Dendrímero PAMAM G1.0	$\Delta G^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Modelo de dos estados (CIELab)	-43.2 ± 2.0 (a*)
	-44.5 ± 1.5 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (CIELab)	-44.6 ± 0.1 (a*)
	-41.8 ± 0.5 (b*)
Método de Benesi-Hildebrand (deconvolución)	-43.3 ± 0.5

Tabla 4.6 Resumen de las energías libres del enlace G1.0/AuNPs a partir del análisis de parámetros CIELab y de deconvolución.

4.1.2.1. Conclusiones

Se ha realizado una exploración en profundidad de las interacciones de los dendrímeros de tipo PAMAM de primera generación (G1.0) con nanopartículas de oro de 17 nm protegidas por citrato. Se comprueba que incluso en presencia de concentraciones de dendrímero del orden de 10^{-8} M aparece agregación de las nanopartículas, lo que evidencia que existe una interacción relativamente fuerte dendrímero-nanopartícula. Se observó que esta interacción se reflejaba en un quenching de la fluorescencia de los dendrímeros; dado que esta fluorescencia se atribuye mayormente a los grupos amino internos de la estructura del dendrímero, su desaparición apunta a que estos grupos se encuentran involucrados en dicha interacción, que es por tanto al menos en parte de carácter no electrostático. Experiencias adicionales realizadas con dendrímeros G1.5, de carácter aniónico, demuestran que la agregación se produce incluso en ausencia de atracciones electrostáticas favorables.

A concentraciones altas de dendrímero, se produce una reducción del tamaño de los agregados, que se puede observar mediante medidas de TEM y que se refleja en un desplazamiento de la banda de agregación hacia el azul. Este efecto está en concordancia con otros estudios anteriores, y se atribuye a la aparición de fuerzas repulsivas dendrímero-dendrímero cuando el recubrimiento de la partícula se encuentra cercano al 100%. Se ha identificado también una zona estable para concentraciones de $[G1.0] = 10^{-7}$, que se mantiene sin prácticamente cambio hasta al menos $[G1.0] = 1.4 \times 10^{-4}$. Esta zona estable se corresponde con una situación de saturación de las partículas, en la cual la adición de dendrímero no hace aumentar el recubrimiento de las mismas. En base a las áreas relativas de los dendrímeros y las partículas, se propone que incluso en condiciones de agregación no todo el dendrímero que se añade al sistema se encuentra interaccionando con la superficie de las partículas, sino que existe una fracción que permanece libre en disolución.

Finalmente, se ha determinado la energía libre para el sistema a partir de los parámetros CIELab y de las áreas resultantes de ajustes de deconvolución, empleando tanto el modelo de dos estados como el de pseudofase; las energías libres obtenidas en todos los casos son coherentes entre sí.

4.2. Trabajo adicional no recogido en publicaciones

4.2.1. Determinación de la influencia de las nanopartículas comerciales de oro-citrato de 5 nm en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$

4.2.1.1. Resumen

Se ha realizado un estudio comparativo de la influencia de las nanopartículas de oro-citrato de 5 nm sobre la eficiencia ECL del sistema oxalato- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, utilizado habitualmente como estándar en las reacciones electroquimioluminiscentes. Los resultados obtenidos demuestran que la influencia de las partículas sobre el rendimiento cuántico del sistema está fuertemente ligada al estado de agregación del coloide.

4.2.1.2. Introducción

A la hora de abarcar los múltiples campos y aplicaciones que comprenden las reacciones electroquimioluminiscentes hoy en día, aquellos que involucran en un sentido u otro a nanopartículas y coloides de metales nobles ocupan un lugar de gran importancia, especialmente en los últimos años [34]–[37] (véase **sección 1.1**). Por su parte, el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ presenta dos importantes propiedades que lo hacen a su vez muy relevante a la hora de abordar estudios ECL: una de ellas, que ya se mencionó en apartados anteriores, es su accesible potencial redox que permite su empleo como especie sensibilizadora en agua y en disolventes orgánicos de uso habitual. La segunda es su fuerte tendencia a interactuar con las AuNPs a través de interacciones de tipo electrostático, permitiendo tanto la funcionalización directa de las partículas como la formación de estructuras autoensambladas para inmovilización de biomoléculas de interés o para la fabricación de electrodos modificados [246]–[249]. Sin embargo, el estudio directo de la influencia de las nanopartículas de metales nobles sin funcionalización sobre la capacidad sensibilizadora del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en conjugación con un coreactivo estándar como el oxalato sódico no ha sido llevado a cabo hasta la fecha. El presente apartado abarca el estudio del efecto producido por nanopartículas de oro-citrato de 5 nm de diámetro tanto libres como agregadas sobre el rendimiento cuántico ϕ_{ECL} del sistema. Se ha realizado un estudio de la influencia del orden de adición de los reactivos, que controla directamente el estado de agregación del sistema, de forma que es posible determinar la influencia de la formación o no de agregados de

partículas de oro debidos a la interacción AuNPs-Ru(bpy)₃²⁺ en el medio sobre el efecto del rutenio como sensibilizador ECL. En el apartado siguiente se desarrollará un estudio paralelo empleando nanopartículas de plata a fin de comparar el efecto de la variación en el núcleo metálico de la partícula sobre la influencia en el sistema electroquimioluminiscente.

4.2.1.3. Procedimiento experimental

4.2.1.3.1. Materiales y métodos

Para los estudios de reacciones ECLs se emplearon como reactivos el oxalato sódico [Riedel-de Häen, 40095] y el Ru(bpy)₃Cl₂ [Sigma-Aldrich, 224758]. El tampón para el medio de medida se preparó con Na₂HPO₄ [Sigma Aldrich, 71650], NaH₂PO₄ [Merck, 760846] y NaCl [Merck, 1.06404]. El oro coloidal de 5 nm se adquirió de Sigma Aldrich [G1402] siendo su número de lote 119K6180. Todos los reactivos se emplearon sin purificación adicional. Se trabajó en tampón fosfato-difosfato a pH 6.1 y fuerza iónica 0.01 M, y las disoluciones se prepararon empleando agua procedente de un sistema Milli-Q de conductividad menor a 10⁻⁶S/m.

4.2.1.3.2. Instrumentación

Las medidas electroquimioluminiscentes se llevaron a cabo empleando el equipamiento descrito en la **sección 3.1.3.2**. Las disoluciones de trabajo se prepararon con una concentración final de oxalato sódico [Ox] = 2x10⁻³ M, rutenio [Ru(bpy)₃²⁺] = 2x10⁻⁴ M, y [AuNPs] = 0 a 2x10⁻⁸ M.

4.2.1.4. Resultados y discusión

4.2.1.4.1. Estudio del estado de agregación de las partículas

Inicialmente, se observa que el orden de adición de los reactivos a la hora de preparar las muestras para la medida ECL influye sobre el estado de agregación del sistema. Por ello, se ensayan dos protocolos de adición: el primero de ellos (método A) sigue el orden *rutenio-oxalato-tampón-AuNPs* hasta concentraciones finales de [Ru(bpy)₃²⁺] = 2x10⁻⁴ M, [ox] = 2x10⁻³ M, [AuNPs] = 2x10⁻⁸ M y un volumen total de 5 ml. Para el segundo método (B) se añaden las nanopartículas al inicio siguiendo el orden *AuNPs-tampón-rutenio-oxalato* para las mismas concentraciones y volúmenes finales.

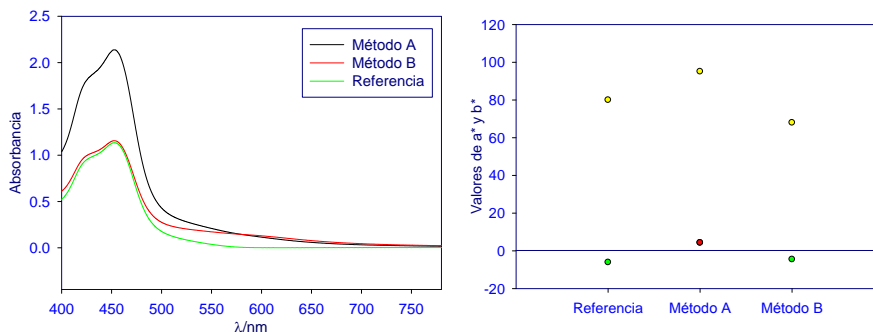


Figura 4.18 Espectros de absorbancia (izquierda) y parámetros CIELab (derecha) para ambos métodos de adición y para una disolución de referencia conteniendo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Debido a la fuerte coloración de la sal de rutenio, derivada a su vez de la fuerte absorción de la sal en el visible, ni la aparición del tono azul debido a la agregación de las partículas ni la de la banda de agregación a $\lambda > 600 \text{ nm}$ son claramente apreciables a simple vista, aunque en el espectro del método B se observa la ausencia de la banda de absorbancia centrada sobre 510 nm y debida a la presencia de nanopartículas libres (véase **Figura 4.18**). Por ello, se obtuvieron además los parámetros CIELab según el sistema descrito en la **sección 3.2.3.2** para las disoluciones preparadas por ambos métodos y para la referencia, conteniendo únicamente $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Los resultados, reflejados también en la **Figura 4.18**, recogen la aparición de valores de a^* positivos (indicando una tonalidad rojiza) para el método A. Por su parte, el método B presenta valores de a^* negativos, indicando ausencia de tonos rojos, igual que la referencia; sin embargo, respecto a ésta se observa una bajada notable del valor de b^* correspondiente a un desplazamiento hacia la parte azul, negativa, del eje. Estos tonos son indicativos de una situación de agregación de las partículas añadidas en el método B, que sin embargo no se produce al emplear el método A, donde la coloración roja, aunque enmascarada por el color amarillo intenso del rutenio, permanece incluso en presencia de los reactivos. Por tanto, el método A conduce a una situación de no agregación o de agregación muy parcial, mientras que en el método B se produce la formación de agregados de mayor tamaño con la aparición de una absorción en el rojo. De esta forma, es posible analizar la influencia de la formación o no de agregados en la eficiencia ECL del sistema $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}/\text{AuNPs}$.

4.2.1.4.2. Medidas electroquimioluminiscentes

Se realizan medidas ECL para las disoluciones previamente analizadas, conteniendo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{ox}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{AuNPs}] = 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ según ambos métodos de adición, A y B. Se realiza también la obtención de las medidas en ausencia de nanopartículas, actuando esta última disolución como referencia.

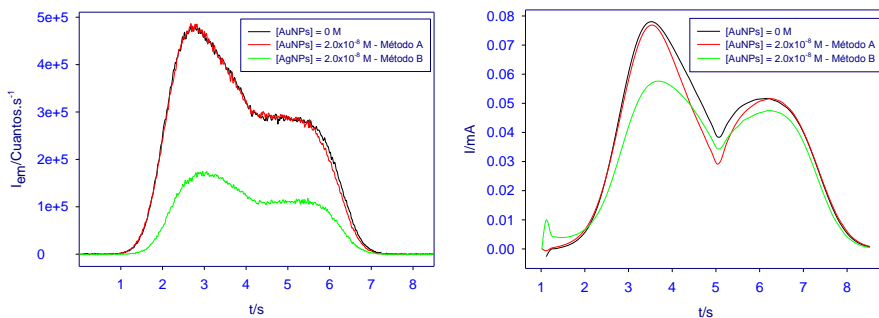


Figura 4.19 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad/tiempo (derecha) para el oxalato en ausencia de oro (negro) y para $[\text{AuNPs}] = 2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ según el método A (rojo) y según el método B (verde)

Los valores de rendimiento cuántico, ϕ_{ECL} , obtenidos son de 0.019 en ausencia de nanopartículas y de 0.019 y 0.008 cuando la adición de las mismas se realiza siguiendo el método A y B respectivamente. De estos datos se desprende que, en ausencia de agregación, la influencia de las nanopartículas a altas concentraciones sobre la eficiencia ECL del sistema es nula, como se puede observar también por la superposición de las curvas respectivas de *emisión/tiempo* e *intensidad de corriente/tiempo* (**Figura 4.19**). Sin embargo, en presencia de agregación se produce una fuerte caída, superior al 50%, del rendimiento cuántico. Esta caída viene motivada en gran parte por la pérdida de emisión ECL que se registra en condiciones de agregación de las nanopartículas.

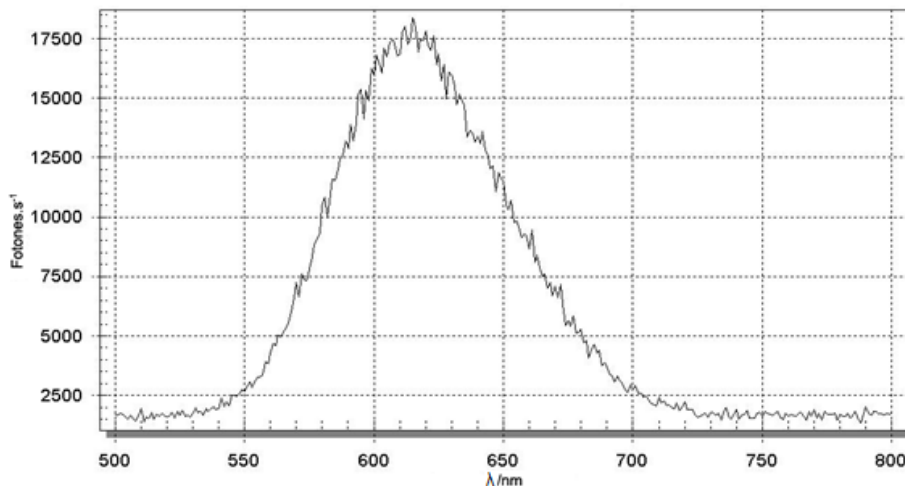


Figura 4.20 Espectro de emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ durante un proceso ECL

La pérdida de intensidad de corriente en el electrodo en presencia de agregados de partículas tiene dos posibles causas: una disminución de la concentración de coreactivo en el medio, o de especie sensibilizadora. Dado que el oxalato sódico, de carácter aniónico y sin átomos que puedan ejercer interacciones específicas con la superficie de oro de la partícula (por ejemplo, N o S) tiene escasas posibilidades de interactuar con la nanopartícula, lo más probable es que la causa de la disminución observada sea debida a interacciones del ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, cuya tendencia a interactuar con las AuNPs se conoce y ha sido descrita con anterioridad [76]. De esta forma, una disminución de la intensidad de corriente se puede relacionar con la adsorción del rutenio en la superficie de la partícula. En ausencia de agregación, aunque la movilidad del ion se reduce tras la adsorción, el efecto no tiene una influencia marcada sobre su capacidad sensibilizadora. En condiciones de agregación, sin embargo, el rutenio se encuentra unido a una estructura de tamaño mucho mayor que una partícula aislada, cuya movilidad se encuentra mucho más impedida, y puede quedar adsorbido en los huecos del interior de la nanoestructura. Ambos casos implican una fuerte reducción de la movilidad del ion y de la posibilidad de contacto físico con el electrodo, imprescindible para generar la especie $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$.

La disminución de la intensidad de emisión ECL puede ser además atribuible a la existencia de procesos de *quenching*, ya sea estático o dinámico, en presencia de las

nanopartículas. Dado que la agregación del sistema es debida, al menos parcialmente, a su interacción con el ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, la existencia de procesos de *quenching* estático, es decir, que el complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{AuNPs}$ no sea emisivo no es descartable. Tampoco lo es que las nanoestructuras formadas en los procesos de agregación, comparativamente grandes, faciliten la desactivación por choque, no radiativa, de las moléculas de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, dando lugar a un proceso de *quenching* dinámico. Otra posibilidad se encuentra en el hecho de que el espectro de emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (Figura 4.20) durante un proceso ECL es muy similar al espectro habitual de emisión de esta especie, presentando un máximo sobre $\lambda = 620$ nm. Durante un proceso de agregación de nanopartículas de oro, la banda de absorbancia formada se localiza habitualmente en una zona amplia comprendida entre los 600 y los 700 nm, variando su forma y posición exacta con la naturaleza de los agregados formados. De esta forma, a una concentración de nanopartículas elevada y en presencia de agregación es de esperar una amortiguación de la cantidad de emisión debida a la absorción de la misma por las nanopartículas presentes en el medio. En ausencia de agregación, este efecto no está presente, con lo que la emisión ECL observada permanece constante.

4.2.1.5. Conclusiones

Se ha realizado un estudio preliminar de la influencia de las nanopartículas de oro en la eficiencia ECL del sistema oxalato/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Se ha comprobado que esta influencia es mínima en condiciones de no agregación del sistema, mientras que en presencia de nanoestructuras procedentes de la agregación de las partículas se produce una disminución tanto de la intensidad de corriente registrada durante el proceso como de la emisión luminosa, disminuyendo esta última en mayor proporción. Estos efectos se han correlacionado con la tendencia del ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ a interactuar con las partículas de oro aniónicas. En presencia de agregación, el efecto combinado de dicha adsorción en la superficie de los agregados formados y de absorción de luz en la zona de emisión del rutenio por parte de las nanopartículas causa una caída importante del rendimiento cuántico ϕ_{ECL} .

4.2.2. Síntesis y optimización de la estabilidad de nanopartículas de plata-citrato de 5 nm y su influencia en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$

4.2.3. Resumen

Se ha llevado a cabo el desarrollo y optimización del procedimiento de síntesis y estabilización de nanopartículas de plata protegidas por citrato de 5.5 nm de diámetro a partir de rutas de síntesis descritas en la bibliografía, a fin de adaptar las características del coloide a las necesidades del sistema ECL. Posteriormente, se ha comprobado la influencia de las nanopartículas de plata obtenidas en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, encontrándose que ésta es independiente del estado de agregación de las partículas y en ambos casos mucho menor a la que aparece en el caso de las nanopartículas de oro de diámetro similar.

4.2.3.1. Introducción

Siguiendo el estudio previo en que se realizó el análisis de la influencia de las nanopartículas de oro-citrato de 5 nm sobre la eficiencia ECL de la reacción estándar $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, se busca ahora comprobar la influencia de la naturaleza del núcleo metálico sobre dicha eficiencia ECL. Dado que las nanopartículas de plata-citrato de 5 nm no se encuentran disponibles comercialmente, el primer paso de dicho estudio es el desarrollo de una síntesis de nanopartículas cuyas características de estabilidad y diámetro las hagan apropiadas para la obtención de resultados comparables. Para ello, se ha partido de una síntesis de semillas descrita por Murphy et al. [250] modificada ligeramente para permitir la obtención de suspensiones estables en las condiciones experimentales disponibles. Los sistemas resultantes presentan una mayoría de partículas de 5.5 nm de diámetro. Sobre la síntesis final se ha llevado a cabo un estudio completo de estabilidad para determinar la concentración máxima posible en el medio de cationes mono y divalentes que no influye en la estabilidad de los coloides. Obtenidos estos límites de estabilidad, se desarrolla un estudio de la misma en presencia de concentraciones adicionales de citrato sódico, de efecto estabilizante en concentraciones moderadas cuando se añade con posterioridad a la obtención de las partículas. De esta forma, se ha mejorado la estabilidad de los nanosistemas y su resistencia a la agregación. Finalmente, se realizó la obtención de los datos de

eficiencia ECL en presencia y ausencia de citrato estabilizante, lo que permitió comparar la eficiencia ECL del sistema oxalato/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en presencia de partículas independientes de plata y en condiciones de agregación completa.

4.2.3.2. Procedimiento experimental

4.2.3.2.1. Materiales y métodos

Para la síntesis de las nanopartículas de plata se emplearon como reactivos AgNO_3 [Sigma-Aldrich, 209139], citrato trisódico [Riedel-de Häen, 32320] y borhidruro sódico [Panreac, 163314.1608]. En las pruebas posteriores se emplearon además NaCl [Merck, 1.06404] y CaCl_2 [Merck, 102378]. Para las medidas de eficiencia ECL se empleó oxalato sódico [Riedel-de Häen, 40095] y $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ [Sigma-Aldrich, 224758] y se trabajó en tampón fosfato-difosfato de pH 6.1 y fuerza iónica 0.01 M que contenía Na_2HPO_4 [Sigma Aldrich, 71650], NaH_2PO_4 [Merck, 760846] y NaCl . Todos los reactivos se emplearon tal cual se adquirieron, sin purificación adicional. Las disoluciones se prepararon con agua procedente de un sistema Milli-Q de conductividad menor a 10^{-6}S/m .

La síntesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, a partir de una disolución de AgNO_3 0.125 mM y citrato sódico 0.25 mM. Tras agitar durante cinco minutos para homogeneizar la disolución, se añadió NaBH_4 en frío (0.1 M) hasta una concentración final de $2.5 \times 10^{-3}\text{M}$; en este momento la disolución cambia de color debido al inicio de la reducción de las sales de plata. Se mantuvo la agitación durante 24 horas a fin de permitir la reducción completa del metal. El coloide resultante se caracterizó empleando medidas de microscopía de transmisión electrónica (TEM) y analizando las imágenes obtenidas mediante el programa ImageJ.

4.2.3.2.2. Instrumentación

Las medidas de microscopía de transmisión electrónica y la obtención de espectros de absorbancia y emisión se llevaron a cabo empleando los procedimientos y condiciones descritos en la **sección 3.2.3.2**. En el caso de los espectros de absorbancia, se trabajó a concentraciones fijas de plata [AgNPs] = $2.5 \times 10^{-9}\text{M}$ y variables del resto de reactivos; para las medidas de fluorescencia se trabajó a concentraciones de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ = 10^{-4}M y 10^{-5}M y concentraciones de plata [AgNPs] = 0 a $2.5 \times 10^{-8}\text{M}$

Para las medidas de ECL se empleó el equipamiento descrito en la **sección 3.1.3.2**.

Las concentraciones de trabajo fueron: oxalato sódico $[\text{Ox}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, rutenio $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, y $[\text{AgNPs}] = 0 \text{ a } 2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$.

4.2.3.3. Resultados y discusión

4.2.3.3.1. Caracterización del coloide

El análisis del tamaño de partícula del coloide se llevó a cabo a partir de las imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) una de las cuales se muestra en la **Figura 4.21**. Un análisis del tamaño de partícula empleando el software ImageJ sobre una muestra de 440 partículas arroja un valor medio de $6.2 \pm 1.7 \text{ nm}$, siendo el tamaño predominante de alrededor de 5.5 nm (Figura 4.22); esta discrepancia se debe a la forma no exactamente gaussiana de la curva de distribución de tamaños, que presenta una “cola” de partículas de mayor tamaño también visibles en la imagen TEM. Como se puede apreciar, las partículas obtenidas son aproximadamente esféricas, presentando una esfericidad media de 0.61; este valor marcadamente inferior a 1 se debe a la aparición de facetas y caras irregulares características de las partículas de plata y que se encuentran ausentes en las de oro (véase **Figura 4.12**). Sin embargo, no se aprecia la formación de partículas de forma alargada o acicular, ni de deformaciones debidas a la fusión de varias partículas durante la síntesis.

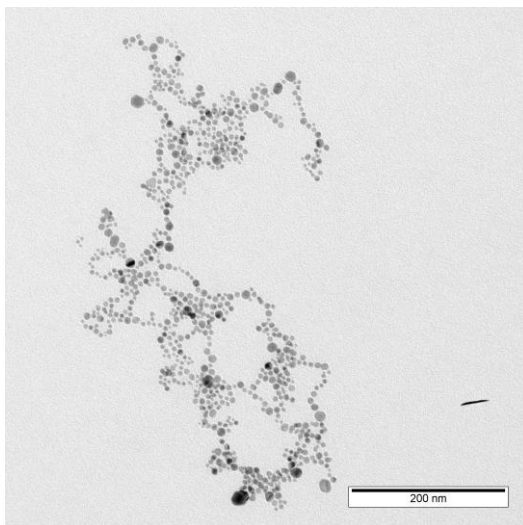


Figura 4.21 Imagen obtenida mediante TEM de la síntesis descrita

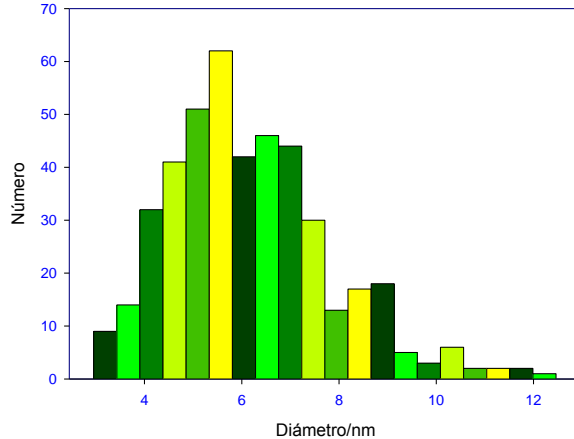


Figura 4.22 Distribución de tamaño de partícula obtenido

4.2.3.3.2. Estabilidad ante cationes mono y divalentes

Dado que las nanopartículas de plata obtenidas se encuentran protegidas por citrato, su estabilidad en suspensión dependerá de la carga negativa del mismo en el medio; la neutralización parcial o total de dicha carga permite el acercamiento de las partículas, causando su agregación. Como paso previo a la determinación de la influencia de la fuerza iónica y de los cationes del medio en las medidas de ECL, y a fin de controlar el estado de agregación de las partículas en las condiciones de medida, se determinó la estabilidad del coloide obtenido ante distintas concentraciones de iones, tanto monovalentes (Na^+) como divalentes (Ca^{2+}) en el medio.

La **Figura 4.23** muestra el desplazamiento de la banda plasmon de las nanopartículas de plata sintetizadas en presencia de distintas concentraciones de cloruro sódico. Como se puede apreciar en la figura, concentraciones por encima de $[\text{NaCl}] = 10^{-4}$ M causan un ligero aumento de la intensidad de la banda plasmon, acompañado de un desplazamiento hacia el rojo que se atenúa al aumentar la concentración. Por encima de $[\text{NaCl}] = 10^{-2}$ M se produce la precipitación del sistema, que pasa directamente a formar polvo de plata metálico en suspensión (causando un levantamiento de la línea base del espectro) sin que prácticamente se produzca aparición de bandas de agregación intermedias.

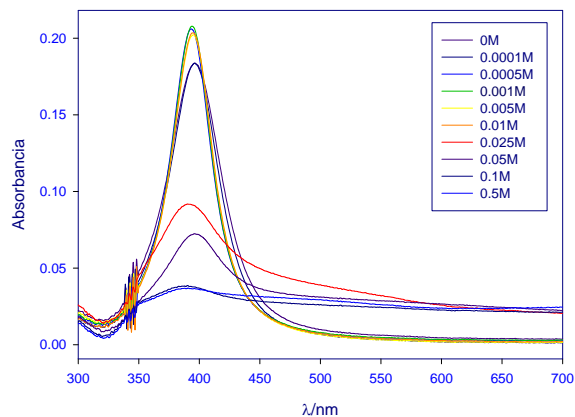


Figura 4.23 Espectros de absorbancia de una suspensión de $[AgNPs] = 4.9 \times 10^{-9} M$ a concentraciones variables de NaCl.

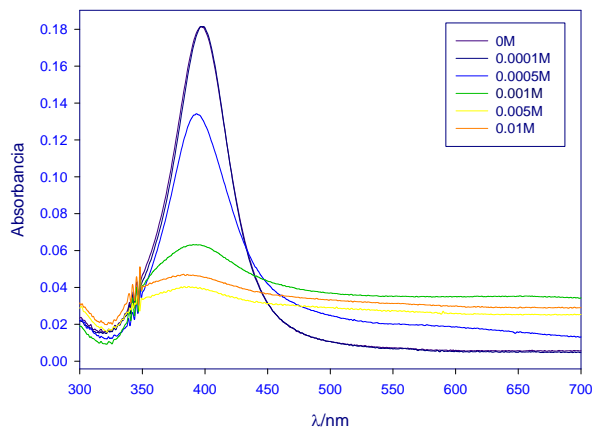


Figura 4.24 Espectros de absorbancia de una suspensión de $[AgNPs] = 4.9 \times 10^{-9} M$ a concentraciones variables de $CaCl_2$.

En la **Figura 4.24** se puede observar el efecto de distintas concentraciones de $CaCl_2$ sobre la banda plasmon de la suspensión. En este caso, se comprueba que la sensibilidad del sistema es aún mayor, apareciendo agregación del sistema a concentraciones superiores a $[CaCl_2] = 10^{-4} M$ y precipitación completa para

concentraciones superiores a $[\text{CaCl}_2] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

De las dos experiencias anteriores se desprende que, en ausencia de interacciones específicas, el límite de estabilidad de la síntesis obtenida es dos órdenes de magnitud inferior en el caso de los cationes divalentes sobre los monovalentes. Esta observación concuerda bien con otras anteriores, por ejemplo con Baalousha et al. [251] donde trabajando con nanopartículas de plata-citrato de $17 \pm 6 \text{ nm}$ se obtienen límites de estabilidad de $1.2 \times 10^{-1} \text{ M}$ para el NaCl y de $2.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ para el CaCl₂; la discrepancia entre los valores exactos con los del presente estudio se puede atribuir a las características propias de ambas síntesis. El llamativo retroceso de la banda plasmon de la plata en presencia de concentraciones diluidas de NaCl corresponde a una pequeña disminución del diámetro de las partículas. Este efecto es debido a la tendencia de las AgNPs a disolverse en presencia de iones Cl⁻ [65], [252], generando la precipitación de cantidades pequeñas de AgCl insoluble; este efecto, a bajas concentraciones de sal, prevalece sobre la agregación de las partículas. Aunque el efecto también ocurre en presencia de CaCl₂, la mayor inestabilidad de las partículas en presencia del ion Ca²⁺ no permite que se aprecie la disminución de diámetro.

4.2.3.3.3. Medidas ECLs en presencia de AgNPs con agregación total

Conocido el límite de estabilidad de las AgNPs ante cationes divalentes, se comprueba que la concentración de Ru(II) ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$) necesaria en el medio para llevar a cabo la determinación de la eficiencia ECL se encuentra por encima del límite de estabilidad encontrado, incluso en ausencia de interacciones específicas Ru(bpy)₃²⁺-AgNPs y sin tener en cuenta la posible influencia de la formación de una porción de cationes trivalentes Ru(bpy)₃³⁺ durante el proceso de medida. A estos efectos hay que añadir además la fuerza iónica del medio debida al oxalato sódico ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$). Es de esperar por tanto que durante las medidas electroquimioluminiscentes el sistema de partículas se encuentre agregado por completo.

Las medidas ECL realizadas en estas condiciones y en presencia de concentraciones de plata $[\text{AgNPs}] = 9.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ y $[\text{AgNPs}] = 2.7 \times 10^{-8} \text{ M}$ arrojan valores de $\phi_{\text{ECL}} = 0.022$ y $\phi_{\text{ECL}} = 0.018$ respectivamente, apareciendo en ambos casos precipitado de plata metálica durante la preparación de la muestra. En ausencia de nanopartículas de plata y en condiciones de fuerza iónica equivalente el rendimiento cuántico ϕ_{ECL} fue de 0.019. A concentraciones de AgNPs agregadas comparables a las de AuNPs empleadas en el apartado anterior (véase **sección 4.2.1**) la variación de los valores

de ϕ_{ECL} se encuentra dentro de la incertidumbre experimental. Por tanto, se puede considerar que no hay variación del rendimiento cuántico en presencia de nanopartículas de plata agregadas. Como se puede observar en la **Figura 4.25**, tanto la intensidad de emisión ECL como los valores de intensidad de corriente que se obtuvieron para los tres casos fueron marcadamente similares.

En contraste con el caso observado para las nanopartículas de oro de 5 nm, la agregación en el caso de las AgNPs no causa una caída de ϕ_{ECL} . La razón de que la bajada de emisión observada para el caso del oro (véase **sección 4.2.1.4.2**) se encuentre ausente en el caso de la plata es clara: los agregados de plata macroscópicos, aunque causan cierta dispersión de luz, no causan aparición de bandas de absorbancia en la zona de emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, como ocurría en el caso de las AuNPs; para las nanopartículas de plata la intensidad de emisión se mantiene constante.

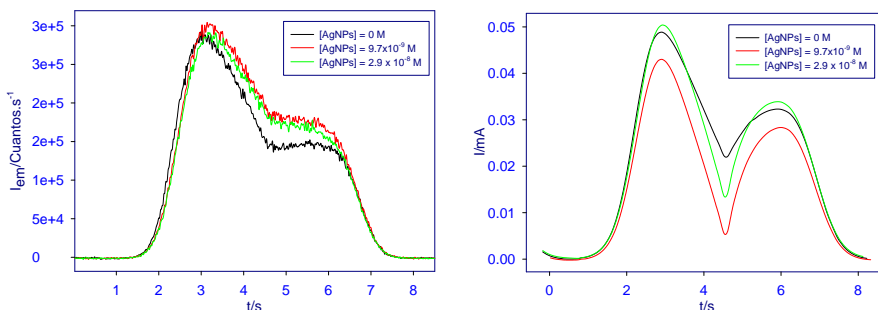


Figura 4.25 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad de corriente/tiempo (derecha) para la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{oxalato}$ en ausencia de plata (negro) y para $[\text{AgNPs}] = 9.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ (rojo) y $2.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ (verde)

4.2.3.3.4. Estabilización de la suspensión AgNPs

A la vista de los resultados, se plantea la posibilidad de registrar las medidas de ECL en un sistema que no presente agregación total de las nanopartículas de plata. Dado que el límite de estabilidad de las mismas, como se mencionó anteriormente, se encuentra bastante por debajo del requerido para registrar las medidas electroquimioluminiscentes con una intensidad adecuada, es necesario aumentar la estabilidad de la suspensión coloidal. Esta estabilización no debe además implicar

agentes que puedan afectar a la intensidad ECL, por interacción con el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$ o con el $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ o por presentar efecto coreactivo propio. Se elige por ello realizar una estabilización de la suspensión por adición de citrato sódico. En cantidades elevadas, el citrato sódico causa la agregación del sistema debido al aumento de la fuerza iónica del medio; sin embargo, en aquellos coloides donde se emplea como agente protector, la adición post-síntesis de concentraciones pequeñas de citrato sódico ($[\text{Cit}]$) tiene como efecto la estabilización de las suspensiones coloidales.

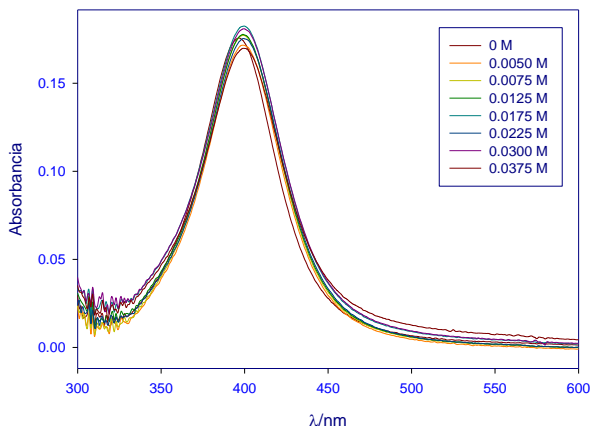


Figura 4.26 Espectros de absorción de una suspensión de $[\text{AgNPs}] = 4.9 \times 10^{-9} \text{ M}$ y concentraciones variables de citrato sódico.

En la **Figura 4.26** se puede observar el efecto de la adición de citrato sódico sobre la estabilidad del coloide. Incluso a concentraciones muy pequeñas, se produce un ligero desplazamiento del máximo de absorción original de aproximadamente 5 nm, sin aparición de bandas u hombros que indiquen agregación ni ensanchamiento de la banda original. Este efecto puede ser debido a distintas causas: por ejemplo, a un cambio del entorno dieléctrico de la partícula debida a la adsorción de citrato adicional en su superficie. Además, la adición de citrato sódico, incluso a temperatura ambiente, puede causar la reducción de una pequeña cantidad de iones Ag^+ residuales en la suspensión coloidal causando un ligero aumento del tamaño de partícula. En cualquier caso, el desplazamiento de banda observado permanece constante para todas las concentraciones de citrato sódico estudiadas. Por encima de $[\text{Cit}] = 7.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ se produce un levantamiento de la

línea base debido a agregación del sistema; por tanto, esta concentración constituye el límite superior de estabilidad.

Debido a los mencionados efectos contrapuestos del citrato en la estabilidad de las suspensiones coloidales, a continuación es necesario comprobar si la adición del mismo en concentraciones de no agregación causa una estabilización del sistema o, por el contrario, la fuerza iónica añadida al medio lo hace más sensible al resto de iones.

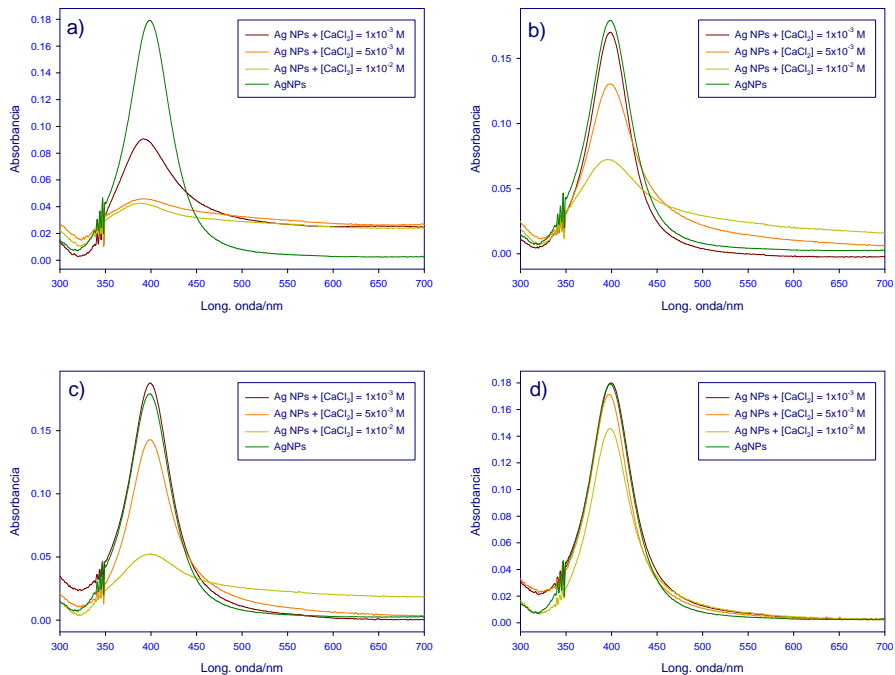


Figura 4.27 Agregación de una suspensión $[AgNPs] = 4.9 \times 10^{-9} M$ a) en ausencia de citrato sódico, b) en presencia de $[Cit] = 5 \times 10^{-3} M$, c) $[Cit] = 7.5 \times 10^{-3} M$, d) $[Cit] = 1.3 \times 10^{-2} M$

La **Figura 4.27** muestra el efecto de la adición de citrato sobre la agregación en presencia de cationes divalentes Ca^{2+} . Como se puede observar, la mejor protección frente a la agregación se obtiene con la concentración de citrato más alta, $[Cit] = 1.3 \times 10^{-2} M$, comprobándose de esta forma que la ligera inestabilización debida al

aumento de fuerza iónica del medio por adición de citrato se compensa con el efecto protector de éste. A esta concentración se consigue una estabilización casi total de disoluciones conteniendo hasta $[\text{CaCl}_2] = 10^{-2} \text{ M}$, apareciendo un pequeño grado de agregación, pero sin producirse precipitación del sistema. Es destacable además observar que el efecto de disminución del tamaño de partícula que aparece en el caso del NaCl se puede observar en la serie d) para la disolución conteniendo $[\text{CaCl}_2] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$, demostrándose así que no se trata de un efecto exclusivo del NaCl sino que es atribuible a la presencia de iones Cl^- en el medio.

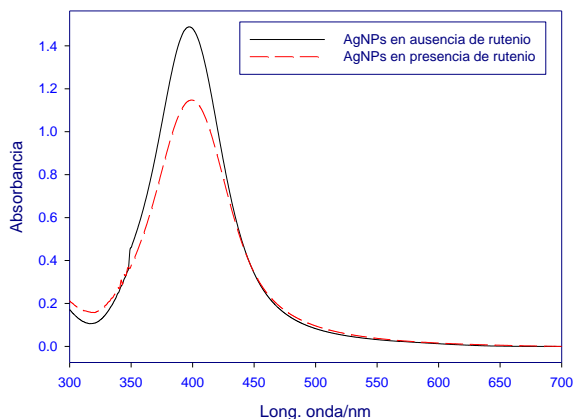


Figura 4.28 Espectro de absorción de la banda plasmónica de una suspensión de nanopartículas $[\text{AgNPs}] = 4.6 \times 10^{-8} \text{ M}$, (negro, línea continua) y realizado en las condiciones de medida ECL para la concentración de nanopartículas más elevada ($[\text{AgNPs}] = 4.6 \times 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{Cit}] = 1.3 \times 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Ox}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$; rojo, línea discontinua). A fin de visualizar las bandas de absorción de la nanopartícula con claridad, del espectro segundo se ha restado el espectro de absorción de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

Finalmente, y dado que las medidas ECL se llevan a cabo a concentraciones variables de AgNPs, se lleva a cabo una prueba adicional en la cual se comprueba la sensibilidad a la agregación de una disolución de nanopartículas lo más concentrada posible en presencia de citrato sódico. En la **Figura 4.28** se puede observar el efecto de la adición de los reactivos en las condiciones de medida para el caso de una disolución concentrada conteniendo $[\text{AgNPs}] = 4.6 \times 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{Cit}] = 1.3 \times 10^{-2} \text{ M}$. Igual que en la Figura 4.27(d), se observa una disminución de la

intensidad de la banda y un ligero ensanchamiento debido a una agregación parcial en comparación con el espectro obtenido en ausencia de reactivos. Sin embargo, no se aprecia formación de precipitado de plata ni hay levantamiento de la banda debido a dispersión de la luz por el mismo en el espectro. No aparecen tampoco bandas adicionales de agregación, indicando que la misma, aunque ocurre, se da en muy pequeño grado. Se ha conseguido por tanto la estabilización de la suspensión en presencia de cationes mono y divalentes, tanto para concentraciones diluidas como concentradas, lo que permite comparar los resultados obtenidos en presencia y ausencia de citrato sódico estabilizante.

4.2.3.3.5. Medidas ECL en presencia de AgNPs con agregación parcial

Se determinó la eficiencia ECL de una disolución $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{Ox}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $[\text{Cit}] = 1.3 \times 10^{-2} \text{ M}$ en ausencia de plata y para dos concentraciones $[\text{AgNPs}] = 5.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ y $[\text{AgNPs}] = 4.0 \times 10^{-8} \text{ M}$. En estas condiciones, se obtuvieron valores de $\phi_{\text{ECL}} = 0.017$ para la disolución en ausencia de nanopartículas, y de $\phi_{\text{ECL}} = 0.012$ y $\phi_{\text{ECL}} = 0.013$ para las disoluciones diluida y concentrada respectivamente. No existe por tanto diferencia apreciable entre ambas concentraciones de nanopartículas pese a la diferencia de un orden de magnitud entre ambas concentraciones, apreciándose una leve caída, de nuevo dentro del margen de error experimental, con respecto a la medida en ausencia de nanopartículas. Se demuestra además que la adición de citrato sódico en ausencia de coreactivo no da lugar a emisión ECL, descartándose que el mismo pudiera presentar algún tipo de efecto coreactivo propio que interfiera en el proceso de medida.

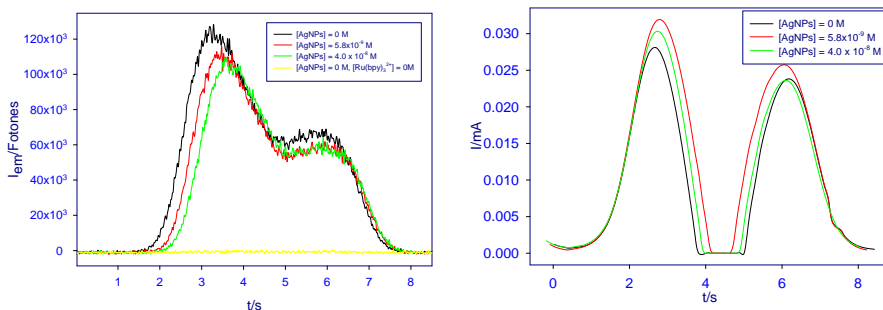


Figura 4.29 Curvas ECL emisión/tiempo (izquierda) e intensidad de corriente/tiempo (derecha) para el oxalato en ausencia de plata (negro) y para $[\text{AgNPs}] = 5.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ (rojo) y $4.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ (verde). La línea amarilla indica la emisión ECL de una disolución $[\text{Ox}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{Cit}] = 1.3 \times 10^{-2} \text{ M}$.

4.2.3.3.6. Quenching de fluorescencia

El hecho de que exista agregación de las nanopartículas de plata en presencia del ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, igual que en el caso del oro, es indicativo de la existencia de una interacción (electrostática o no) entre ambos reactivos. Cuando las nanopartículas se estabilizan por adición de citrato sódico, esta agregación se reduce al mínimo, pero el hecho de que el sistema sea más estable no implica la desaparición de estas interacciones; solamente la reducción de su influencia en la estabilidad del coloide. Dado que el sistema ECL no muestra cambio alguno en presencia o ausencia de AgNPs, la cuantificación de esta interacción ha de hacerse a través de otras vías; en este caso, se ha estudiado el quenching de la fluorescencia intrínseca del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ a dos concentraciones diferentes en presencia de nanopartículas estabilizadas con citrato. Como se demostró en los estudios precedentes, una concentración de citrato de $1.25 \times 10^{-2} \text{ M}$ en el medio es capaz de estabilizar tanto a suspensiones diluidas de AgNPs como a las más concentradas frente a las concentraciones de trabajo de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$; por ello, los estudios de quenching de fluorescencia se han llevado a cabo en presencia de citrato sódico añadido, a fin de evitar distorsiones en la banda de emisión debidas a la precipitación de plata metálica. Es además notable destacar que a diferencia de las nanopartículas de oro, las de plata no presentan banda de absorbancia alguna en la zona de emisión, por lo que no hay posibilidad de que se produzca la absorción de parte de la luz emitida por las nanopartículas.

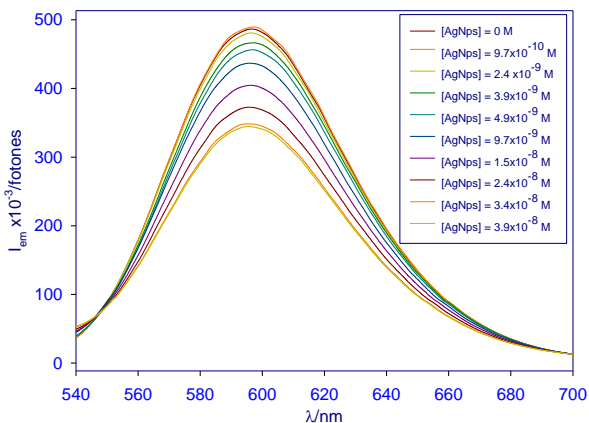


Figura 4.30 Espectros de emisión para una disolución que contiene $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{cit}] = 1.25 \times 10^{-2} \text{ M}$ y $[\text{AgNPs}] = 0$ a $3.9 \times 10^{-8} \text{ M}$

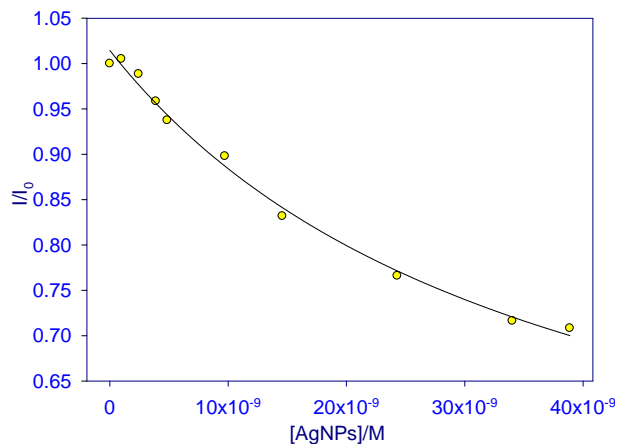


Figura 4.31 Ajuste según el modelo de pseudofase para la determinación de la constante de enlace AgNPs-Ru(bpy)₃²⁺ a partir de medidas de quenching de fluorescencia

Como se puede véase en la Figura 4.30, en presencia de AgNPs se produce un *quenching* moderado (30% a las concentraciones más altas) de la emisión del complejo Ru(bpy)₃²⁺. Esta disminución de la emisión se puede atribuir a la formación del complejo AgNPs-Ru(bpy)₃²⁺. Pese a la pequeña variación observada, el modelo de pseudofase (**Figura 4.31**; véase **sección 3.2.4**) presenta un buen ajuste, con una $K = 2.7 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ correspondiente a una energía libre $\Delta G = -42.4 \pm 0.6 \text{ kJ/mol}$.

4.2.3.4. Conclusiones

Se ha desarrollado una síntesis de nanopartículas de plata cuyo tamaño medio resulta ser de $6.2 \pm 1.7 \text{ nm}$, con predominio de partículas de 5.5 nm. Se han estudiado los límites de estabilidad de dicha síntesis sin modificar ante cationes mono y divalentes, comprobándose que la adición de citrato sódico eleva dichos límites de estabilidad hasta aproximadamente dos órdenes de magnitud por encima (desde 10^{-4} M hasta $5 \times 10^{-3} \text{ M}$) en el caso de los cationes divalentes, y se ha optimizado la concentración de citrato sódico a agregar. Se ha comprobado que tanto en ausencia como en presencia de precipitación de las partículas, el efecto sobre la eficiencia ECL del sistema oxalato-Ru(bpy)₃²⁺ es muy limitado. Finalmente, se ha realizado una primera aproximación al estudio de la interacción AgNPs-

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ mediante espectroscopía de emisión del catión rutenio, obteniéndose un valor para la constante de interacción del sistema de $2.7 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se incluye, a modo de recapitulación, una breve referencia de los resultados obtenidos en las diversas publicaciones y apartados que componen la presente Tesis Doctoral. A fin de facilitar la lectura, esta sección se subdivide en apartados, correspondiendo cada uno de ellos con una de las secciones del texto precedente.

5.1. Artículos publicados

5.1.1. Electrogenated chemiluminiscence reactions between the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium

El análisis del rendimiento cuántico ϕ_{ECL} empleando como sensibilizador la especie $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en presencia de concentraciones variables de dendrímeros PAMAM G1.0 y G2.0 de efecto coreactivo, y en condiciones de protonación completa y nula de la capa externa de ambos dendrímeros permite establecer un patrón de comportamiento común. Se observa que las concentraciones más diluidas de dendrímero dan lugar a una eficiencia coreactiva superior a la de la reacción ECL estándar $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{oxalato sódico}$, encontrándose una relación lineal y directa

entre la concentración de dendrímero y la eficiencia ECL registrada. A concentraciones altas se produce una inversión de la tendencia, observándose una caída de la eficiencia ECL con el aumento de la concentración de dendrímero. La explicación de estos efectos se correlaciona con la formación de estructuras autoensambladas de dendrímero, promovidas por la interacción del ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ con las moléculas independientes del polímero. Estas estructuras han sido observadas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (AFM), concluyéndose que a concentraciones bajas y para ambas generaciones, las estructuras predominantes son columnas de dendrímero en forma de agregados en el eje z , mientras que a altas concentraciones se produce una disminución de la altura de estos agregados favoreciéndose la formación de redes en el plano x - y . De esta forma, se infiere que la formación de agregados en z resulta en una disposición favorable de los grupos coreactivos, mientras que los agregados en x - y obstaculizan la interacción coreactivo/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$. Estas observaciones son coherentes con un efecto coreactivo ejercido mayoritariamente por los grupos amino externos del dendrímero. Este efecto se corrobora comprobando que los valores de Φ_{ECL} obtenidos en condiciones de protonación total de la capa externa del dendrímero (a pH 6.1) son marcadamente inferiores a aquellos obtenidos en ausencia de protonación (a pH 10). La variación de los potenciales redox del par $\text{Ru}^{3+/2+}$ en sentido positivo a concentraciones elevadas de dendrímero se correlaciona asimismo con la formación de macroestructuras dendriméricas que pueden formar cavidades de polaridad menor que la de la disolución donde el ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ queda retenido, disminuyendo además de esta forma su movilidad.

5.1.2. CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles

Se realiza la determinación de los parámetros colorimétricos de un sistema AuNPs/ligando donde, a priori, el ligando no presenta ninguna propiedad que pueda ser seguida por métodos espectroscópicos convencionales, pero cuya interacción con las nanopartículas de oro es capaz de inducir la agregación del sistema, que se manifiesta por un cambio de color del rojo al azul. Se emplean durante el estudio nanopartículas de oro-citrato de un diámetro medio de 17 nm y sin funcionalización adicional, y cuatro ligandos de interés biológico y biomédico cuyas características son marcadamente diferentes: la lisozima, una proteína catiónica; la adenosina, un nucleósido neutro; la lisina, un aminoácido

proteínogénico; y la tiourea, una molécula biológica de pequeño tamaño que posee un grupo sulfuro con fuerte afinidad por el oro. El análisis de los parámetros colorimétricos CIELab en función de la concentración de cada uno de los ligandos permite determinar su constante de equilibrio y la energía libre del sistema AuNPs/ligando, empleándose para ello dos métodos de ajuste matemático diferentes: el modelo de pseudofase y la ecuación de Benesi-Hildebrand. Los valores obtenidos se corroboran mediante el análisis de los espectros de absorbancia de las disoluciones de nanopartículas a través de deconvolución espectral, comprobándose que la energía libre determinada por ambos procedimientos presenta una diferencia inferior al 10% en todos los casos. Finalmente, se determina que el orden de afinidad de las biomoléculas estudiadas por el oro es Lisozima > Tiourea > Adenosina > Lisina. El empleo de medidas de *quenching* de la fluorescencia de la lisozima como comprobación adicional de la constante de interacción obtenida resulta sin embargo imposible. Esto es debido a diversos factores, entre los que se encuentran los fenómenos de absorción y dispersión de parte de la luz emitida por las nanopartículas.

5.1.3. Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence

Este artículo de revisión bibliográfica realiza un recorrido por las síntesis más comunes de nanopartículas de oro sin funcionalización adicional, tanto a escala de laboratorio como industrial, con especial énfasis en aquellos factores que influyen en el tamaño, forma y estabilidad del coloide. Se han analizado en apartados sucesivos I) la influencia del agente reductor, tanto en aquellos procesos que se dan por reducción directa de la sal de oro como en los que involucran un crecimiento en varias etapas a partir de semillas previamente sintetizadas; II) la influencia del agente estabilizante empleado durante la síntesis, sea éste distinto o no del agente reductor; III) la influencia del pH del medio, que tiene una importancia capital en la naturaleza de los polímeros de oro formados previamente al comienzo de la reducción de la sal; IV) la de la temperatura y la del orden de adición de los reactivos.

5.2. Trabajo adicional no recogido en publicaciones

5.2.1. Electrochemiluminescent (ECL) Ru(bpy)₃²⁺/ PAMAM Dendrimer Reactions: Coreactant Effect and 5Fluorouracil/Dendrimer Complex Formation

Siguiendo la línea iniciada por los estudios anteriores, se ha llevado a cabo la determinación de la influencia del 5-fluorouracil, un ligando con actividad anticancerígena y fuerte afinidad por los dendrímeros PAMAM, sobre la actividad ECL de los mismos en un sistema dendrímero PAMAM/Ru(bpy)₃²⁺. Para ello, previamente, se ha completado el estudio de la eficiencia ECL de los dendrímeros PAMAM G1.0 y G1.5 a pHs de trabajo 6.1 y 10, encontrándose que el segundo presenta los mejores valores de rendimiento cuántico ϕ_{ECL} con respecto al estándar oxalato/ Ru(bpy)₃²⁺ y que, pese a su mayor carga negativa a pH 10 que favorece el acercamiento al ion Ru(bpy)₃²⁺, los mejores resultados se obtienen en condiciones de pH 6.1. Este efecto es debido a la interacción dendrímero/Ru(bpy)₃²⁺ de naturaleza electrostática que reducen la cantidad de especie sensibilizadora en el medio. Para el dendrímero de generación completa, G1.0, un aumento del pH del medio causa la protonación de su capa externa aumentando la repulsión entre ambas moléculas y disminuyendo la eficiencia ECL. En presencia de 5-Fluorouracil, se observa un aumento del rendimiento cuántico a concentraciones diluidas y una caída del mismo a partir de [5-Fu] = 5.0x10⁻⁴ M en todos los casos, salvo para el G1.5 a pH 6.1, donde la caída se da desde las concentraciones mas diluidas. Se observa por tanto que la formación de un complejo D/5-Fu favorece la emisión ECL, mientras que la anomalía para el G1.5 a pH 6.1 se atribuye a su gran eficiencia ECL que causa que la contribución adicional debida al complejo D/5-Fu sea prácticamente inapreciable. Se comprueba además mediante una prueba de *quenching* de fluorescencia que la interacción de los dendrímeros con el 5-Fu se lleva a cabo mayoritariamente a través de los grupos aminos internos del dendrímero, lo que apunta a una posible autoagregación. La zona de caída observada para concentraciones altas del ligando se debe a la aparición de una interacción adicional Ru(bpy)₃³⁺/5-Fu, que se hace patente por el aumento de la corriente eléctrica en presencia de este último sin emisión ECL y por la subida del potencial redox de la especie sensibilizadora.

5.2.2. Understanding AuNPs interaction with low-generation PAMAM dendrimers: a CIELab and deconvolution study

La interacción de nanopartículas de oro-citrato de 17 nm con dendrímeros PAMAM G1.0, actuando estos últimos como ligandos en este caso debido a su menor tamaño y carga, ha sido estudiada a pH 6. Para ello, se ha analizado el efecto de la adición de dendrímero en los espectros de absorbancia de las nanopartículas. Estos estudios se han complementado con un análisis de los parámetros colorimétricos de las disoluciones, con una deconvolución de los espectros para la obtención de la energía libre de interacción AuNPs/dendrímero, y con un estudio de la emisión del dendrímero en presencia de AuNPs. Se comprueba que a concentraciones diluidas de dendrímero se produce la agregación del sistema con aparición del color azul característico. Sin embargo, también se observa una reversión, con disminución del tamaño de los agregados, a concentraciones elevadas, hasta alcanzar una zona de saturación. Este efecto, confirmado por medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), se debe a la elevada carga superficial del dendrímero favoreciendo la repulsión entre partículas, y por tanto la estabilización del coloide, cuando el grado de recubrimiento de las mismas es alto. Aunque los datos de fluorescencia de emisión no resultan concluyentes, sí se comprueba la existencia de un *quenching* que apunta a la existencia de una interacción entre las partículas y los grupos amino internos del dendrímero responsables de la fluorescencia. Este fenómeno se encuentra presente incluso cuando se emplean dendrímeros de carga aniónica, lo que lleva a plantear un modelo de interacción dendrímero-partícula “plano” y de naturaleza no electrostática. La determinación de las constantes de equilibrio empleando parámetros CIELab y de deconvolución arroja de nuevo valores concordantes entre ambos métodos.

5.2.3. Determinación de la influencia de las nanopartículas comerciales de oro-citrato de 5 nm en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$

La reacción ECL estándar, con el ion oxalato actuando de coreactivo y el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ como sensibilizador, ha sido estudiada en presencia y ausencia de una concentración elevada de nanopartículas de oro comerciales de 5 nm. Se ha comprobado que el estado de agregación de las mismas es clave en su influencia sobre el rendimiento cuántico de la reacción, siendo el mismo prácticamente

inexistente en ausencia de agregación.

5.2.4. Síntesis y optimización de la estabilidad de nanopartículas de plata-citrato de 5 nm y su influencia en la eficiencia ECL de la reacción $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$

Se ha llevado a cabo el diseño y optimización de un procedimiento de síntesis para nanopartículas de plata de 5.5 nm de diámetro medio y su estudio de estabilidad en presencia de diversos cationes mono y divalentes, a fin de reproducir los estudios previos de influencia sobre el rendimiento cuántico de un sistema ECL en condiciones de agregación y no agregación modificando la naturaleza del núcleo metálico. Tras la determinación de los límites de estabilidad del sistema, se ha llevado a cabo la adición de citrato sódico adicional como estabilizante consiguiéndose eliminar la precipitación del sistema en presencia del ion $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. No se observa variación apreciable de los valores del rendimiento cuántico ϕ_{ECL} ni en presencia ni en ausencia de agregación de las AgNPs. Las medidas de quenching de emisión del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ en presencia de nanopartículas de plata, que carece de bandas de absorción en la zona de emisión del complejo, permiten determinar la existencia de una interacción entre ambos y la determinación de su constante de interacción.

6. CONCLUSIONES

Objetivo 1

- Se ha estudiado un sistema ECL por coreactivo empleando dendrímeros de tipo PAMAM de generación baja (completa y media) en presencia de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ como sensibilizador y en ausencia de coreactivo adicional, comprobándose la influencia de la carga de la capa externa sobre la interacción dendrímero/ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Se ha demostrado que el estado de agregación del dendrímero, dependiente de su concentración, juega un papel crucial en su eficiencia ϕ_{ECL} .
- Se ha determinado la influencia de un ligando de naturaleza biomédica, el 5-Fluorouracil, sobre el efecto coreactivo de los dendrímeros PAMAM y se ha comprobado que las variaciones en el mismo son consistentes con la existencia de una interacción dendrímero/5-Fu.

Objetivo 2

- Se ha desarrollado un sistema colorimétrico basado en la evolución de los parámetros CIELab de un sistema de nanopartículas de oro en presencia de ligandos no coloreados para la determinación de la energía libre del sistema AuNPs/ligando, que se confirma mediante el empleo de un

procedimiento matemático de deconvolución. Se ha establecido la secuencia de afinidad de cuatro biomoléculas modelo por las nanopartículas de oro-citrato de 17 nm, quedando la misma como Lisozima > Tiourea > Adenosina > Lisina.

- Se ha estudiado en profundidad la interacción dendrímero PAMAM G1.0/AuNPs, encontrándose que los resultados son coherentes con una interacción al menos parcialmente de carácter no electrostático. Se propone un modelo de interacción dendrímero-partícula “plano” y se determina la constante de interacción y la energía libre del mismo empleando técnicas colorimétricas y de deconvolución de espectros.

Objetivos 3 y 4

- Se ha comprobado que la influencia de las nanopartículas de oro de 5 nm sobre la eficiencia ECL de un sistema oxalato/Ru(bpy)₃²⁺ es fuertemente dependiente del estado de agregación de las mismas.
- Se ha estudiado la influencia de las nanopartículas de plata de 5.5 nm sobre el sistema ECL oxalato/Ru(bpy)₃²⁺, comprobándose que su influencia sobre el rendimiento cuántico del sistema es prácticamente inexistente.

REFERENCIAS

- [1] M. M. Richter, "Electrochemiluminescence (ECL)," *Chem. Rev.*, vol. 104, no. 6, pp. 3003–3036, 2004.
- [2] W. Miao, "Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2506–2553, 2008.
- [3] W. L. Wallace and A. J. Bard, "Electrogenerated chemiluminescence. 35. Temperature dependence of the ECL efficiency of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+) in acetonitrile and evidence for very high excited state yields from electron transfer reactions," *J. Phys. Chem.*, vol. 83, no. 10, pp. 1350–1357, 1979.
- [4] N. E. Tokel-Takvoryan, R. E. Hemingway, and A. J. Bard, "Electrogenerated chemiluminescence. XIII. Electrochemical and electrogenerated chemiluminescence studies of ruthenium chelates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 20, pp. 6582–6589, 1973.
- [5] J. D. Luttmner and A. J. Bard, "Electrogenerated chemiluminescence. 38. Emission intensity-time transients in the tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) system," *J. Phys. Chem.*, vol. 85, no. 9, pp. 1155–1159, 1981.
- [6] R. S. Glass and L. R. Faulkner, "Electrogenerated chemiluminescence from the tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) system. An example of S-route behavior," *J. Phys. Chem.*, vol. 85, no. 9, pp. 1160–1165, 1981.
- [7] I. Rubinstein and A. J. Bard, "Electrogenerated chemiluminescence. 37. Aqueous ecl systems based on Ru(2,2'-bipyridine)₃²⁺ and oxalate or organic acids," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 103, no. 3, pp. 512–516, 1981.
- [8] F. R. F. Fan, "Experimental techniques of electrogenerated chemiluminescence," *Electrogenerated Chemilumin.*, pp. 359–396, 2004.
- [9] F. Kanoufi and A. J. Bard, "Electrogenerated chemiluminescence. 65. An investigation of the oxidation of oxalate by tris(polypyridine) ruthenium complexes and the effect of the electrochemical steps on the emission

- intensity," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 47, pp. 10469–10480, 1999.
- [10] W. Miao, J.-P. Choi, and A. J. Bard, "Electrogenerated Chemiluminescence 69: The Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II), (Ru(bpy)₃²⁺)/Tri-n-propylamine (TPrA) System Revisited A New Route Involving TPrA^{•+} Cation Radicals," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 48, pp. 14478–14485, 2002.
- [11] L. Hu and G. Xu, "Applications and trends in electrochemiluminescence," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 8, pp. 3275–3304, 2010.
- [12] B. D. Stringer, L. M. Quan, P. J. Barnard, D. J. D. Wilson, and C. F. Hogan, "Iridium Complexes of N-Heterocyclic Carbene Ligands: Investigation into the Energetic Requirements for Efficient Electrogenerated Chemiluminescence," *Organometallics*, vol. 33, no. 18, pp. 4860–4872, 2014.
- [13] D.-L. Ma, D. S.-H. Chan, and C.-H. Leung, "Group 9 Organometallic Compounds for Therapeutic and Bioanalytical Applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 47, no. 12, pp. 3614–3631, 2014.
- [14] X. Liu, L. Shi, W. Niu, H. Li, and G. Xu, "Environmentally friendly and highly sensitive ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridyl) electrochemiluminescent system using 2-(dibutylamino)ethanol as co-reactant," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 3, pp. 421–424, 2007.
- [15] L. Zheng, B. Wang, Y. Chi, S. Song, C. Fan, and G. Chen, "Using stannous ion as an excellent inorganic ECL coreactant for tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(ii)," *Dalt. Trans.*, vol. 41, no. 5, pp. 1630–1634, 2012.
- [16] T. Joshi, G. J. Barbante, P. S. Francis, C. F. Hogan, A. M. Bond, and L. Spiccia, "Electrochemiluminescent peptide nucleic acid-like monomers containing Ru(II)-dipyridoquinoxaline and Ru(II)-dipyridophenazine complexes," *Inorg. Chem.*, vol. 50, no. 23, pp. 12172–12183, 2011.
- [17] T. Joshi, G. J. Barbante, P. S. Francis, C. F. Hogan, A. M. Bond, G. Gasser, and L. Spiccia, "Electrochemiluminescent monomers for solid support syntheses of Ru(II)-PNA bioconjugates: Multimodal biosensing tools with enhanced duplex stability," *Inorg. Chem.*, vol. 51, no. 5, pp. 3302–3315, 2012.
- [18] A. Venkatanarayanan, K. Crowley, E. Lestini, T. E. Keyes, J. F. Rusling, and R. J. Forster, "High sensitivity carbon nanotube based electrochemiluminescence sensor array," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, no. 1,

- pp. 233–239, 2012.
- [19] B. D. Stringer, L. M. Quan, P. J. Barnard, D. J. D. Wilson, and C. F. Hogan, "Iridium Complexes of N - Heterocyclic Carbene Ligands: Investigation into the Energetic Requirements for Efficient Electrogenerated Chemiluminescence," 2014.
- [20] X. Liu, L. Shi, W. Niu, H. Li, and G. Xu, "Environmentally friendly and highly sensitive Ruthenium(II) tris(2,2'-bipyridyl) electrochemiluminescent system using 2-(dibutylamino) ethanol as co-reactant," *Angew. Chemie-International Ed.*, vol. 46, no. 3, pp. 421–424, 2007.
- [21] G. J. Barbante, N. Kebede, C. M. Hindson, E. H. Doeven, E. M. Zammit, G. R. Hanson, C. F. Hogan, and P. S. Francis, "Control of excitation and quenching in multi-colour electrogenerated chemiluminescence systems through choice of co-reactant," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 20, no. 43, pp. 14026–14031, 2014.
- [22] M. T. Carter and A. J. Bard, "Electrochemical investigations of the interaction of metal chelates with DNA. 3. Electrogenerated chemiluminescent investigation of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II) with DNA," *Bioconjug. Chem.*, vol. 1, no. 4, pp. 257–263, 1990.
- [23] M. Rodriguez and A. J. Bard, "Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. Voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II) with DNA," *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 24, pp. 2658–2662, 1990.
- [24] G. Jie, J. Yuan, and J. Zhang, "Quantum dots-based multifunctional dendritic superstructure for amplified electrochemiluminescence detection of {ATP}," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 31, no. 1, pp. 69–76, 2012.
- [25] G. Jie, J. Yuan, T. Huang, and Y. Zhao, "Electrochemiluminescence of Dendritic Magnetic Quantum Dots Nanostructure and Its Quenching by Gold Nanoparticles for Cancer Cells Assay," *Electroanalysis*, vol. 24, no. 5, pp. 1220–1225, 2012.
- [26] M. Staffilani, E. Höss, U. Giesen, E. Schneider, F. E. Hartl, H.-P. P. Josel, and L. De Cola, "Multimetallic Ruthenium(II) Complexes as

- Electrochemiluminescent Labels," *Inorg. Chem.*, vol. 42, no. 24, pp. 7789–7798, 2003.
- [27] M. Zhou and J. Roovers, "Dendritic supramolecular assembly with multiple Ru(II) tris(bipyridine) units at the periphery: Synthesis, spectroscopic, and electrochemical study," *Macromolecules*, vol. 34, no. 2, pp. 244–252, 2001.
- [28] D. N. Lee, J. K. Kim, H. S. Park, Y. M. Jun, R. Y. Hwang, W.-Y. Y. Lee, and B. H. Kim, "Polyamidoamine dendrimers functionalized with electrochemiluminescent polypyridyl Ru(II) complexes," *Synth. Met.*, vol. 150, no. 1, pp. 93–100, 2005.
- [29] D.-N. Lee, H.-S. Park, E.-H. Kim, Y.-M. Jun, J.-Y. Lee, W.-Y. Lee, and B.-H. Kim, "Synthesis of novel electrochemiluminescent polyamine dendrimers functionalized with polypyridyl ru(II) complexes and their electrochemical properties," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 27, no. 1, pp. 99–105, 2006.
- [30] F. Ma, Y. Zhang, H. Qi, Q. Gao, C. Zhang, and W. Miao, "Ultrasensitive electrogenerated chemiluminescence biosensor for the determination of mercury ion incorporating G4 PAMAM dendrimer and Hg(II)-specific oligonucleotide," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 32, no. 1, pp. 37–42, 2012.
- [31] Y. Yuan, X. Gan, Y. Chai, and R. Yuan, "A novel electrochemiluminescence aptasensor based on in situ generated proline and matrix polyamidoamine dendrimers as coreactants for signal amplification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 55, pp. 313–317, 2014.
- [32] F. Sun, F. Chen, W. Fei, L. Sun, and Y. Wu, "A novel strategy for constructing electrochemiluminescence sensor based on CdS-polyamidoamine incorporating electrodeposited gold nanoparticle film and its application," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 166–167, pp. 702–707, 2012.
- [33] C. Lu, X.-F. Wang, J.-J. Xu, and H.-Y. Chen, "Electrochemical modulation of electrogenerated chemiluminescence of CdS nano-composite," *Electrochem. commun.*, vol. 10, no. 10, pp. 1530–1532, 2008.
- [34] B. Lv, A. Ren, Y. Luo, H. Yuan, and D. Xiao, "Electrochemiluminescence of tri(2,2'-bipyridine)ruthenium in aqueous solution on a gold-nanoparticle-modified glassy carbon electrode," *Russ. J. Electrochem.*, vol. 44, no. 9, pp. 1047–1051, 2008.

- [35] W. Wang, T. Xiong, and H. Cui, "Fluorescence and electrochemiluminescence of luminol-reduced gold nanoparticles: Photostability and platform effect," *Langmuir*, vol. 24, no. 6, pp. 2826–2833, 2008.
- [36] J.-Z. Guo, H. Cui, S.-L. Xu, and Y.-P. Dong, "A new electrogenerated chemiluminescence peak of lucigenin in the hydrogen-evolution region induced by platinum nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 2, pp. 606–611, 2007.
- [37] Y.-P. Dong, H. Cui, and Y. Xu, "Comparative studies on electrogenerated chemiluminescence of luminol on gold nanoparticle modified electrodes," *Langmuir*, vol. 23, no. 2, pp. 523–529, 2007.
- [38] Y. Kim and J. Kim, "Modification of Indium Tin Oxide with Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles To Provide Enhanced Stable Electrochemiluminescence of Ru(bpy)₃²⁺/Tripropylamine While Preserving Optical Transparency of Indium Tin Oxide for Sensitive Electrochemiluminescence-Ba," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 3, pp. 1654–1660, 2014.
- [39] W. Yao, L. Wang, H. Wang, X. Zhang, L. Li, N. Zhang, L. Pan, and N. Xing, "An electrochemiluminescent DNA sensor based on nano-gold enhancement and ferrocene quenching," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 356–361, 2013.
- [40] X. Yu, Y. Chai, J. Jiang, and H. Cui, "Sensitive ECL sensor for sequence-specific DNA from Mycobacterium tuberculosis based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol functionalized gold nanoparticles labeling," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 241, pp. 45–51, 2012.
- [41] C. Ding, Q. Zheng, N. Wang, and Q. Yue, "An electrochemiluminescence strategy based on aptamers and nanoparticles for the detection of cancer cells," *Anal. Chim. Acta*, vol. 756, pp. 73–78, 2012.
- [42] C. Ding, S. Wei, and H. Liu, "Electrochemiluminescent determination of cancer cells based on aptamers, nanoparticles, and magnetic beads," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 18, no. 23, pp. 7263–7268, 2012.
- [43] E. Kerr, E. H. Doeven, G. J. Barbante, C. F. Hogan, D. J. Bower, P. S. Donnelly, T. U. Connell, and P. S. Francis, "Annihilation electrogenerated

- chemiluminescence of mixed metal chelates in solution: modulating emission colour by manipulating the energetics," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 472–479, 2015.
- [44] P. Perez-Tejeda, R. Prado-Gotor, and E. M. Grueso, "Electrochemiluminescence of the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex: The coreactant effect of PAMAM dendrimers in an aqueous medium," *Inorg. Chem.*, vol. 51, no. 20, pp. 10825–10831, 2012.
- [45] T. Smith and J. Guild, "The CIE Colorimetric Standards and their Use," *Trans. Opt. Soc.*, vol. 33, pp. 74–134, 1932.
- [46] R. W. G. Hunt and M. R. Pointer, *Measuring colour*. United Kingdom: John Wiley and Sons, 2011.
- [47] ISO/CIE, "CIE Standard Illuminants for Colorimetry," 1999. [Online]. Available: <http://www.cie.co.at/publ/abst/s005.html>. [Accessed: 01-May-2016].
- [48] W. D. Wright, "A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours," *Trans. Opt. Soc.*, vol. 30, no. 4, pp. 141–164, 1929.
- [49] J. Guild, "The Colorimetric Properties of the Spectrum," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 230, pp. 149–187, 1931.
- [50] J. Schandar (ed.), *Colorimetry: Understanding the CIE system*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2007.
- [51] OIV, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, 2014th ed. Paris (France), 2014.
- [52] R. G. Kuehni, *Color Space and its Divisions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2003.
- [53] R. W. Harold, *The Measurement of Appearance*, Second. New York: John Wiley and Sons, 1987.
- [54] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, and F. Schué, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 84, no. 2, p. 1, 2012.
- [55] K. Osseo-Asare and F. J. Arriagada, "Preparation of SiO₂ nanoparticles in a

- non-ionic reverse micellar system," *Colloids and Surfaces*, vol. 50, pp. 321–339, 1990.
- [56] J. M. Rollot, P. Couvreur, L. Roblot-Treupel, and F. Puisieux, "Physicochemical and Morphological Characterization of Polyisobutyl Cyanoacrylate Nanocapsules," *J. Pharm. Sci.*, vol. 75, no. 4, pp. 361–364, 1986.
- [57] K. Akiyoshi, S. Deguchi, H. Tajima, T. Nishikawa, and J. Sunamoto, "Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide," *Macromolecules*, vol. 30, no. 4, pp. 857–861, 1997.
- [58] M. C. Venier-Julienne and J. P. Benoit, "Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 71, no. 2, pp. 121–128, 1996.
- [59] H. Huang and X. Yang, "Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate," *Biomacromolecules*, vol. 5, pp. 2340–2346, 2004.
- [60] D. Wang, H. Liu, Y. Ma, J. Qu, J. Guan, N. Lu, Y. Lu, and X. Yuan, "Recycling of hyper-accumulator: Synthesis of ZnO nanoparticles and photocatalytic degradation for dichlorophenol," *J. Alloys Compd.*, vol. 680, pp. 500–505, 2016.
- [61] M. Hamanaka, K. Imakawa, M. Yoshida, Z. Zhao, S. Yin, X. Wu, Y. Huang, J. Wu, and T. Sato, "Synthesis and gas sensing properties of SnO₂ nanoparticles with different morphologies," *J. Porous Mater.*, pp. 1–8, 2016.
- [62] C. . Johnson, J. . Johnson, H. . Hah, M. Cole, S. Gray, V. Kolesnichenko, P. Kucheryavy, and G. Goloverda, "Mössbauer studies of stoichiometry of Fe₃O₄: characterization of nanoparticles for biomedical applications," *Hyperfine Interact.*, vol. 237, no. 1, pp. 1–10, 2016.
- [63] D. Che, D. Ding, H. Wang, Q. Zhang, and Y. Li, "Aqueous synthesis of high bright Ag₂Se-ZnSe quantum dots with tunable near-infrared emission," *J. Alloys Compd.*, vol. 678, pp. 51–56, 2016.
- [64] S. C. Lin and H. H. Al-Kayiem, "Evaluation of copper nanoparticles - Paraffin wax compositions for solar thermal energy storage," *Sol. Energy*,

vol. 132, pp. 267–278, 2016.

- [65] X. Li, J. J. Lenhart, and H. W. Walker, “Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 28, no. 2, pp. 1095–1104, 2012.
- [66] M. Daniel and D. Astruc, “Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology,” *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 293–346, 2004.
- [67] C. C. Huang, Z. Yang, and H. T. Chang, “Synthesis of dumbbell-shaped Au-Ag core-shell nanorods by seed-mediated growth under alkaline conditions,” *Langmuir*, vol. 20, no. 20, pp. 6089–6092, 2004.
- [68] M. Faraday, “The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light,” *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 147, pp. 145–181, 1857.
- [69] B. Nikoobakht and M. A. Sayed, “Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method,” *Chem. Mater*, vol. 15, pp. 1957–1972, 2003.
- [70] J. Gao, C. M. Bender, and C. J. Murphy, “Dependence of Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution,” *Langmuir*, vol. 19, no. 21, pp. 9065–9070, 2003.
- [71] R. D. Averitt, S. L. Westcott, and N. J. Halas, “Linear optical properties of gold nanoshells,” *J. Opt. Soc. Am. B Opt. Phys.*, vol. 16, no. 10, pp. 1824–1832, 1999.
- [72] W. Shi, Y. Sahoo, M. . Swihart, and P. . Prasad, “Gold nanoshells on polystyrene cores for control of surface plasmon resonance,” *Langmuir*, vol. 21, no. 4, pp. 1610–1617, 2005.
- [73] C. J. Murphy, “Materials science: Nanocubes and nanoboxes,” *Science (80-.)*, vol. 298, no. 5601, pp. 2139–2141, 2002.
- [74] P. Ndokoye, X. Li, Q. Zhao, T. Li, M. . Tade, and S. Liu, “Gold nanostars: Benzyltrimethylammonium chloride-assisted synthesis, plasmon tuning, SERS and catalytic activity,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 462, pp. 341–350, 2016.

- [75] R. W. J. Scott, O. M. Wilson, and R. M. Crooks, "Synthesis, Characterization, and Applications of Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 692–704, 2005.
- [76] E. Grueso, D. Alcantara, J. Martinez, M. Mancera, S. Penades, F. Sanchez, and R. Pradogotor, "Kinetic Approach for the Study of Noncovalent Interaction between $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pz}]^{2+}$ and Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 39, pp. 9769–9774, 2007.
- [77] D. Astruc, E. Boisselier, and C. Ornelas, "Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 4, pp. 1857–1959, Apr. 2010.
- [78] T. Frost and L. D. Margerum, "Effect of PAMAM Dendrimers on $^*[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ Emission Quenching by Ferrocyanide and on ANS Fluorescence: Quantitative Binding Parameters as a Function of Dendrimer Size, pH, and Buffer Composition," *Macromolecules*, vol. 43, no. 3, pp. 1218–1226, Feb. 2010.
- [79] K. R. Gopidas, A. R. Leheny, G. Caminati, N. J. Turro, and D. A. Tomalia, "Photophysical investigation of similarities between starburst dendrimers and anionic micelles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, no. 19, pp. 7335–7342, 1991.
- [80] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard III, "Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface-chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter," *Angew. Chemie-International Ed. English*, vol. 29, no. 2, pp. 138–175, 1990.
- [81] S. Campagna, G. Denti, S. Serroni, A. Juris, M. Venturi, V. Ricevuto, and V. Balzani, "Dendrimers of nanometer-size based on metal-complexes: luminiscent and redox-active polynuclear metal-complexes containing up to 22 metal centers," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 1, no. 4, pp. 211–221, 1995.
- [82] D. K. Smith and F. Diederich, "Functional dendrimers: Unique biological mimics," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 4, no. 8, pp. 1353–1361, 1998.
- [83] D. L. Stone, D. K. Smith, and P. T. McGrail, "Ferrocene encapsulated within symmetric dendrimers: A deeper understanding of dendritic effects on redox potential," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 5, pp. 856–864, 2002.

- [84] A. Bar-Haim, J. Klafter, and R. Kopelman, "Dendrimers as controlled artificial energy antennae," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 26, pp. 6197–6198, 1997.
- [85] P. K. Maiti, G. F. Wang, T. Çağın, and W. A. Goddard III, "Structure of PAMAM dendrimers: Generations 1 through 11," *Macromolecules*, vol. 37, no. 16, pp. 6236–6254, 2004.
- [86] G. Sui, M. Mabrouki, Y. Ma, M. Micic, and R. M. Leblanc, "A structural study of amphiphilic PAMAM (Poly(amido amine)) dendrimers in Langmuir and Langmuir-Blodgett films," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 250, no. 2, pp. 364–370, 2002.
- [87] A. E. Beezer, A. S. H. King, I. K. Martin, J. C. Mitchel, L. J. Twyman, C. F. Wain, J. C. Mitchell, L. J. Twyman, and C. F. Wain, "Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives," *Tetrahedron*, vol. 59, no. 22, pp. 3873–3880, 2003.
- [88] D. Bhadra, S. Bhadra, S. Jain, and N. K. Jain, "A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil," *Int. J. Pharm.*, vol. 257, no. 1–2, pp. 111–124, 2003.
- [89] M. A. Mintzer, E. L. Dane, G. A. O'Toole, and M. W. Grinstaff, "Exploiting Dendrimer Multivalency To Combat Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 342–354, 2012.
- [90] G. J. Kirkpatrick, J. A. Plumb, O. B. Sutcliffe, D. J. Flint, and N. J. Wheate, "Evaluation of anionic half generation 3.5-6.5 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, no. 9, pp. 1115–1122, 2011.
- [91] M. J. Pisani, N. J. Wheate, F. R. Keene, J. R. Aldrich-Wright, and J. G. Collins, "Anionic PAMAM dendrimers as drug delivery vehicles for transition metal-based anticancer drugs," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 103, no. 3, pp. 373–380, 2009.
- [92] R. K. Tekade, P. V. Kumar, and N. K. Jain, "Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon," *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 1, pp. 49–87, 2009.
- [93] M. R. Molla, P. Rangadurai, G. M. Pavan, and S. Thayumanavan,

- “Experimental and theoretical investigations in stimuli responsive dendrimer-based assemblies,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 9, pp. 3817–3837, 2015.
- [94] A. Buczkowski, S. Sekowski, A. Grala, D. Palecz, K. Milowska, P. Urbaniak, T. Gabryelak, H. Piekarski, and B. Palecz, “Interaction between PAMAM-NH₂ G₄ dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution,” *Int. J. Pharm.*, vol. 408, no. 1–2, pp. 266–270, 2011.
- [95] T. Wasiak, M. Ionov, K. Nieznanski, H. Nieznanska, O. Klementieva, M. Granell, J. Cladera, J.-P. Majoral, A. M. Caminade, and B. Klajnert, “Phosphorus dendrimers affect Alzheimer’s (A β 1-28) peptide and MAP-Tau protein aggregation,” *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 458–469, 2012.
- [96] B. Klajnert, T. Wasiak, M. Ionov, M. Fernandez-Villamarin, A. Sousa-Herves, J. Correa, R. Riguera, and E. Fernandez-Megia, “Dendrimers reduce toxicity of A β 1-28 peptide during aggregation and accelerate fibril formation,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 1372–1378, Mar. 2012.
- [97] O. Klementieva, N. Benseny-Cases, A. Gella, D. Appelhans, B. Voit, and J. Cladera, “Dense shell glycodendrimers as potential nontoxic anti-amyloidogenic agents in Alzheimer’s disease. Amyloid-dendrimer aggregates morphology and cell toxicity,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 11, pp. 3903–3909, 2011.
- [98] A. Hierlemann, J. K. Campbell, L. A. Baker, R. M. Crooks, and A. J. Ricco, “Structural distortion of dendrimers on gold surfaces: A tapping-mode AFM investigation,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 21, pp. 5323–5324, 1998.
- [99] J. Li, L. T. Piehler, D. Qin, J. R. Baker Jr., D. A. Tomalia, D. J. Meier, J. R. Baker, D. A. Tomalia, and D. J. Meier, “Visualization and characterization of poly(amidoamine) dendrimers by atomic force microscopy,” *Langmuir*, vol. 16, no. 13, pp. 5613–5616, 2000.
- [100] D. Cakara, J. Kleimann, and M. Borkovec, “Microscopic protonation equilibria of poly(amidoamine) dendrimers from macroscopic titrations,” *Macromolecules*, vol. 36, no. 11, pp. 4201–4207, Jun. 2003.
- [101] Y. H. Niu, L. Sun, and R. M. A. Crooks, “Determination of the intrinsic proton binding constants for poly(amidoamine) dendrimers via potentiometric pH titration,” *Macromolecules*, vol. 36, no. 15, pp. 5725–5731,

2003.

- [102] I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, and A. M. Baro, "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, p. 013705, 2007.
- [103] R. D. Mussell and D. G. Nocera, "Effect of long-distance electron transfer on chemiluminescence efficiencies," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 9, pp. 2764–2772, 1988.
- [104] E. M. Gross, P. Pastore, and R. M. Wightman, "High-frequency electrochemiluminescent investigation of the reaction pathway between tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) and tripropylamine using carbon fiber microelectrodes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 37, pp. 8732–8738, 2001.
- [105] F. Kanoufi, Y. Zu, and J. A. Bard, "Homogeneous Oxidation of Trialkylamines by Metal Complexes and Its Impact on Electrogenerated Chemiluminescence in the Trialkylamine/Ru(bpy)₃²⁺ System," *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, pp. 210–216, 2001.
- [106] F. Sanchez-Burgos, M. Galan, M. Dominguez, and P. Perez-Tejeda, "Medium effects on the electron transfer transition within the binuclear complex [(NH₃)₅Ru^{III}-NC-Ru^{II}(CN)₅]-," *New J. Chem.*, vol. 22, no. 8, pp. 907–911, 1998.
- [107] A. Mecke, I. Lee, J. R. Baker, M. M. B. Holl, B. G. Orr, J. R. Baker Jr., M. M. B. Holl, and B. G. Orr, "Deformability of poly(amidoamine) dendrimers," *Eur. Phys. J. E*, vol. 14, no. 1, pp. 7–16, 2004.
- [108] N. S. Templeton, Ed., *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies*, 3th Editio. Boca Raton, FL, FL: CRC Press, 2015.
- [109] J. D. Eichman, A. U. Bielinska, J. F. Kukowska-Latallo, and J. R. Baker, "The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells," *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, no. 7, pp. 232–245, 2000.
- [110] D. A. Tomalia, S. Uppuluri, D. R. Swanson, and J. Li, "Dendrimers as reactive modules for the synthesis of new structure-controlled, higher-complexity megamers," *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, no. 12, pp. 2343–2358, 2000.

- [111] G. R. Newkome, E. He, and C. N. Moorefield, "Suprasupermolecules with Novel Properties: Metallodendrimers," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 7, pp. 1689–1746, 1999.
- [112] V. N. Bliznyuk, F. Rinderspacher, and V. V Tsukruk, "On the structure of polyamidoamine dendrimer monolayers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 39, no. 21, pp. 5249–5252, 1998.
- [113] J. B. Noffsinger and N. D. Danielson, "Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III)," *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 6, pp. 865–868, 1987.
- [114] C. Mirkin, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials," *Nature*, vol. 382, pp. 607–609, 1996.
- [115] O. Kadioglu, A. H. Malczyk, H. J. Greten, and T. Efferth, "Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy," *Invest. New Drugs*, vol. 33, no. 2, pp. 513–520, 2015.
- [116] L. Gong, Z. Zhao, Y.-F. Lv, S.-Y. Huan, T. Fu, X.-B. Zhang, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu, "DNAzyme-based biosensors and nanodevices," *Chem. Commun.*, vol. 51, pp. 979–995, 2015.
- [117] J. Zhang, Y. Tang, L. Teng, M. Lu, and D. Tang, "Low-cost and highly efficient DNA biosensor for heavy metal ion using specific DNAzyme-modified microplate and portable glucometer-based detection mode," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 68, pp. 232–238, 2015.
- [118] M. Matsuo, K. Umemura, and S. Kawai, "Kinetic analysis of color changes in cellulose during heat treatment," *J. Wood Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 113–119, Dec. 2011.
- [119] M. Torrell, P. Machado, L. Cunha, N. M. Figueiredo, J. C. Oliveira, C. Louro, and F. Vaz, "Development of new decorative coatings based on gold nanoparticles dispersed in an amorphous TiO₂ dielectric matrix," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 204, no. 9–10, pp. 1569–1575, Jan. 2010.
- [120] A. P. Echavarría, J. Pagán, and A. Ibarz, "Kinetics of color development of melanoidins formed from fructose/amino acid model systems," *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 20, no. 2, pp. 119–26, Mar. 2014.
- [121] C. Niamnuy, S. Devahastin, S. Soponronnarit, and G. S. Vijaya Raghavan,

- "Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage," *J. Food Eng.*, vol. 87, no. 4, pp. 591–600, Aug. 2008.
- [122] K. C. Kwok, D. B. MacDougall, and K. Niranjani, "Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk," *J. Food Eng.*, vol. 40, no. 1–2, pp. 15–20, May 1999.
- [123] M. Klockars, S. Reitamo, T. Weber, and Y. Kerttula, "Cerebrospinal fluid lysozyme in bacterial and viral meningitis," *Acta Med Scand*, vol. 203, pp. 71–74, 1978.
- [124] R. E. Noble and H. H. Fudenberg, "Leukocyte lysozyme activity in myelocytic leukemia," *Blood*, vol. 30, no. 4, pp. 465–73, Oct. 1967.
- [125] J. F. Harrison, G. S. Lunt, P. Scott, and J. D. Blainey, "Urinary lysozyme, ribonuclease, and low-molecular-weight protein in renal disease," *Lancet*, vol. 1, pp. 371–375, 1968.
- [126] S. S. Levinson, R. J. Elin, and L. Yam, "Light chain proteinuria and lysozymuria in a patient with acute monocytic leukemia," *Clin Chem*, vol. 48, pp. 1131–1132, 2002.
- [127] L. M. Demers, M. Östblom, H. Zhang, N.-H. Jang, B. Liedberg, and C. Mirkin, "Thermal Desorption Behavior and Binding Properties of DNA Bases and Nucleosides on Gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 38, pp. 11248–11249, Sep. 2002.
- [128] H. Kimura-Suda, D. Y. Petrovykh, M. J. Tarlov, and L. J. Whitman, "Base-dependent competitive adsorption of single-stranded DNA on gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 30, pp. 9014–9015, 2003.
- [129] J. J. Storhoff, R. Elghanian, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, "Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 18, pp. 6666–6670, 2002.
- [130] J. Yang, B.-K. Pong, J. Y. Lee, and H.-P. Too, "Dissociation of double-stranded DNA by small metal nanoparticles," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 101, pp. 824–830, 2007.
- [131] Y.-L. Cao, Y. Li, F. Zhang, J.-Z. Huo, and X.-J. Zhao, "Highly sensitive 'naked-eye' colorimetric detection of thiourea using gold nanoparticles," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 12, pp. 4927–4933, 2015.

- [132] X. Wang, Y. Xu, X. Xu, K. Hu, M. Xiang, L. Li, F. Liu, and N. Li, "Direct determination of urinary lysozyme using surface plasmon resonance light-scattering of gold nanoparticles.," *Talanta*, vol. 82, no. 2, pp. 693–697, Jul. 2010.
- [133] M. Wojdyr, "Fityk : a general-purpose peak fitting program," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 43, no. 5, pp. 1126–1128, Sep. 2010.
- [134] C.-S. Yang, M.-S. Shian, and F.-Y. Chang, "Evolution study of photo-synthesized gold nanoparticles by spectral deconvolution model: a quantitative approach," *New J. Chem.*, vol. 30, pp. 729–735, 2006.
- [135] R. Prado-Gotor, E. Grueso, P. Perez-Tejeda, A. Jimenez-Ruiz, and J. M. Carnerero, "Free energy of binding of cationic metal complexes to AuNPs through electron-transfer processes," *Soft Matter*, vol. 10, no. 42, pp. 8482–8488, Nov. 2014.
- [136] H. A. Benesi and J. H. Hildebrand, "A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 71, no. 8, pp. 2703–2707, 1949.
- [137] F. Heiligtag and M. Niederberger, "The fascinating world of nanoparticle research," *Mater. Today*, vol. 16, no. 7–8, pp. 262–271, 2013.
- [138] V. Apyari, S. Dmitrienko, and Y. Zolotov, "Unusual application of common digital devices: Potentialities of Eye-One Pro mini-spectrophotometer – A monitor calibrator for registration of surface plasmon resonance bands of silver and gold nanoparticles in solid matrices," *Sensors Actuators B*, vol. 188, pp. 1109–1115, 2013.
- [139] A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T. F. Massoud, and S. S. Gambhir, "Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients," *Nano Lett.*, vol. 11, pp. 4029–4036, 2011.
- [140] C. Duan, H. Cui, Z. Zhang, B. Liu, J. Guo, and W. Wang, "Size-Dependent Inhibition and Enhancement by Gold Nanoparticles of Luminol-Ferricyanide Chemiluminescence," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, pp. 4561–4566, 2007.
- [141] A. Mieszawska, W. Mulder, Z. Fayad, and D. Cormode, "Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease," *Mol. Pharm.*,

vol. 10, pp. 831–847, 2013.

- [142] S. Eustis and M. El-Sayed, “Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, pp. 209–217, 2006.
- [143] D. Pissuwan, T. Niidome, and M. Cortie, “The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 149, pp. 65–71, 2011.
- [144] A. Moores and F. Goettmann, “The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications,” *New J. Chem.*, vol. 30, pp. 1121–1132, 2006.
- [145] M. Käll, H. Xu, and P. Johansson, “Field enhancement and molecular response in surface enhanced Raman scattering and fluorescence spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 36, p. 510, 2005.
- [146] N. Leopold, V. Chis, N. Mircescu, O. Marisca, O. Buja, L. Leopold, C. Socaciu, C. Braicu, A. Irimie, and I. Berindan-Neagoe, “One step synthesis of SERS active colloidal gold nanoparticles by reduction with polyethylene glycol,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 133–138, 2013.
- [147] Y. Wang, S. Guo, H. Chen, and E. Wang, “Facile fabrication of large area of aggregated gold nanorods film for efficient surface-enhanced Raman scattering,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 318, pp. 82–87, 2008.
- [148] S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, and D. A. Schultz, “Single-target molecule detection with nonbleaching Multicolor immunolabels,” *P.N.A.S.*, vol. 67, no. 3, pp. 996–1001, 2000.
- [149] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, and M. . El-Sayed, “Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near Infrared Region by Using Gold Nanorods,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 2115–2120, 2006.
- [150] N. Chandrasekharan and P. Kamat, “Assembling Gold Nanoparticles as Nanostructured Films Using an Electrophoretic Approach,” *Nano Lett.*, vol. 1, no. 2, pp. 67–70, 2001.
- [151] A. Shivhare, D. Chevrier, R. W. Purves, and R. W. J. Scott., “Following the

- Thermal Activation of Au₂₅(SR)₁₈ Clusters for Catalysis by X-Ray Absorption Spectroscopy," *J. Phys. Chem. C.*, vol. 117, no. 39, pp. 20007–20016.
- [152] M. A. Hayat, *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*. New York: Academic Press, 1989.
- [153] G. Liu, X. Mao, J. Phillips, H. Xu, W. Tan, and L. Zeng, "Aptamer-Nanoparticle Strip Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells," *Anal. Chem.*, vol. 81, pp. 10013–10018, 2009.
- [154] C. R. Yonzon, C. L. Haynes, X. Zhang, J. T. Walsh, and R. P. Van Duyne, "A glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering: improved partition layer, temporal stability, reversibility, and resistance to serum protein interference," *Anal. Chem.*, vol. 76, pp. 78–85, 2004.
- [155] L. J. Ou, P. Y. Jin, X. Chu, J. H. Jiang, and R. Q. Yu, "Sensitive and Visual Detection of Sequence-Specific DNA Binding Protein via a Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensor," *Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 6015–6024, 2010.
- [156] D. Emerich and C. Thanos, "The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis," *Biomol. Eng.*, vol. 23, pp. 171–184, 2006.
- [157] C. K. Kim, R. R. Kalluru, J. P. Singh, A. Fortner, J. Griffin, G. K. Darbha, and P. . Ray, "Gold-nanoparticle-based miniaturized laser-induced fluorescence probe for specific DNA hybridization detection: studies on size-dependent optical properties," *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 385–393, 2006.
- [158] E. J. W. Verwey and J. T. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Amsterdam: Elsevier Ltd, 1998.
- [159] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, and M. El-Sayed, "Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes," *Chem. Rev.*, vol. 105, pp. 1025–1102, 2005.
- [160] B. Cushing, V. Kolesnichenko, and C. O'Connor, "Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles," *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 3893–3946, 2004.
- [161] J. Turkevich, P. S. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and

- growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, pp. 55–75, 1951.
- [162] J. Turkevich, G. Garton, and P. . Stevenson, "The color of colloidal gold," *J. Colloid Sci.*, vol. 9, pp. 26–35, 1954.
- [163] B. V. Enüstün and J. Turkevich, "Coagulation of Colloidal Gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 21, pp. 3317–3328, 1963.
- [164] J. Turkevich, "Colloidal gold. Part I," *Gold Bull.*, vol. 18, no. 1, pp. 86–91, 1985.
- [165] N. Uyeda, M. Nishino, and E. Suito, "Nucleus interaction and fine structures of colloidal gold particles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 43, no. 2, pp. 264–276, 1973.
- [166] M. K. Chow and Z. F. Zukoski, "Gold sol formation mechanisms: role of colloidal stability," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 165, pp. 97–109, 1994.
- [167] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, and X. Peng, "Size control of gold nanocrystal in citrate reduction: The third role of citrate," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, pp. 13939–13948, 2007.
- [168] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech, "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, pp. 15700–15707, 2006.
- [169] H. Xia, S. Bai, J. Hartmann, and D. Wang, "Synthesis of monodisperse quasi-spherical gold nanoparticles in water via silver (I)-assisted citrate reduction," *Langmuir*, vol. 36, no. 5, pp. 3585–3589, 2009.
- [170] I. Sayed, X. Huang, and M. El-Sayed, "Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 5, pp. 829–834, 2005.
- [171] P. Taladriz-Blanco, J. Pérez-Juste, N. Kandoth, P. Hervés, and S. Sortino, "Layer-by-layer assembled gold nanoparticles with a tunable payload of a nitric oxide photocage," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 407, pp. 504–528, 2013.
- [172] J. C. Y. Kah, M. C. Olivo, C. G. L. Lee, and C. J. R. Sheppard, "Molecular contrast of EGFR expression using gold nanoparticles as a reflectance-based

- imaging probe," *Mol. Cell. Probes*, vol. 22, pp. 14–23, 2008.
- [173] T. K. Sau and C. J. Murphy, "Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 28, pp. 8648–8649, 2004.
- [174] C. J. Murphy, T. K. Sau, A. . Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi, and T. Li, "Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 13857–13870, 2005.
- [175] D. . Zweifel and W. A. Alexander, "Sulfide-Arrested Growth of Gold Nanorods," *Chem. Mater*, vol. 17, pp. 4256–4261, 2005.
- [176] K. R. Brown and M. J. Natan, "Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces," *Langmuir*, vol. 14, no. 4, pp. 726–728, 1998.
- [177] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, "Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles," *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 26, pp. 2313–2322, 2001.
- [178] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, "Seeding Growth for Size Control of 5 – 40 nm Diameter Gold Nanoparticles," vol. 17, no. 37, pp. 6782–6786, 2001.
- [179] T. K. Sau and C. J. Murphy, "Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution," *Langmuir*, vol. 20, pp. 6414–6420, 2004.
- [180] L. Minati, F. Benetti, A. Chaippini, and G. Speranza, "One-step synthesis of star-shaped gold nanoparticles," *Colloids surfaces B Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 441, no. 20, pp. 623–628, 2013.
- [181] Y. Takenaka, Y. Kawabata, H. Kitahata, M. Yoshida, Y. Matsuzawa, and T. Ohzono, "Effects of surfactant concentration on formation of high-aspect-ratio gold nanorods," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 407, pp. 265–272, 2013.
- [182] S. Garabagiu and I. Bratu, "Thiol containing carboxylic acids remove the CTAB surfactant onto the surface of gold nanorods: An FTIR spectroscopic study," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 284, pp. 780–783, 2013.
- [183] G. Merga, N. Saucedo, L. Cass, J. Puthussery, and D. Meisel, "'Naked' Gold

Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Catalytic Hydrogen Evolution, and SERS," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, pp. 14111–14118, 2010.

- [184] R. P. Bhattacharya, Z. Mukherjee, A. Xiong, S. S. Atala, and D. Mukhopadhyay, "Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Proliferation of HUVEC Cells," *Nano Lett.*, vol. 4, no. 12, pp. 2479–2481, 2004.
- [185] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. Schiffrin, and R. Whyman, "Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System," *Chem. Commun*, vol. 7, pp. 801–802, 1994.
- [186] M. N. Martin, J. I. Basham, P. Chando, and S. K. Eah, "Charged Gold Nanoparticles in Non-Polar Solvents: 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly," *Langmuir*, vol. 26, no. 10, pp. 7410–7417, 2010.
- [187] N. Leopold and B. Lendl, "A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 24, pp. 5723–5727, 2003.
- [188] G. Frens, "Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions," *Nat. Phys. Sci*, vol. 241, pp. 20–22, 1973.
- [189] P. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, R. Pasricha, and M. Sastry, "Capping of Gold Nanoparticles by the Amino Acid Lysine Renders Them Water-Dispersible," *Langmuir*, vol. 19, pp. 3545–3549, 2003.
- [190] B. Nikoobakht and M. A. El-Sayed, "Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Gold Nanorods," *J. Phys. Chem. A*, vol. 107, pp. 3372–3378, 2003.
- [191] N. Goubet, Y. Ding, M. Brust, Z. L. Wang, and M. P. Pileni, "A way to control the gold nanocrystals size: using seeds with different sizes and subjecting them to mild annealing," *ACS Nano*, vol. 3, no. 11, pp. 3622–3628, 2009.
- [192] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, and V. M. Rotello, "Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing," *Chem. Rev*, vol. 113, pp. 2739–2779, 2012.
- [193] M. Yamamoto, Y. Kahiwagi, T. Sakata, H. Mori, and M. Nakamoto,

- "Synthesis and Morphology of Star-Shaped Gold Nanoplates Protected by Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone)," *M. Chem. Mater.*, vol. 17, pp. 5391–5393, 2005.
- [194] R. Kim, H. Park, T. Yu, J. Yi, and W.-S. Kim, "Aqueous synthesis and stabilization of highly concentrated gold nanoparticles using sterically hindered functional polymer," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 575, pp. 71–75, 2013.
- [195] J. J. Yuan, A. Schmid, and S. P. Armes, "Facile Synthesis of Highly Biocompatible Poly(2(methacryloyloxy)ethylphosphorylcholine)-Coated Gold Nanoparticles in Aqueous Solution," *Langmuir*, vol. 22, pp. 11022–11027, 2006.
- [196] S. Luo, J. Xu, Y. Zhang, S. Liu, and C. Wu, "Double Hydrophilic Block Copolymer Monolayer Protected Hybrid Gold Nanoparticles and Their Shell Cross-Linking," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 21159–21166, 2005.
- [197] M. Filali, M. Meier, U. Schubert, and J. Gohy, "Star-Block Copolymers as Templates for the Preparation of Stable Gold Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 21, pp. 7995–8000, 2005.
- [198] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen, "Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces," *Langmuir*, vol. 21, pp. 9303–9307, 2005.
- [199] T. Huang and R. Murray, "Luminescence of Tiopronin Monolayer-Protected Silver Clusters Changes To That of Gold Clusters upon Galvanic Core Metal Exchange," *Phys. Chem. B*, vol. 107, pp. 7434–7440, 2003.
- [200] J. De la Fuente, C. Berry, M. Riehle, and A. Curtis, "Nanoparticle Targeting at Cells," *Langmuir*, vol. 22, pp. 3286–3293, 2006.
- [201] C. O. Baker, B. Shedd, R. J. Tseng, C. S. Martinez-Morales, A.A. Ozkan, M. Ozkan, Y. Yang, and R. B. Kaner, "Size Control of Gold Nanoparticles Grown on Polyaniline Nanofibers for Bistable Memory Devices," *ACS Nano*, vol. 5, pp. 3469–3474, 2011.
- [202] D. V. Goia and E. Matijević, "Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 146, pp. 139–152, 1999.
- [203] W. Patungwasa and J. H. Hodak, "pH tunable morphology of the gold

- nanoparticles produced by citrate reduction," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 108, pp. 45–54, 2008.
- [204] T. Muangnapoh, N. Sano, S. I. Yusa, N. Viriya-empikul, and T. Charinpanitkul, "Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 10, pp. 708–714, 2010.
- [205] F. Moreau, G. C. Bond, and A. O. Taylor, "Gold on titania catalysts for the oxidation of carbon monoxide: control of pH during preparation with various gold contents," *J. Catal.*, vol. 231, pp. 105–114, 2005.
- [206] N. N. Duy, D. X. Du, D. Van Phu, L. A. Quoc, B. D. Du, and N. Q. Hien, "Synthesis of gold nanoparticles with seed enlargement size by γ -irradiation and investigation of antioxidant activity," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 633–638, 2013.
- [207] R. G. Nikov, A. S. Nikolov, N. N. Nedyalkov, P. A. Atanasov, M. T. Alexandrov, and D. . Karashanova, "Processing condition influence on the characteristics of gold nanoparticles produced by pulsed laser ablation in liquids," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 274, pp. 105–109, 2013.
- [208] Hauser and Lynn, *Experiments in colloid chemistry*. MacGraw Hill, 1940.
- [209] Chunfang Li, D. Li, G. Wan, J. Xu, and H. Wanguo, "Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, p. 440, 2011.
- [210] S. Stoeva, K. J. Klabunde, C. M. Sorensen, and I. Dragieva, "Gram-scale synthesis of monodisperse gold colloids by the solvated metal atom dispersion method and digestive ripening and their organization into two- and three-dimensional structures," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 10, pp. 2305–2311, 2002.
- [211] F. Mafuné, J. Y. Kohno, Y. Takeda, and T. Kondow, "Formation of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution of Surfactant," *Phys. Chem. B*, vol. 115, pp. 5114–5120, 2001.
- [212] X. Liang, Z. Wang, and C. Liu, "Size-Controlled Synthesis of Colloidal Gold Nanoparticles at Room Temperature Under the Influence of Glow Discharge," *Nanoscale Res Lett*, vol. 5, no. 1, pp. 124–129, 2010.

- [213] X. Huang, H. Wu, X. Liao, and S. Bi, "One-step, size-controlled synthesis of gold nanoparticles at room temperature using plant tannin," *Green Chem*, vol. 12, pp. 395–399, 2010.
- [214] S. K. Sivaraman, S. Kumar, and V. Santhanam, "Room-temperature synthesis of gold nanoparticles - Size-control by slow addition," *Gold Bull.*, vol. 43, no. 4, pp. 275–286, 2010.
- [215] T. Iimori, Y. Hatakeyama, K. Nishikawa, M. Kato, and N. Ohta, "Visible photoluminescence of gold nanoparticles prepared by sputter deposition technique in a room-temperature ionic liquid," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 586, no. 24, pp. 100–103, 2013.
- [216] I. Ojea-Jiménez, N. Bastús, and V. Puntes, "Influence of the sequence of the reagents addition in the citrate-mediated synthesis of Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem.*, vol. 115, pp. 15752–15757, 2011.
- [217] K. R. Brown, D. G. Walter, and M. J. Natan, "Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions . 2 . Improved Control of Particle Size and Shape," no. 12, pp. 306–313, 2000.
- [218] S. I. Stoeva, A. B. Smetana, C. M. Sorensen, and K. J. Klabunde, "Gram-scale synthesis of aqueous gold colloids stabilized by various ligands," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 309, pp. 94–98, 2007.
- [219] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard III, "Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter," *Angew. Chemie - Int. Ed. English*, vol. 29, no. 2, pp. 138–175, 1990.
- [220] A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, and P. Perez-Tejeda, "Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)3]2 + complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 151, pp. 18–25, 2015.
- [221] Y. H. Jang, L. C. Sowers, C. Tahir, and W. a I. Goddard, "First Principles Calculation of pK a Values for 5-Substituted Uracils," *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, pp. 274–280, 2001.
- [222] D. Wang, T. Imae, and M. Miki, "Fluorescence emission from PAMAM and PPI dendrimers.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 306, no. 2, pp. 222–7, Feb. 2007.

- [223] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, "A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules.," *Polymer Journal*, vol. 17, no. 1. pp. 117–132, 1985.
- [224] M. Wanunu, A. Vaskevich, A. Shanzer, and I. Rubinstein, "Divergent growth of coordination dendrimers on surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 25, pp. 8341–8349, 2006.
- [225] M. Gregoritzka and F. P. Brandl, "The Diels-Alder reaction: A powerful tool for the design of drug delivery systems and biomaterials," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 97, pp. 438–453, 2015.
- [226] T. Kawaguchi, K. L. Walker, C. L. Wilkins, and J. S. Moore, "Double Exponential Dendrimer Growth," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 7, pp. 2159–2165, 1995.
- [227] C. B. Gorman and J. C. Smith, "Structure-Property relationships in dendritic encapsulation," *Acc. Chem. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 60–71, 2001.
- [228] U. Boas, J. B. Christensen, and P. M. H. Heegaard, *Dendrimers in medicine and biotechnology: new molecular tools*. London: Royal Society of Chemistry, 2006.
- [229] M. Hashemi, S. M. Tabatabai, H. Parhiz, S. Milanizadeh, S. Amel Farzad, K. Abnous, and M. Ramezani, "Gene delivery efficiency and cytotoxicity of heterocyclic amine-modified PAMAM and PPI dendrimers," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 791–800, 2016.
- [230] C. Deraedt, M. D'Halluin, S. Lesturgez, L. Salmon, G. Goglio, J. Ruiz, and D. Astruc, "Alkynyl-functionalized imidazolium for 'click' dendrimer functionalisation and palladium nanoparticle stabilization," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2015, no. 8, pp. 1345–1350, 2015.
- [231] A. Dehshahri and H. Sadeghpour, "Surface decorations of poly(amidoamine) dendrimer by various pendant moieties for improved delivery of nucleic acid materials," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 132, pp. 85–102, 2015.
- [232] M. Sadeghi-Kiakhani and S. Safapour, "Functionalization of poly(amidoamine) dendrimer-based nano-architectures using a naphthalimide derivative and their fluorescent, dyeing and antimicrobial

- properties on wool fibers," *Luminescence*, p. In Press, 2015.
- [233] Q. R. Huang, P. L. Dubin, C. N. Moorefield, and G. R. Newkome, "Counterion Binding on charged Spheres: Effect of pH and Ionic Strength on the Mobility of Carboxyl-Terminated Dendrimers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, pp. 898–904, 2000.
- [234] I. B. Rietveld and D. Bedeaux, "The Viscosity of Solutions of Poly(propylene imine) Dendrimers in Methanol," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 235, no. 1, pp. 89–92, 2001.
- [235] D. Rana and G. Gangopadhyay, "Steady-state spectral properties of dendrimer supermolecule as a light harvesting system," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 334, no. 4–6, pp. 314–324, 2001.
- [236] D. Katsoulis, P. Argyrakis, A. Pimenov, and A. Vitukhnovsky, "Diffusion and trapping in dendrimer structures," *Chem. Phys.*, vol. 275, no. 1–3, pp. 261–269, 2002.
- [237] K. Nam, S. Jung, J. P. Nam, and S. W. Kim, "Poly(ethylenimine) conjugated bioreducible dendrimer for efficient gene delivery," *J. Control. Release*, vol. 220, pp. 447–455, 2015.
- [238] T. P. Thomas, R. Shukla, A. Kotlyar, B. Liang, J. Y. Ye, T. B. Norris, and J. R. Baker, "Dendrimer-epidermal growth factor conjugate displays superagonist activity," *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 2, pp. 603–609, 2008.
- [239] M. Hussain, M. Shchepinov, M. Sohail, I. F. Benter, A. J. Hollins, E. M. Southern, and S. Akhtar, "A novel anionic dendrimer for improved cellular delivery of antisense oligonucleotides," *J. Control. Release*, vol. 99, no. 1, pp. 139–155, 2004.
- [240] D. Wang and T. Imae, "Fluorescence emission from dendrimers and its pH dependence," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 41, pp. 13204–13205, Oct. 2004.
- [241] W. I. Lee, Y. Bae, and A. J. Bard, "Strong blue photoluminescence and ECL from OH-terminated PAMAM dendrimers in the absence of gold nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 27, pp. 8358–9, Jul. 2004.
- [242] K. Esumi, A. Suzuki, A. Yamahira, and K. Torigoe, "Role of Poly(amidoamine) Dendrimers for Preparing Nanoparticles of Gold, Platinum, and Silver," *Langmuir*, vol. 16, no. 6, pp. 2604–2608, 2000.

- [243] R. M. Crooks, M. Zhao, L. Sun, V. Chechik, and L. K. Yeung, "Dendrimer-Encapsulated Pt Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications to Catalysis," *Acc. Chem. Res.*, vol. 34, no. 3, pp. 181–190, 2001.
- [244] Y. G. Kim, S. K. Oh, and R. M. Crooks, "Preparation and Characterization of 1-2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions," *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 1, pp. 167–172, 2004.
- [245] A. Okugaichi, K. Torigoe, T. Yoshimura, and K. Esumi, "Interaction of cationic gold nanoparticles and carboxylate-terminated poly(amidoamine) dendrimers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 273, no. 1–3, pp. 154–160, Feb. 2006.
- [246] M. Dong, M. Li, H. Qi, Z. Li, Q. Gao, and C. Zhang, "Electrogenerated chemiluminescence peptide-based biosensing method for cardiac troponin I using peptide-integrating Ru(bpy)₃²⁺-functionalized gold nanoparticles as nanoprobe," *Gold Bull.*, vol. 48, no. 1–2, pp. 21–29, 2015.
- [247] X. Sun, Y. Du, S. Dong, and E. Wang, "Method for effective immobilization of Ru(bpy)₃²⁺ on an electrode surface for solid-state electrochemiluminescence detection," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 24, pp. 8166–8169, 2005.
- [248] M. Li, M. Zhang, S. Ge, M. Yan, J. Yu, J. Huang, and S. . Liu, "Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on nanoporous gold electrode and Ru-AuNPs/graphene as signal labels," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 181, pp. 50–56, 2013.
- [249] L. Ma, L. Wang, L. Liu, and L. Kang, "Electrogenerated chemiluminescence biosensor with gold nanoparticles/ Ru(bpy)₃²⁺ multilayer films on gold electrodes for the determination of ephedrine hydrochloride," *Asian J. Chem.*, vol. 25, no. 5, pp. 2527–2532, 2013.
- [250] N. R. Jana, L. Gearheart, and C. J. Murphy, "Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio," *Chem. Commun.*, no. 7, pp. 617–618, 2001.
- [251] M. Baalousha, Y. Nur, I. Römer, M. Tejamaya, and J. R. Lead, "Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles," *Sci. Total Environ.*, vol. 454–455, pp. 119–131, 2013.

- [252] K. A. Huynh and K. L. Chen, "Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 13, pp. 5564–5571, 2011.

ÍNDICE DE CONCEPTOS

AgNPs, 182, 193
Aniquilación, 33, 34, 36, 67, 138
AuNPs, 54, 85, 104, 153, 175, 176, 199, 201
 $C_2O_4^{2-}$. Véase Oxalato
CIELab, ix, xi, 39, 42, 85, 90, 101, 104, 153, 165, 173, 177, 196, 199, 201
Coreactivo, ix, 33, 34, 36, 39, 65, 67, 79, 80, 81, 138, 144, 175, 188, 195, 199, 201
Dendrímero, 37, 65, 68, 82, 138, 151, 153, 174, 196, 198, 199, 201
ECL, ix, xi, 31, 33, 57, 64, 71, 82, 137, 140, 151, 175, 180, 181, 193, 196, 198, 199, 200, 201, 202
Electroquimioluminiscencia. Véase ECL
Energía libre, 31, 85, 95, 153, 170, 193, 197, 199, 201
Fotoluminiscencia, 31
Iluminante, 43, 45, 51, 89
Ligando, ix, 29, 37, 54, 65, 87, 100, 108, 110, 121, 127, 137, 148, 149, 154, 196, 198, 199, 201
Ligando-receptor, ix, 29, 57, 65, 93, 148, 154, 196, 201
Observador, 43, 44, 49, 89
Oxalato, 37, 69, 137, 146, 151, 179, 180, 182, 193, 198, 199
Potencial redox, 36, 65, 67, 73, 79, 80, 82, 138, 144, 145, 175, 198
Quenching, 33, 101, 149, 160, 174, 179, 192, 198, 199, 200
Quimiluminiscencia, 31
Receptor, ix, xi, 29, 31, 37, 38, 65, 139, 146
 $Ru(bpy)_3^{2+}$, 32, 34, 39, 64, 137, 140, 175, 180, 181, 193, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202
Sensibilizador, 31

ANEXO A: RELEVANCIA CIENTÍFICA DE LAS PUBLICACIONES

A efectos de evaluación de la relevancia científica de los trabajos que componen la presente Tesis por Compendio de Publicaciones, la presente sección contiene la información relativa a los Índices de Impacto JCR y SCImago, ambos en su edición más actual (2014), de cada una de las tres revistas científicas que publican los trabajos. Se incluyen además a efectos legales los permisos de reproducción de los mismos.

6.1. Electrogenerated chemiluminescence reactions between the $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



2014 JCR Science Edition

Rank in Category: **JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY**

Journal Ranking [ⓘ]

For 2014, the journal **JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY** has an Impact Factor of **3.444**.

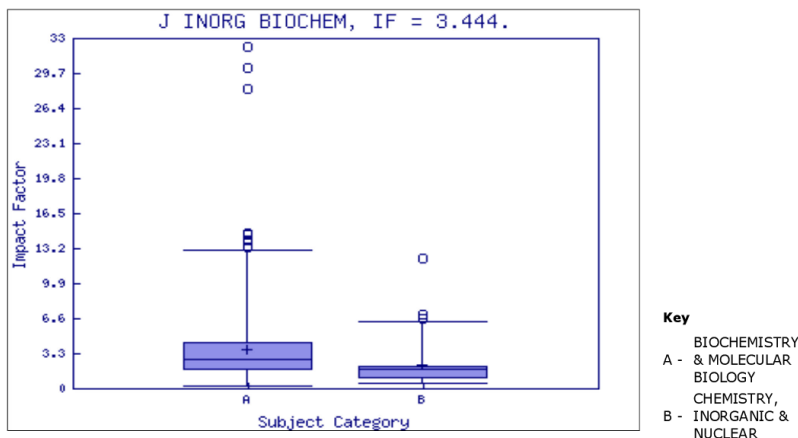
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY	290	99	Q2
CHEMISTRY, INORGANIC & NUCLEAR	45	8	Q1

Category Box Plot [ⓘ]

For 2014, the journal **JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY** has an Impact Factor of **3.444**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Home

Journal Rankings

Journal Search

Country Rankings

Country Search

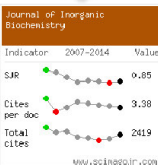
Compare

Map Generator

Help

About Us

Show this information in
your own website



Just copy the code below and paste within your html page:
<a href="http://www.scima

Related product



@scimago

SJR is developed by:



Powered by
Scopus

How to cite this website?

Journal Search

Search query

in Journal Title

Exact phrase

Journal of Inorganic Biochemistry

Country: United States

Subject Area: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology | Chemistry

Subject Category:



Publisher: Elsevier Inc., Publication type: Journals, ISSN: 18733344, 01620134

Coverage: 1979-2015

H Index: 93

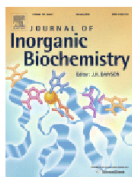
Scope:

The Journal of Inorganic Biochemistry is an established international forum for research in all aspects of Biological Inorganic Chemistry. Original [...]

Show full scope

Charts Data

Indicators	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
SJR	0,534	0,497	0,599	0,658	0,808	0,777	0,907	0,805	1,333	1,213	1,014	0,822	0,897	0,850	0,813	0,849
Total Documents	143	231	169	208	200	255	269	233	229	247	225	164	228	267	211	243
Total Docs. (3years)	346	389	500	543	608	577	663	724	757	731	709	701	636	617	659	706
Total References	5,487	7,838	5,727	7,795	7,453	9,936	12,742	11,387	9,903	11,300	10,467	7,745	11,276	13,700	11,270	12,051
Total Cites (3years)	472	524	786	1,139	1,359	1,292	1,814	1,944	2,696	2,509	2,526	2,314	2,279	2,217	2,255	2,419
Self Cites (3years)	79	65	98	99	156	152	230	171	180	165	182	158	222	193	187	192
Citable Docs. (3years)	341	384	494	535	597	567	657	717	748	715	692	683	624	607	649	692
Cites / Doc. (4years)	1,38	1,27	1,51	2,07	2,26	2,37	2,75	2,89	3,49	3,33	3,72	3,59	3,54	3,73	3,62	3,44
Cites / Doc. (3years)	1,38	1,36	1,59	2,13	2,28	2,28	2,76	2,71	3,60	3,51	3,65	3,39	3,65	3,65	3,47	3,50
Cites / Doc. (2years)	1,38	1,41	1,59	2,06	2,15	2,23	2,51	2,76	3,77	3,21	3,36	3,60	3,53	3,48	3,45	3,38
References / Doc.	38,37	33,93	33,89	37,48	37,27	38,96	47,37	48,87	43,24	45,75	46,52	47,23	49,46	51,31	53,41	49,59
Cited Docs.	213	228	341	392	453	434	536	571	637	588	594	573	541	523	558	594
Uncited Docs.	133	161	159	151	155	143	127	153	120	143	115	128	95	94	101	112
% International Collaboration	26,57	19,91	20,12	19,23	23,50	29,02	23,79	27,47	21,40	27,94	32,89	32,32	31,14	34,08	34,60	29,22



Title: Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium

Author: A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, P. Perez-Tejeda

Publication: Journal of Inorganic Biochemistry

Publisher: Elsevier

Date: October 2015

Copyright © 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Logged in as:

Aila Jimenez

Account #:

3000787701

LOGOUT

Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Aila Jimenez ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3860730972218
License date	May 02, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Journal of Inorganic Biochemistry
Licensed content title	Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy) ₃] ²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium
Licensed content author	A. Jimenez-Ruiz, E. Grueso, P. Perez-Tejeda
Licensed content date	October 2015
Licensed content volume number	151
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	8
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Reacciones Electroquímiluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas
Expected completion date	Jul 2016
Estimated size (number of pages)	250
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

6.2. CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



2014 JCR Science Edition

Rank in Category: RSC Advances

Journal Ranking

For 2014, the journal **RSC Advances** has an Impact Factor of **3.840**.

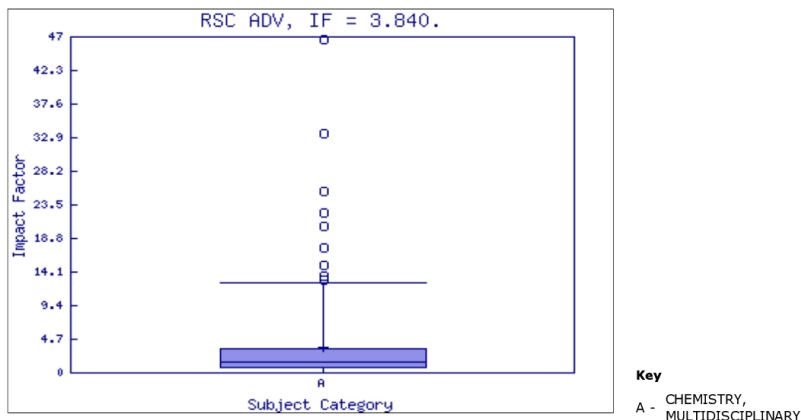
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY	157	33	Q1

Category Box Plot

For 2014, the journal **RSC Advances** has an Impact Factor of **3.840**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



Home

Journal Rankings

Journal Search

Country Rankings

Country Search

Compare

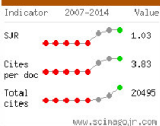
Map Generator

Help

About Us

Show this information in
your own website

RSC Advances



Just copy the code below and
paste within your html page:
<a href="http://www.scima

Related product



SJR is developed by:



Powered by
Scopus

How to cite this website?

Journal Search

Search query

in Journal Title

Exact phrase

RSC Advances

Country: [United Kingdom](#)

Subject Area: [Chemical Engineering](#) | [Chemistry](#)

Subject Category:

Category	Quartile (Q1 means highest values and Q4 lowest values)																		
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014			
Chemical Engineering (miscellaneous)																			
Chemistry (miscellaneous)																			

Publisher: [Royal Society of Chemistry](#). Publication type: [Journals](#). ISSN: 20462069

Coverage: 2004, 2011-2016

H Index: 45

Indicators	Charts																Data		
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014			
SJR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,742	0,983	1,026
Total Documents	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,741	3,320	8,433
Total Docs. (3years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	237	1,978	5,298
Total References	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80,929	157,661	383,809
Total Cites (3years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	605	7,466	20,495
Self Cites (3years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	115	1,035	3,737
Citable Docs. (3years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	233	1,962	5,256
Cites / Doc. (4years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,60	3,81	3,90
Cites / Doc. (3years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,60	3,81	3,90
Cites / Doc. (2years)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,60	3,81	3,83
References / Doc.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,48	47,49	45,51
Cited Docs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	181	1,638	4,471
Uncited Docs.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56	340	827
% International Collaboration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,33	20,27	19,36

CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles

R. Prado-Gotor, A. Jimenez-Ruiz, J. M. Carnerero, E. Grueso and I. Villa, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 85039

DOI: 10.1039/C5RA15119H

If you are not the author of this article and you wish to reproduce material from it in a third party non-RSC publication you must [formally request permission](#) using RightsLink. Go to our [Instructions for using RightsLink page](#) for details.

Authors contributing to RSC publications (journal articles, books or book chapters) do not need to formally request permission to reproduce material contained in this article provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

Reproduced material should be attributed as follows:

- For reproduction of material from NJC:
Reproduced from Ref. XX with permission from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and The Royal Society of Chemistry.
- For reproduction of material from PCCP:
Reproduced from Ref. XX with permission from the PCCP Owner Societies.
- For reproduction of material from PPS:
Reproduced from Ref. XX with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
- For reproduction of material from all other RSC journals and books:
Reproduced from Ref. XX with permission from The Royal Society of Chemistry.

If the material has been adapted instead of reproduced from the original RSC publication "Reproduced from" can be substituted with "Adapted from".

In all cases the Ref. XX is the XXth reference in the list of references.

If you are the author of this article you do not need to formally request permission to reproduce figures, diagrams etc. contained in this article in third party publications or in a thesis or dissertation provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

Reproduced material should be attributed as follows:

- For reproduction of material from NJC:
[Original citation] - Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC
- For reproduction of material from PCCP:
[Original citation] - Reproduced by permission of the PCCP Owner Societies
- For reproduction of material from PPS:
[Original citation] - Reproduced by permission of The Royal Society of

Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and RSC

- For reproduction of material from all other RSC journals:
[Original citation] - Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry

If you are the author of this article you still need to obtain permission to reproduce the whole article in a third party publication with the exception of reproduction of the whole article in a thesis or dissertation.

Information about reproducing material from RSC articles with different licences is available on our [Permission Requests page](#).

6.3. Nonfunctionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence

ISI Web of KnowledgeSM

Journal Citation Reports[®]



2014 JCR Science Edition

Rank in Category: CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL

Journal Ranking

For **2014**, the journal **CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL** has an Impact Factor of **5.731**.

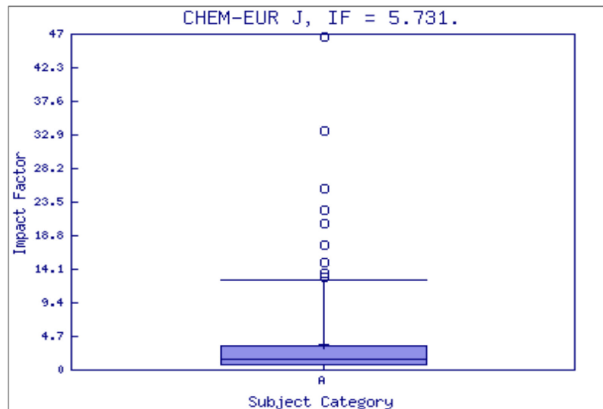
This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

Category Name	Total Journals in Category	Journal Rank in Category	Quartile in Category
CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY	157	22	Q1

Category Box Plot

For **2014**, the journal **CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL** has an Impact Factor of **5.731**.

This is a box plot of the subject category or categories to which the journal has been assigned. It provides information about the distribution of journals based on Impact Factor values. It shows median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution.



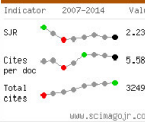
Key

A - CHEMISTRY,
MULTIDISCIPLINARY

- Home
- Journal Rankings
- Journal Search
- Country Rankings
- Country Search
- Compare
- Map Generator
- Help
- About Us

Show this information in your own website

Chemistry - A European Journal



Display journal title

Just copy the code below and paste within your html page:

Related product



SJR is developed by:



How to cite this website?

Journal Search

Search query

Exact phrase

Chemistry - A European Journal

Country: Germany

Subject Area: Chemistry

Subject Category:



Publisher: Wiley-VCH Verlag, Publication type: Journals, ISSN: 09476539, 15213765

Coverage: 1996-2015

H Index: 176

Scope:

Chemistry—A European Journal has established itself as a truly international journal with top quality contributions (2008 ISI Impact Factor 5.454). [...]

Show full scope

Charts Data

Indicators	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
SJR	2,844	2,851	2,714	2,432	2,017	2,151	2,430	2,603	2,819	2,456	2,118	2,143	2,232	2,382	2,207	2,234
Total Documents	385	493	566	696	634	668	770	818	1,035	1,542	1,483	1,714	1,782	1,965	2,076	2,261
Total Docs. (3years)	724	907	1,166	1,444	1,755	1,896	1,998	2,072	2,256	2,623	3,395	4,060	4,739	4,979	5,461	5,821
Total References	21,402	26,454	31,010	34,267	37,567	39,540	46,161	50,454	58,774	76,672	92,460	105,381	111,824	125,780	133,182	139,017
Total Cites (3years)	3,186	4,194	5,466	6,345	7,035	7,963	9,364	10,211	11,636	13,544	16,407	20,131	26,313	28,616	31,072	32,491
Self Cites (3years)	185	281	370	426	504	489	553	603	623	944	1,245	1,622	2,042	2,245	2,450	2,041
Citable Docs. (3years)	715	899	1,153	1,424	1,726	1,862	1,962	2,038	2,230	2,603	3,375	4,034	4,699	4,908	5,377	5,721
Cites / Doc. (4years)	4,46	4,53	4,69	4,44	4,14	4,38	4,76	4,74	5,21	5,26	4,85	5,16	5,50	5,50	5,73	5,59
Cites / Doc. (3years)	4,46	4,67	4,74	4,46	4,08	4,28	4,77	5,01	5,22	5,20	4,86	4,99	5,60	5,83	5,78	5,67
Cites / Doc. (2years)	4,57	4,66	4,81	4,36	3,80	4,05	5,12	4,92	5,09	5,22	4,41	4,93	5,91	5,84	5,75	5,58
References / Doc.	55,59	53,66	54,79	49,23	59,25	59,19	59,95	61,68	56,79	49,72	62,35	61,48	62,75	64,01	64,15	61,41
Cited Docs.	623	811	1,067	1,279	1,478	1,635	1,756	1,813	2,000	2,322	3,006	3,637	4,268	4,498	4,944	5,281
Uncited Docs.	101	96	99	165	277	261	242	259	256	301	389	423	471	481	517	536
% International Collaboration	29,87	31,24	30,92	24,14	29,97	31,74	31,30	30,68	28,02	23,09	29,67	27,83	27,44	29,16	28,56	27,54



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Nonfunctionalized Gold Nanoparticles: Synthetic Routes and Synthesis Condition Dependence

Author: Aila Jimenez-Ruiz, Pilar Perez-Tejeda, Elia Grueso, Paula M. Castillo, Rafael Prado-Gotor

Publication: Chemistry - A European Journal

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Apr 13, 2015

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Logged in as:

Aila Jimenez

Account #:
3000787701

LOGOUT

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Aila Jimenez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[Get the printable license.](#)

License Number	3860740892495
License date	May 02, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemistry - A European Journal
Licensed Content Title	Nonfunctionalized Gold Nanoparticles: Synthetic Routes and Synthesis Condition Dependence
Licensed Content Author	Aila Jimenez-Ruiz, Pilar Perez-Tejeda, Elia Grueso, Paula M. Castillo, Rafael Prado-Gotor
Licensed Content Date	Apr 13, 2015
Licensed Content Pages	14
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrimeros y Nanoparticulas
Expected completion date	Jul 2016
Expected size (number of pages)	250
Requestor Location	Aila Jimenez C/Martin Ruiz, 23 Camas, Spain 41900 Attn: Aila Jimenez
Billing Type	Invoice
Billing address	Aila Jimenez C/Martin Ruiz, 23 Camas, Spain 41900 Attn: Aila Jimenez
Total	0.00 EUR

ANEXO B: PERMISOS Y DECLARACIONES

A efectos de cumplimiento de la Normativa Reguladora del régimen de Tesis Doctoral de la Universidad de Sevilla (Acuerdo 9.1/CG 19-4-12) la presente sección contiene la siguiente documentación requerida:

- Informe del director de tesis con la aprobación del órgano responsable sobre la idoneidad de esta modalidad.
- Informe detallado del director/es de tesis con la contribución de cada autor (para artículos con más de cuatro autores).
- Aceptación por escrito de los coautores de la presentación de los trabajos como tesis.
- Renuncia de las personas que compartan autoría que no sean doctores a presentarlos como parte de otra tesis.
- Autorización del órgano responsable del programa de Doctorado para la presentación de la Tesis Doctoral

Los datos referentes a los autores y coautores, así como la copia íntegra de cada una de las publicaciones, pueden ser consultados en sus respectivos capítulos (**secciones 3.1, 3.2 y 3.3**). El informe de la relevancia científica de dichas publicaciones se recoge en el **Anexo A**.

Informe del director de tesis con la aprobación del órgano responsable sobre la idoneidad de esta modalidad:

Dña. M^a Pilar Pérez Tejeda, Catedrática de la Universidad de Sevilla y tutora y directora de la Tesis Doctoral "*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrimeros y Nanopartículas*" en relación a la idoneidad de la presentación de la presente Tesis Doctoral antes citada bajo la modalidad de Tesis por Compendio de Publicaciones:

Expone que, habiéndose desarrollado en la misma dos líneas de investigación encaminadas al desarrollo y perfeccionamiento de dos metodologías independientes (reacciones electroquimioluminiscentes y colorimetría) en el contexto del estudio del amplísimo campo de las interacciones ligando-receptor, de acuerdo con los términos recogidos en los Objetivos del Plan de Investigación de la citada Tesis Doctoral,

Y que, habiendo dado las dos líneas lugar a dos publicaciones independientes y una conjunta, en revistas de primer cuartil en cada uno de sus ámbitos, cubriéndose de esta forma completamente los Objetivos 1º y 2º del citado Plan de Investigación y de forma parcial los Objetivos 3º y 4º, cuyo desarrollo se completa con el trabajo adicional realizado por la estudiante y recogido en la correspondiente sección de la presente Tesis, cumpliéndose así tanto los objetivos marcados por el Plan de Investigación como los requisitos de la Universidad de Sevilla para la adopción de esta modalidad de Tesis por Compendio de Publicaciones,

Solicita de la Comisión de Doctorado en Química la aceptación de la presentación de la citada Tesis Doctoral bajo la modalidad de Tesis por Compendio de Publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 9 de Mayo de 2016;

M^a Pilar Pérez Tejeda

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE QUÍMICA
Pdo.: Antonio M. Gil Serrano

Informe detallado del director/es de tesis con la contribución de cada autor (para artículos con más de cuatro autores):

D. Rafael Prado Gotor, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla y codirector de la Tesis Doctoral “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrimeros y Nanopartículas*” declara los siguientes puntos relativos a las publicaciones de la doctoranda Aila Jiménez Ruiz:

- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** *RSC Adv.*, 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H

Aila Jiménez Ruiz ha llevado a cabo todo el estudio experimental relativo al uso de nanopartículas de oro en su interacción con la lisozima y la adenosina. Asimismo, ha llevado a cabo estudios teóricos para determinar la energía binding de unión entre dicha proteína y los nanoclusters y ha participado activamente en la redacción del trabajo.

José María Carnerero ha llevado a cabo el estudio experimental correspondiente a la interacción de la tiourea y la lisina con las nanopartículas de oro.

Elia Grueso ha llevado a cabo los estudios de deconvolución para obtener las bandas correspondientes a las nanopartículas libres y asociadas.

Isaac Villa ha participado en la discusión de los resultados y en el uso del modelo CIELab para determinar constantes de equilibrio a partir de medidas colorimétricas basándose en los cambios de la banda de plasmón de las nanopartículas.

Rafael Prado Gotor ha sido el director científico y el escritor de la publicación, junto con la doctoranda.

- *Jiménez-Ruiz, A., Perez-Tejeda, P., Grueso, E., Castillo, P. M.*, Prado-Gotor, R*.* **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.** Chem. Eur. J., 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117

Aila Jiménez Ruiz ha realizado la búsqueda bibliográfica relativa a la influencia de la reducción en los procesos sintéticos de nanopartículas y ha participado activamente en la redacción de este capítulo para el desarrollo de la publicación en forma de review. Por otro lado ha maquetado las figuras del trabajo, pedido los permisos de copyright y participado activamente en la discusión de las conclusiones del trabajo.

Pilar Perez Tejeda ha participado en la discusión y preparación del capítulo correspondiente a los agentes estabilizantes bien como agentes estéricos o electrostáticos durante los diversos procesos de síntesis.

Elia Grueso ha participado en el estudio e influencia de dos factores como son la temperatura, la agitación y el orden de adición de reactivos en la síntesis de nanoclústers.

Paula M. Castillo Hernández junto con Rafael Prado Gotor han diseñado el trabajo científico y escrito la introducción del paper. Han sido directores y correctores de la publicación y son responsables últimos del capítulo de conclusiones y perspectivas futuras de trabajo.

Y para que así conste, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2016:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Prado', is written over a light blue grid background.

Rafael Prado Gotor

Aceptación por escrito de los coautores de la presentación de los trabajos como tesis

Dña. M^a Pilar Perez Tejada, con DNI 08750285G, autora correspondiente de la publicación científica que se detalla a continuación:

- Jimenez-Ruiz, A., Grueso, E., Perez Tejada, P*. **Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium.** J. Inorg. Biochem., 151 (2015) 18-25. DOI 10.1016/j.jinorgbio.2015.06.021

Y coautora de la publicación científica que se detalla a continuación:

- Jimenez-Ruiz, A., Perez-Tejada, P., Grueso, E., Castillo, P. M.*, Prado-Gotor, R*. **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.** Chem. Eur. J., 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas*”

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 20 de Mayo de 2016:



M^a Pilar Perez Tejada

D. Rafael Prado Gotor, con DNI 28739846N, y autor correspondiente de las publicaciones científicas que se detallan a continuación:

- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** *RSC Adv.*, 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H
- *Jimenez-Ruiz, A.*, *Perez-Tejeda, P.*, *Grueso, E.*, *Castillo, P. M.**, *Prado-Gotor, R.**. **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.** *Chem. Eur. J.*, 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas*”

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2016:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Prado', enclosed within a circular scribble.

Rafael Prado Gotor

Dña. Elia María Grueso Molina, con DNI 77808914Y, y coautora de las publicaciones científicas que se detallan a continuación:

- Jimenez-Ruiz, A., Grueso, E., Perez Tejada, P*. **Electrogenerated chemiluminescence reactions between the [Ru(bpy)₃]²⁺ complex and PAMAM GX.0 dendrimers in an aqueous medium.** J. Inorg. Biochem., 151 (2015) 18-25. DOI 10.1016/j.jinorgbio.2015.06.021
- Prado-Gotor, R.*, Jimenez-Ruiz, A*, Carnerero, J.M., Grueso, E., Villa, I. **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** RSC Adv., 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H
- Jimenez-Ruiz, A., Perez-Tejada, P., Grueso, E., Castillo, P. M.*, Prado-Gotor, R*. **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.** Chem. Eur. J., 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas*”

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2017:



Fdo. Elia María Grueso Molina

D. José María Carnerero, con DNI 77808024J, y coautor de la publicación científica que se detalla a continuación:

- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** *RSC Adv.*, 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones "*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrimeros y Nanopartículas*"

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2016:



José María Carnerero Panduro

Dña. Paula Margarita Castillo Hernández, con DNI 75749229V, y autor correspondiente de la publicación científica que se detalla a continuación:

- *Jimenez-Ruiz, A., Perez-Tejeda, P., Grueso, E., Castillo, P. M.*, Prado-Gotor, R*. **Non-functionalized gold nanoparticles: synthesis and synthesis condition dependence.** Chem. Eur. J., 21 (2015) 9596-9609. DOI 10.1002/chem.201405117*

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas*”

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2016:



Paula Margarita Castillo Hernández

D. Isaac Villa Bernáldez, con DNI 44955787X, y coautor de la publicación científica que se detalla a continuación:

- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** *RSC Adv.*, 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H

Declara formalmente su aprobación de la inclusión de las mismas en la Tesis Doctoral por Compendio de Publicaciones “*Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrimeros y Nanopartículas*”

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 16 de Mayo de 2016:



Isaac Villa Bernáldez

Renuncia de las personas que compartan autoría que no sean doctores a presentarlos como parte de otra tesis

D. José María Carnerero, con DNI 77808024J, y coautor de las publicaciones científicas que se detallan a continuación:

- *Prado-Gotor, R.**, *Jimenez-Ruiz, A.**, *Carnerero, J.M.*, *Grueso, E.*, *Villa, I.* **CIELab chromaticity evolution to measure binding free energies of non-colored biomolecules to gold nanoparticles.** RSC Adv., 5 (2015) 85039-85045. DOI 10.1039/C5RA15119H

Declara formalmente su renuncia a presentar la citada publicación como parte integrante de otra Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente, en Sevilla a 3 de Mayo de 2016:



José María Carnerero Panduro

Autorización para la presentación de Tesis Doctoral



SERVICIO DE DOCTORADO

PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

REGULADO POR R.D. 99/2011 (NORMATIVA REGULADA POR ACUERDO 7.2/CG 17-6-11)

La Comisión Académica del programa de doctorado
 Doctorado en Química

utilizando el procedimiento acordado por la misma, previo informe del director/es así como del tutor, ha acordado

AUTORIZAR **NO AUTORIZAR** la presentación de la tesis doctoral cuyos datos se citan a continuación:

DOCTORANDO		
NOMBRE	APELLIDOS	
Aila	Jiménez Ruiz	
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO CURSADO POR EL DOCTORANDO		
Doctorado en Química		
DIRECTOR/ES DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN		
NOMBRE Y APELLIDOS	DNI	UNIVERSIDAD / CENTRO / DEPARTAMENTO / INSTITUTO
M ^a Pilar Pérez Tejada	08750285G	Universidad de Sevilla/Facultad de Química/Química Física
Rafael Prado Gotor	28739846N	Universidad de Sevilla/Facultad de Química/Química Física
TUTOR/A DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN		
NOMBRE Y APELLIDOS		
M ^a Pilar Pérez Tejada		
DENOMINACIÓN DEL PLAN DE INVESTIGACIÓN		
Reacciones electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: estudio de la interacción de especies biomédicas en dendrímeros y nanopartículas		

Sevilla, 9 de mayo de 2016

El director (1)

Fdo. M^a Pilar Pérez Tejada

El director (2)

Fdo. Rafael Prado Gotor

El director (3)

Fdo. Mª Pilar Pérez Tejada

El tutor

Fdo. M^a Pilar Pérez Tejada

El Presidente de Comisión Académica

Fdo. Antonio M. Gil Serrano

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO