



TRABAJO FIN DE GRADO

Diseño de un sensor de afinidad para la determinación
de nanopartículas de plata en productos de consumo



AUTOR: Darío Torrero Labrador

DIRECTOR: Juan Carlos Vidal Ibáñez

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza
Grado en Química
Convocatoria: septiembre de 2017

ÍNDICE

Resumen	Pág. 1
1. Introducción	Pág. 2
2. Experimental	Pág. 3
2.1. Reactivos y disoluciones	Pág. 3
2.2. Instrumentación	Pág. 4
2.3. Procedimientos experimentales	Pág. 5
3. Resultados y discusión	
3.1. Ligando L-Cisteina	Pág. 7
3.2. Ligando Tionina	Pág. 14
3.3. Ligando o-fenilen-diamina	Pág. 17
3.4. Electrodo GC sin modificar (<i>bare</i>)	Pág. 19
4. Conclusiones	Pág. 20
5. Bibliografía	Pág. 22
Abreviaturas empleadas en esta memoria	Pág. 24
<i>Resumen técnico (información adicional)</i>	Pág. 25

Resumen

Se ha estudiado la modificación química y electroquímica de electrodos voltamétricos, para inmovilizar en su superficie ligandos con capacidad de retención selectiva de **nanopartículas de plata (AgNPs)**. Una vez retenidas las AgNPs sobre el electrodo de trabajo, a partir de dispersiones de las mismas, a continuación se lleva a cabo su determinación voltamétrica. Los procedimientos que se han estudiado, permiten la detección sencilla y rápida de AgNPs, a la vez que pueden cuantificarse con gran sensibilidad debido a esta preconcentración, obteniéndose límites de detección del orden de 0,01 ppm.

Se han empleado electrodos de trabajo sólidos de pequeño tamaño (diámetro Ø de 1,5 y 3 mm.) y de diferentes materiales como substrato (carbón vitrificado y platino). Los ligandos inmovilizados retienen selectivamente a las AgNPs dispersas en una disolución, y posteriormente se llevó a cabo su **determinación voltamétrica** desde el propio electrodo de trabajo, mediante voltametría de redisolución con un barrido de potenciales diferencial de pulsos. Los resultados obtenidos, sobre todo en relación a la cantidad de AgNPs retenidas, a la cinética de su unión selectiva, y a las corrientes de redisolución obtenidas (sensibilidad), se compararon entre electrodos modificados con 3 ligandos y electrodos de carbón vítreo (*glassy-carbon, GC*) sin modificar.

Concretamente, hemos ensayado monómeros de **L-Cisteína (L-Cys)**, de **Tionina (Th)**, y de **o-fenilen-diamina (oPD)**, en distintas condiciones de inmovilización y/o de electropolimerización: a potencial constante y con barridos cíclicos de potencial (el oligómero resultante es morfológicamente distinto). También se han estudiado diferencias entre electrodos sólidos de GC y de platino, y procedimientos de depósito y secado para su adsorción directa (*casting*). Los resultados con estos tres ligandos se compararon con electrodos GC sin modificar (*bare*).

En nuestro trabajo, y como elemento diferenciador, hemos ensayado por primera vez el procedimiento de **electropolimerización** (Th y oPD) para la modificación electroquímica del electrodo de trabajo y su uso posterior en retener AgNPs, tema éste último no estudiado apenas en la bibliografía científica para esta finalidad (hasta nuestro conocimiento). La electropolimerización produce un oligómero insoluble fuertemente depositado sobre el electrodo, y que contiene un número grande de grupos funcionales capaces de retener a las AgNPs, si se escoge el procedimiento de inmovilización (o mecanismo de formación) adecuado. Esta modificación se produce exclusivamente sobre la superficie activa del electrodo de trabajo, pues lo hemos generado directamente y sólamente sobre su propia superficie conductora. En el caso de la L-cys, se unió al electrodo GC a través de un enlace covalente –C-N- a partir de un radical del monómero formado electroquímicamente a potenciales altos.

La **selectividad** en la detección de las AgNPs viene dada no sólo por el ligando de retención, sino por los potenciales de pico en los voltigramas de redisolución, e incluso por la forma de estos picos. Por ejemplo, se obtuvieron picos voltamétricos asimétricos, con una bajada brusca de la corriente en el sentido de pérdida de NPs sólidas unidas al electrodo en el caso de la poli-tionina. Junto a esto último, es posible también detectar de forma diferenciada tanto **AgNPs sólidas** como **iones Ag⁺** en disolución, no sólo por el sentido del barrido de potenciales catódico y anódico (produciendo la reducción y oxidación, respectivamente), sino por la forma del voltograma. Los distintos ligandos influyen en el potencial de los picos (a través de la energía de ruptura y desadsorción de los complejos), a la vez que el diámetro de las NPs de plata también influye en

esta energía y por lo tanto en la energía potencial de su oxidación (potenciales de pico de los voltigramas de redisolución).

La finalidad última de este trabajo es la de establecer las bases para desarrollar (**bio**)sensores de AgNPs con transducción voltamétrica, como método de alerta precoz (detección rápida y cuantificación sensible y sencilla), frente a técnicas analíticas de confirmación más sofisticadas y con instrumentación más compleja.

1. Introducción

Las **nanopartículas (NPs)** y los nanomateriales (NMs) son materiales que tienen dimensiones por debajo de los 100 nm de diámetro. Cada vez se utilizan en un amplio rango de productos industriales y de consumo, dado que mejoran notablemente sus propiedades [(1)]. Las NPs se caracterizan por sus propiedades catalíticas, capacidad de adsorción, potencial funcionalización de su superficie, o su alta relación tamaño/masa, lo que las hace muy importantes para la industria, la ciencia, la biotecnología, la medicina o la ciencia de los materiales [(1)]. Sin embargo, su creciente uso hace que inevitablemente se produzca su mayor exposición y acumulación en el medio ambiente, lo que inevitablemente conlleva importantes efectos sobre la salud humana por su potencial toxicidad [(2) (3)].

Las **nanopartículas de plata (AgNPs)**, de forma particular, son enormemente utilizadas en numerosos productos de consumo [(3) (4)]. Junto a las nanopartículas de oro (AuNPs), son las NPs metálicas más empleadas. En pequeñas concentraciones (del orden de ng/mL) no son tóxicas para las células humanas, pero sí letales para la mayoría de bacterias y virus, por lo que se emplean en la desinfección de aguas y de alimentos como antimicrobiano, bactericida y fungicida, y en medicina para el control de infecciones, o como anti-inflamatorio [(5) (4)]. Otras aplicaciones diversas de consumo son, por ejemplo, productos cosméticos, textiles, envases de alimentos, recubrimiento de plásticos o en pasta de dientes [(5)]. Sin embargo, es muy importante controlar su concentración en el orden de muy pocos ppm's o de ppb's para evitar su toxicidad [(3)].

La **detección y cuantificación de NPs, y de AgNPs** en particular, se lleva a cabo normalmente con técnicas analíticas muy potentes como microscopía electrónica, técnicas de dispersión de luz (*dynamic light scattering*, DLS), espectroscopía atómica (absorción atómica, emisión atómica en plasma inductivo), o técnicas de cromatografía hidrodinámica [(6) (4)]. Este tipo de técnicas permite determinar nanopartículas de un tamaño de hasta 1 nm y con concentraciones de ng mL⁻¹.

En los últimos años, han surgido novedosas **técnicas electroquímicas** de análisis (culombimetría de impacto, voltametría de nanopartículas inmovilizadas, espectroscopía de impedancia electroquímica) capaces de abordar con gran sensibilidad la cuantificación y la caracterización (tamaño, forma, estado de agregación) de NPs metálicas [(6)], y en particular de AgNPs [(7)].

Sin embargo, la Unión Europea, que cada vez está tomando una mayor concienciación sobre la problemática contaminante de las NPs, demanda metodología analítica que sea capaz de detectar y cuantificar de forma más potente a estas NPs. Y, en este sentido, (**bio**)sensores que permitan una detección rápida y precoz, constituyen una demanda muy importante, frente a otras técnicas analíticas instrumentalmente más complejas, como las mencionadas anteriormente. En este sentido, ya se han dado en los últimos años pasos importantes, para el diseño de nuevos (**bio**)sensores (incluso inmunosensores con anticuerpos específicos

para NPs [(6)], que permitan su discriminación o *screening* en todo tipo de muestras clínicas o medio ambientales [(2)], siendo la mayoría de estos (bio)sensores de tipo electroquímico [(8) (9)].

Si bien existen **técnicas electroquímicas** muy potentes para la determinación de metales [(10)], como la voltametría de redisolución anódica, y selectivas a través de sus potenciales de redisolución, la tendencia de los biosensores para NPs (muy escasos hasta la fecha), es la de mejorar esta selectividad intrínseca. Y una de las mejores opciones, consiste en la inmovilización sobre el electrodo de trabajo de un ligando que reconozca selectivamente a éstas NPs [(10)]. Por ejemplo, se ha empleado la L-cisteína, para la retención selectiva de AgNPs sobre electrodos de carbón vítreo (GC, *glassy-carbon*), en los denominados *sticky electrodes* [(11)]. Con esta misma finalidad, se han empleado otros ligandos, como, por ejemplo, 1,6-hexadithiol y 8-mercaptopquinolina [(9)]. Los trabajos, en este sentido, son también muy escasos [(12)].

En el **trabajo del TFG** que se presenta, se han estudiado varios ligandos para el reconocimiento selectivo y la retención selectiva de AgNPs sobre la superficie de electrodos voltamétricos, con la finalidad de construir sensores para la detección rápida de AgNPs, y su posterior cuantificación en concentración. La transducción empleada, ha sido voltamétrica, que tiene una gran sensibilidad (capacidad de determinar concentraciones de metales por debajo de los ppb's). Se comparan las sensibilidades obtenidas con tres ligandos distintos, y se compara con la obtenida con un electrodo sin modificar. El trabajo no pretende desarrollar un sensor completo, validando todas sus propiedades analíticas (por ejemplo, interferencias cruzadas de otras NPs, como AuNPs), pero sí establecer las bases de futuros sensores para AgNPs que puedan emplearse para la detección precoz de contaminación por AgNPs. Estos sensores constituyen técnicas de vanguardia (métodos de *screening*), que permiten crear una alarma que posteriormente se confirma mediante técnicas de retaguardia (métodos instrumentales de cuantificación y de caracterización más complejos). Se han empleado monómeros de L-cisteína (L-cys), tionina (Th), y de o-fenilen-diamina (oPD). Más adelante, para cada uno de los ligandos se introducirán sus propiedades y sus características.

Un elemento novedoso de este trabajo que se presenta en esta memoria TFG es que los electrodos han sido modificados por **electropolimerización** [(13) (14)], obteniendo (por primera vez para esta finalidad) oligómeros con grupos funcionales externos capaces de retener selectivamente a las AgNPs. Esta modificación se produce exclusivamente en la superficie conductora del propio electrodo de trabajo y transductor del sensor. No hay antecedentes en la bibliografía científica del uso de la poli-tionina (PTh) ni de la poli-o-fenilen-diamina (oPPD) para la detección de AgNPs, ni de su uso como elemento de reconocimiento para un sensor electroquímico.

2. Experimental

2.1. Reactivos y disoluciones

Se han empleado las disoluciones y reactivos que se resumen a continuación. Reactivos generales de laboratorio, de calidad analítica (Merck, NY, USA): KCl, NaCl, KClO₄, KNO₃, NaHPO₄ + N₂PO₄, y AgNO₃. Varias disoluciones se prepararon en tampón salino de fostato 0,10 M. (PBS). Disoluciones de KClO₄ 0,1 M. y KNO₃ 0,1 M. se emplearon como electrolito soporte para las medidas voltamétricas. Las diluciones de disoluciones patrón de Ag⁺ se realizaron con KNO₃ 0,1 M. Para su uso como ligandos de afinidad o complejantes, se emplearon los siguientes monómeros: L-Cisteína (L-cys) (*m*=121,16 g/mol); Tionina (Th) (C₁₂H₁₀CIN₃S, *m*=263,743 g/mol); o-fenilen-diamina (oPD) (C₆H₈N₂, *m*=108,1 g/mol), todos ellos de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

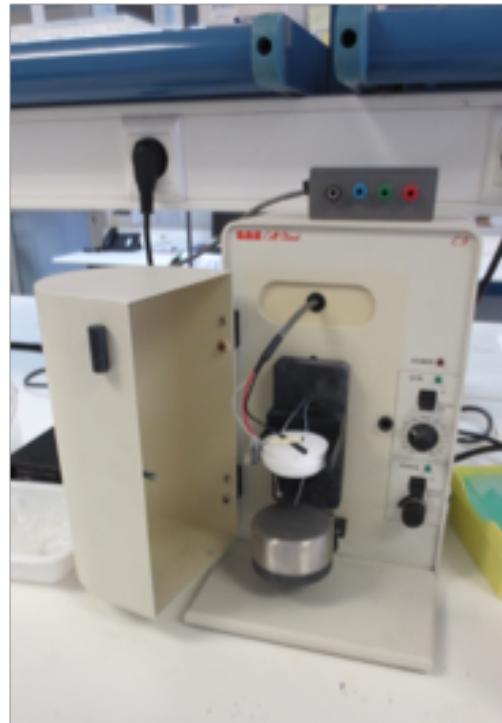
Disoluciones patrón de AgNPs (40-60-80 nm.), dispersiones de las mismas estabilizadas con citrato para evitar su agregación (BBI International, Cardiff, UK, referencias EM.SC-40, EM.SC-60, EM.SC-80). Su concentración (alrededor de 20 ppm) se comprobó con medidas espectrofotométricas por EAM-UV-vis. Dispersiones de las mismas se sometieron a un baño de ultrasonidos para obtener dispersiones homogéneas de las mismas, previamente a trabajar con ellas. Se guardaron en frigorífico a 4 °C cuando no eran utilizadas, y para evitar su fácil oxidación a Ag₂O. Previamente a las medidas o toma de volúmenes, las dispersiones de AgNPs se homogeneizaron siempre en baño de ultrasonidos durante 1 min. aproximadamente.

2.2. Instrumentación

Potenciómetro μAUTOLAB FRA2 TYPE III (Methrom, Utrecht, Países Bajos), con una sensibilidad de medida de corriente de hasta ±1 nA (impedancia de entrada $10^{12} \Omega$), y precisión en la aplicación de potencial de ±0,1 mV (ver Imagen 1). Dispone de alrededor de 30 técnicas voltamétricas (e.g. voltametría de redissolución, voltametría cíclica, espectroscopía de impedancia electroquímica, amperometría, y técnicas voltamétricas impulsionales). El control potencióstático y las medidas se realizaron con el software NOVA (v.1.8). Mini-electrodos de trabajo (diámetro, Ø=1,50 mm.) de carbón vítreo (glassy-carbon, GC) y platino, electrodos de referencia Ag/AgCl↓ (vidrio vycor), y electrodos auxiliares de hilo de platino (BioAnalytical Systems, BAS, USA). Las medidas electroquímicas se realizaron con la celda voltamétrica en una caja de Faraday, con conexiones eléctricas al potenciómetro y capacidad de pasar corriente de N₂ para la desoxigenación de las disoluciones (Imagen 1).

Otros aparatos e instrumentos empleados fueron baños de ultrasonidos (260W) P selecta (Barcelona, España), balanzas de precisión Mettler (±0,1 mg.), material de vidrio, aforado, y pequeño material de laboratorio.

Imagen 1. Potenciómetro μAutolab-III-FRA2 empleado en las medidas de este trabajo. Caja de Faraday para la protección de la celda voltamétrica en la que se introducen las disoluciones de medida con los electrodos de trabajo modificados.



2.3. Procedimientos experimentales

2.3.1. Preparación y limpieza de los electrodos

Para la limpieza de los electrodos de trabajo GC, se lavaron con agua, se pulieron con alúmina sólida ($\Phi=0,3\text{ }\mu\text{m}$) sobre fieltro durante 2 min., se volvieron a pulir con alúmina de menor diámetro ($\Phi=0,05\text{ }\mu\text{m}$) de la misma forma, se lavaron abundantemente con agua, y se mantuvieron en baño de ultrasonidos durante 1 min. para eliminar cualquier resto de partículas sólidas sobre su superficie. No es conveniente tiempos mayores de 1 min. en baño de ultrasonidos, pues podría deteriorar los electrodos GC. Para eliminar restos de AgNPs o de Ag^+ iónica sobre los electrodos de trabajo (ET), en algunos casos se realizó una limpieza electroquímica con un barrido cíclico de potenciales entre +1,5 y -0,90 V. ($v=200\text{ mV/s}, 10\text{ ciclos}$) en $\text{KNO}_3\text{ 0,1 M}$. como electrolito soporte.

2.3.2. Inmovilización de L-cisteína sobre electrodo GC ó Pt

Después de lavar y pulir el ET (sección 2.3.1), se llevó a cabo la oxidación electroquímica de L-cys, a partir de una disolución de concentración 5 mM de monómero en tampón de fosfato (PBS) 0,10 M., recién preparada y previamente desoxigenada con el paso de corriente de N_2 durante 5 min.

La inmovilización de L-Cys sobre el ET se llevó a cabo de dos formas distintas: oxidación electroquímica para la generación de uniones covalentes, y depósito de un volumen del ligando sobre el electrodo de trabajo y posterior secado (procedimiento *casting*).

La inmovilización electroquímica de la L-cys se realizó con barridos cíclicos de potencial sobre electrodo de trabajo (ET) de carbón vítreo (GC): sobre una disolución 5 mM de L-cys en PBS 0,10 M. se varió el potencial del ET/GC cíclicamente entre 0 y +1,5 V., con una velocidad de barrido de potenciales (v) de $v=20\text{ mV/s}, n=2$ ciclos. Alternativamente, se ensayaron oxidaciones de la L-cys con barridos cíclicos entre -0,8 y +1,8 V., con lo que varió el mecanismo de oxidación del monómero, las especies inmovilizadas, y las correspondientes propiedades de retención de AgNPs sobre el electrodo GC modificado.

En otro procedimiento distinto de inmovilización, se llevó a cabo el depósito y secado (*casting*) de la L-Cys sobre ETs de Pt y de GC, depositando 2 μL de L-cys 5 mM, y secando cuidadosamente con corriente de N_2 durante aproximadamente 5 min.

2.3.3. Inmovilización de tionina sobre electrodo GC

Después del lavado y pulido del ET (GC) (sección 2.3.1), se formó el oligómero de PTh a partir de una disolución recién preparada 10^{-4} M del monómero de tionina (Th), electropolimerizando con un barrido cíclico de potenciales (CV, *cyclic voltammetry*) entre -0,6V y 1,2V ($v=20\text{ mV/s}; n=3$ ciclos)

2.3.4. Inmovilización de oPD sobre electrodo GC

Una vez lavado y pulido el ET (GC) (sección 2.3.1), la electropolimerización de o-fenilen-diamina (oPD) se realizó con un barrido cíclico de potencial (la denominaremos de tipo 1), y a potencial constante (electropolimerización de tipo 2). Con ambos tipos de ElPolym se obtienen distintas estructuras, a partir de

una disolución recién preparada del monómero oPD (previamente desoxigenada por paso de N₂ durante 5 min., y para evitar la oxidación química del monómero).

- a) EIPolym con barrido cíclico (tipo 1): se varió el potencial del ET (GC) entre -0,5 y +0,8 V., con una velocidad de barrido de potenciales (v) de 20 mV/s, n=6 ciclos, en una disolución 50 mM. de oPD en 0,5 M. HCl y 0,1 M. de sulfato de sodio.
- b) EIPolym a E cte. (tipo 2): se aplicó un potencial constante de E_e= +0,65 V. durante 5-10 minutos (t_e). El espesor en estas condiciones (autocontrolado por la formación de un polímero no conductor y el aumento de su resistencia), es de 10 nm. aproximadamente.

2.3.5. Cuantificación de AgNPs (y de iones Ag⁺) con electrodos de trabajo modificados

La cuantificación de las AgNPs se realizó introduciendo previamente el ET modificado (*o bare*) en una dispersión de las mismas (aproximadamente entre 0,01 y 20 ppm AgNPs), durante un tiempo controlado de retención selectiva (t_{rs}≈10-60 min.). Los electrodos se lavaron y pulieron previamente, según el protocolo explicado (sección 2.3.1). Una vez transcurrido el tiempo de retención de las AgNPs, los electrodos se lavaron cuidadosamente con agua, y se llevaron a una disolución de KNO₃ 0,10 M. para su cuantificación voltamétrica. La medida voltamétrica anódica (oxidación de las AgNPs retenidas sobre el electrodo) se realizó mediante voltametría cíclica (CV) y mediante voltametría diferencial de pulsos (DPV, differential pulse voltammetry), en las condiciones instrumentales siguientes:

- a) CV: potencial inicial (E_i)= +0,1 V.; potencial final (E_f)= +0,6 V.; v=20 mV/s.
- b) DPV: E_i= +0,2 V.; (E_f)= +0,6 V.; ΔE (potencial de paso)=5 mV.; ΔE_p (incremento de potencial del pulso)= 25 mV.; t_p (tiempo de duración del pulso)= 60 ms.; t_m (tiempo de cada paso)=1,45 s.; v=3,3 mV/s.

Dependiendo de los ligandos de retención, se variaron los potenciales inicial (E_i) y final (E_f) de los barridos anteriores, dado que la energía de desadsorción depende de su fuerza de retención. Con el ligando L-cys el intervalo empleado fue de 0,2 a 0,45 V., mientras que para los otros dos ligandos fueron entre 0,3 y 0,55V. Se evitaron potenciales fuera de estos límites E_i-E_f para evitar la reducción u oxidación electroquímica de AgNPs y/o de iones Ag⁺ durante las medidas cuantitativas de ambas especies.

2.3.6. Cuantificación de AgNPs con electrodo de trabajo GC-bare (GC sin modificar)

Sobre electrodos ET sin modificar (*bare*), y en experiencias de adsorción selectiva con ETs modificados con los ligandos anteriores, se llevaron a cabo experiencias de adsorción directa para la cuantificación de AgNPs (o de Ag⁺, con barridos de potencial catódicos, en lugar de anódicos). Para ello, se depositaron sobre la superficie del ET 2 μL de las dispersiones de calibrado o muestras problema, y se secaron cuidadosamente con una corriente de N₂ (evitando así también su oxidación química por el oxígeno del aire). Posteriormente, los ET con las AgNPs adsorbidas se sumergieron en una disolución desoxigenada de KNO₃ 0,10 M. como electrolito soporte, para las medidas voltamétricas de redisolución de las AgNPs depositadas (voltametría de nanopartículas inmovilizadas). Se emplearon las técnicas voltamétricas CV o DPV, entre valores de potencial E_i=+0,15 y E_f=+0,3V. (ET *bare*).

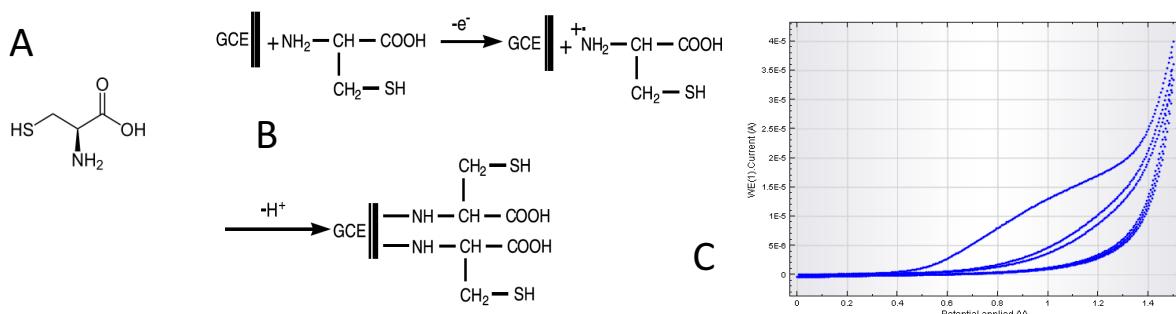
3. Resultados y discusión

3.1. Ligando L-Cisteína (L-cys)

La L-cys (Figura 1-A) es un aminoácido semi-esencial para el ser humano, ya que puede ser sintetizada en pequeñas cantidades por el cuerpo humano a partir de otros aminoácidos como la serina y la metionina, aunque requiere una gran cantidad de distintas vitaminas y de otras sustancias. La L-cys puede oxidarse electroquímicamente, para dar compuestos que pueden adsorberse (por su insolubilidad) o formar enlaces covalentes con los grupos carbonilo de electrodos de trabajo de carbono, según las condiciones experimentales de esta oxidación y por diversos mecanismos [(15) (16) (17) (18) (19)].

La variación cíclica de potencial del monómero de L-cys, entre los intervalos de potencial desde 0 a +1,5 V., produjo un voltágrafo cíclico como el de la Figura 1-C, con un pico ancho de oxidación irreversible ($E_p \approx +1,0$ V.) que no aparece en el barrido inverso, debido a una reacción electroquímica producida por la oxidación ($n=2 e^-$), en el que el grupo amino forma un radical que produce un enlace covalente -C-N- con el electrodo GC (Figura 1-B). Este comportamiento, que comprobamos experimentalmente, está de acuerdo con la bibliografía en referencia a la oxidación electroquímica de aminoácidos [(16)]. Mediante sucesivos ciclos CV, el pico de corriente va disminuyendo, debido a la pasivación del ET por la inmovilización de la L-cys sobre su superficie. La orientación externa de los grupos tiol y carboxilo favorecen la retención selectiva de las AgNPs en dispersión (Figura 1-B).

Figura 1. A) Molécula de L-Cisteína (L-cys); B) mecanismo de unión al electrodo GC mediante un barrido cíclico de potenciales; C) Electropolimerización del monómero mediante barrido cíclico de potenciales (0 a +1,5 V.).

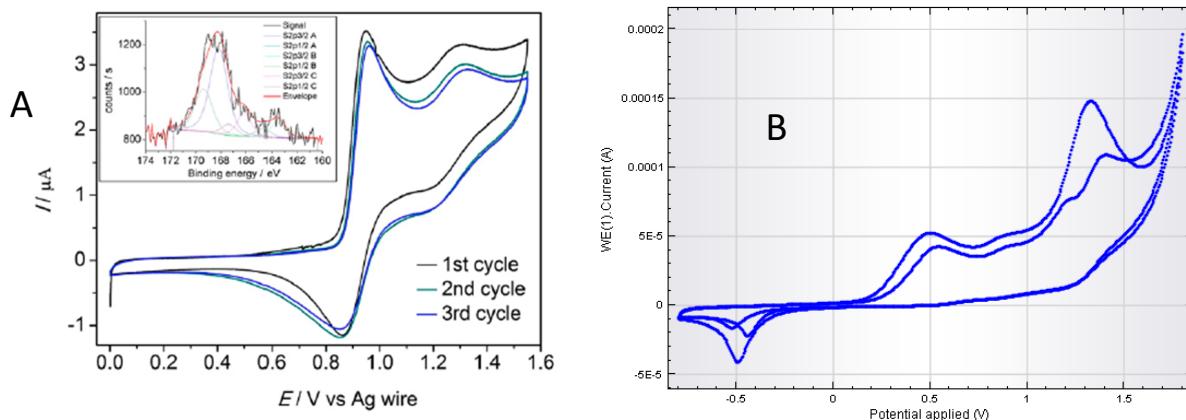


La modificación química de electrodos GC con L-Cys, permite la retención selectiva de AgNPs, como ya se ha descrito en la bibliografía con los llamados *sticky electrodes* [(15)]. Sin embargo, en los trabajos realizados hasta la fecha, los tiempos de retención para las AgNPs son muy elevados, incluso de más de 15 h., debido a condiciones distintas de formación electroquímica (tipo de electrolito soporte, disolvente orgánico o acuoso, y condiciones electroquímicas CV). Por ejemplo, en ciertas condiciones el CV tiene dos picos de oxidación y un pico de reducción (Figura 2-A [(15)]), lo que significa que se está produciendo la oxidación de la cisteína a cistina, que queda adsorbida sobre la superficie del electrodo por su insolubilidad, pero que tiene menos capacidad de retener a las AgNPs a través de los grupos carboxilo y amino [(15)]. En el voltágrafo cíclico de esta misma Fig. (Figura 2-A), se observa un pico catódico en el barrido inverso, y que es debido a la reducción de la cistina nuevamente a cisteína [(15) (17) (18) (19)].

Alternativamente, llevamos a cabo en nuestro estudio la unión covalente de la L-cys al ET-GC mediante un barrido cíclico entre -0,8 y +1,8 V., obteniéndose el CV de la Figura 2-B. En este voltágrafo cíclico (CV) se observa un pico catódico ($E_p \approx -0,5$ V.), que, es debido a la reducción del ácido cisteico que se forma a

potenciales positivos altos, a partir del monómero (en exceso) en la disolución (Figura 3). Los mecanismos involucrados se muestran en la Figura 3-A y B. Sin embargo, y según las condiciones, puede generarse una gran cantidad de cistina que, como se verá, no favorece la retención posterior de las AgNPs sobre estos ligandos formados en el electrodo de trabajo.

Figura 2. Electro-oxidación de L-cys, en donde la cisteína es oxidada a cistina y a ácido cisteico ((B) barrido cíclico entre -0,8 a +1,8 V.).



Es imprescindible la limpieza de la superficie de los ET (GC), para una buena electropolimerización y medidas voltamétricas, evitando puntos de no conducción. Los ET se limpian y pulieron siguiendo el procedimiento descrito (sección 2.3.1). El pulido, inicialmente se realizó con material abrasivo (Al_2O_3) de mayor diámetro, y posteriormente de menor diámetro, para su mayor acción.

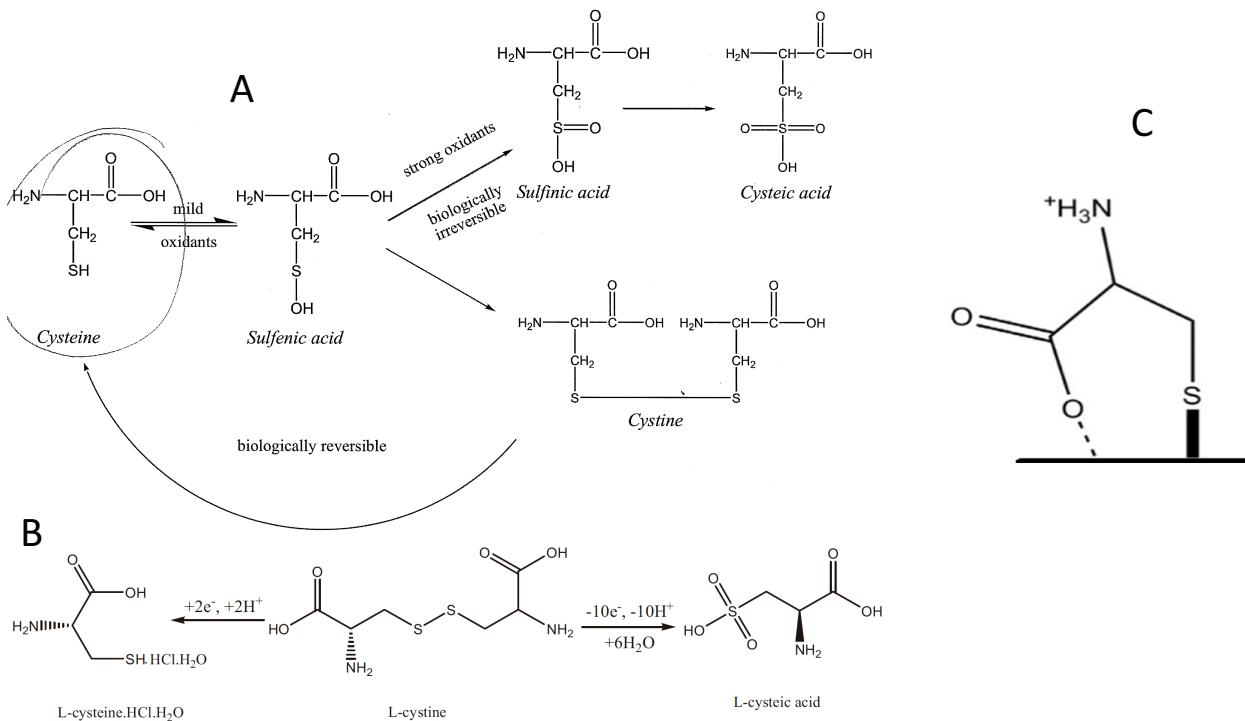
Se ensayó la activación química-electroquímica de los ET con la finalidad de aumentar las corrientes medidas, mediante barridos cíclicos de potencial (CV, $n=20$ ciclos, $E_i=-0,7$ V., $E_f=+2.5$ V.) en disoluciones de H_2SO_4 0,1 M. Sin embargo, los electrodos de trabajo siguiendo este procedimiento de limpieza fueron demasiado oxidados y los resultados de inmovilización (electropolimerización de monómeros) y medidas voltamétricas no mejoraron, por lo que únicamente se empleó el procedimiento de limpieza y pulido inicial indicado en la sección 2.3.1.

Una vez preparados los ET (limpios y pulidos), se llevó a cabo en ellos su modificación por formación electroquímica de un enlace covalente (L-cys), electropolimerización (Th, oPD) y/o depósito directo y secado de una disolución del monómero (*casting*), con los 3 ligandos estudiados. Estos ligandos tienen la finalidad de retener a las AgNPs de forma selectiva (en presencia de otras partículas sólidas electroactivas o NPs que pudieran encontrarse en una muestra problema), para posteriormente cuantificarlas por voltametría de redisolución (la técnica electroanalítica más sensible). Las condiciones de preconcentración han de realizarse de forma reproducible (tiempo de retención, t_{ret}), para posteriormente obtener resultados reproducibles, de forma similar a la técnica de voltametría de redisolución anódica. Los volúmenes sobre los que se llevó a cabo la retención de las AgNPs, sumergiendo el ET durante un tiempo t_{ret} , fueron de 200 μL .

Alternativamente, se ensayó también la retención de las AgNPs sobre el electrodo, a partir de las disoluciones de estándares y/o de muestras problema, directamente colocando un pequeño volumen de las mismas sobre el electrodo, y secando con cuidado con corriente de N_2 durante 5-10 min., para posteriormente realizar las medidas voltamétricas sobre una disolución con electrolito soporte KNO_3 0,10 M. Se evitó como electrolito soporte el KClO_4 , pues se observó pérdida de AgNPs (por oxidación química), a la vez que aparición de burbujas sobre el electrodo auxiliar debidas a la formación de gas Cl_2 .

En primer lugar, se optimizaron las condiciones de electropolimerización. Los CVs (voltágrafos cíclicos) obtenidos con un barrido de potenciales entre 0 y +1,5 V., se muestran en la Fig. 1-C. El hecho de obtener un solo pico anódico ($n=1e^-$) significa que no se forma cistina, que como se vió tiene una capacidad de retener AgNPs menor, sino que se produjo la unión al GC de la L-cys oxidada a través de un enlace –C-N (Fig. 2-C), quedando expuesto el grupo tiol, junto al carboxilo, para la unión de las AgNPs. A medida que se aumentó el número de ciclos de barridos de E (potencial), este pico iba disminuyendo, debido a la pasivación del ET, en concordancia con otros autores (y con otros procedimientos de electropolimerización de L-cys [(15)]). Se ensayaron desde $n=20$ a $n=2$ ciclos, observando que solamente son precisos 2 ciclos, pues los voltágrafos de medidas de las AgNPs no se modificaron. En concordancia con los CVs (Fig. 1-C), viéndose que no cambian para valores de n mayores de 2 ciclos. Por ello se concluyó que el número óptimo de ciclos es 2, ya que proporciona los mismos resultados que haciendo más ciclos y se realiza en menos tiempo.

Figura 3. Reacciones de electro-oxidación de la L-cys (A, B). Adsorción de L-cys sobre electrodo de GC (C).



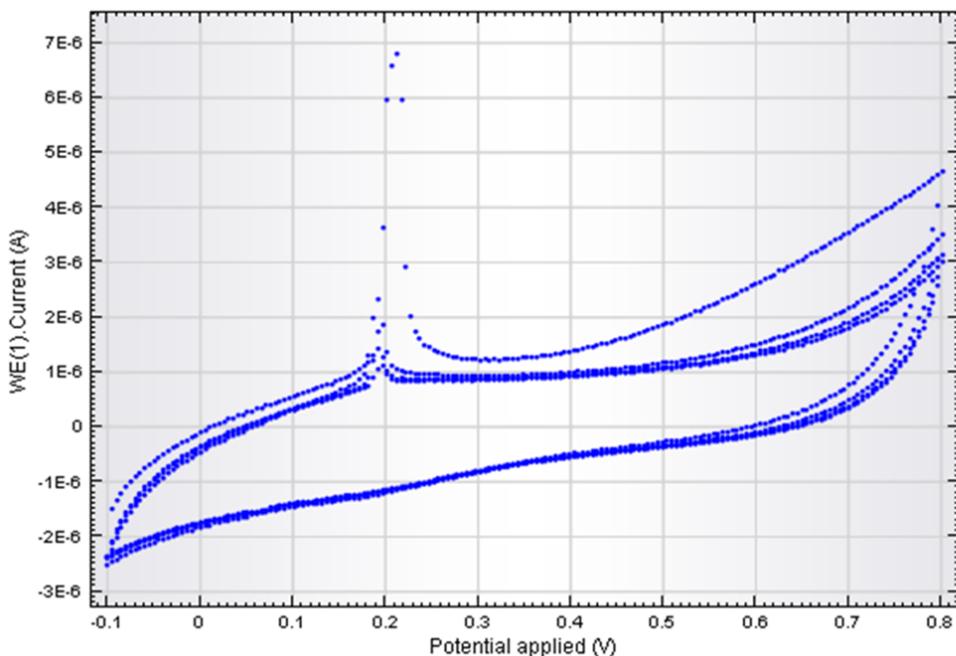
Otro parámetro muy importante que se optimizó, fue el rango de potenciales (E_i y E_f) entre los que se hicieron los barridos CV. Al comparar barridos cíclicos de potencial entre 0 y +1,5 V. (electrolito soporte PBS) (Fig. 1-C) (tipo 2), con realizados entre -0,8 a +1,8 V. (Figura 2-B) (tipo 1), se observó en este último caso un pico de reducción, debido a la reducción de cistina oxidada a cistina a partir de la disolución de monómero [(18)], además de un doble pico que significa la oxidación a cistina y muy probablemente a ácido cisteico (Figura 3_A y B), a alcanzar valores muy oxidantes de potencial (+1,8 V.). Es posible también, que se produjera la oxidación de la L-cys a ácido sulfínico, además de ácido cisteico, a potenciales tan elevados [(18)]. Como se comprobó posteriormente, la formación de oligómeros de cistina (que se quedan adsorvidos sobre el electrodo), y la formación de ácido cisteico u otras especies, desfavorecen la capacidad del electrodo GC modificado de unirse a nanopartículas de plata, a diferencia del mecanismo de unión covalente que proporciona una estructura como la indicada en la Figura 1-B. Esto se observó al obtenerse señales menores

en la siguiente etapa de medida voltamétrica. Por este motivo, el valor óptimo de que se empleó en CV fue de entre $E_i=0$ y $E_f=+1,5$ V. (tipo 2)

Como ya he comentado, el tipo de mecanismo de oxidación electroquímica tuvo una consecuencia muy importante en la capacidad de retención de AgNPs, obteniéndose mejores resultados con la ElPolym de tipo 2. Por ejemplo, en la cuantificación de AgNPs (10 ppm), con $t_{ret}=50$ min., se obtuvieron picos voltamétricos (DPV) con $E_p \approx +0,2$ V. e $i_p = 1,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{A}$ (tipo 1), frente a $i_p = 0,125 \mu\text{A}$ (tipo 2). Por éste motivo, se empleó en lo sucesivo la ElPolym de L-cys de tipo 2.

El pico voltamétrico de redisolución de oxidación de AgNPs ($\phi=40$ nm.) retenidas sobre el ET-L-cys (electrodo modificado con L-cys), tiene un potencial de pico de $E_p = +0,21$ V., como puede observarse en el CV de la Figura 4, lo que sirve para su identificación específica o selectiva. Se corresponde con el depósito de 2 μL de AgNPs (dispersión de 20 ppm), posteriormente secado con corriente suave de N_2 .

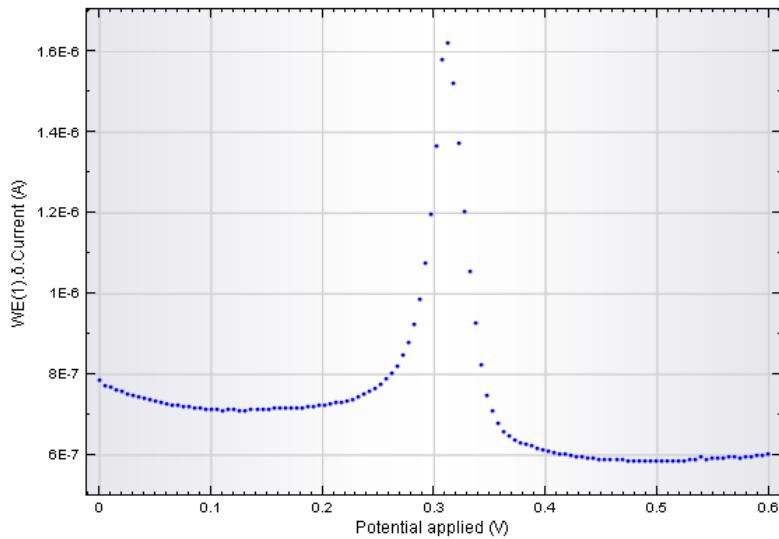
Figura 4. Cuantificación de AgNPs retenidas por un electrodo GC modificado con L-cys, mediante voltametría cíclica ($n=4$ ciclos; $v=20$ mV/s).



Para la cuantificación de AgNPs ($\phi=40$ nm.), inicialmente se ensayaron medidas de CV (barrido lineal escalonado, $v=20$ mV/s), observándose en ciclos sucesivos la disminución de i_p debidos a las AgNPs, lo que indica su pérdida sobre el electrodo y el paso a la disolución en forma iónica Ag^+ , al ser oxidadas y sin tiempo para su pre-concentración en los tiempos de la medida y sobre un gran volumen de 15,0 mL. en la cubeta voltamétrica.

Sin embargo, la cuantificación tuvo mayor sensibilidad mediante DPV (voltametría diferencial de pulsos), por lo que las medidas posteriores fueron con esta técnica impulsional. Un tipo de barrido (DP) que, junto a la voltametría de onda cuadrada (SW, square-wave), es la más sensible en voltametría. La CV, con un barrido escalonado, si bien es adecuada para la electropolimerización (no hay medida de corriente relacionada con pequeñas concentraciones), fue mucho menos sensible para la medida de las AgNPs (dispersión en pequeñas cantidades) que la DPV. Las condiciones DPV son las indicadas en la sección 2.3.5.b.

Figura 5. Cuantificación de AgNPs retenidas por un electrodo GC modificado con L-cys, mediante voltametría diferencial de pulsos (DPV).



La cuantificación de AgNPs por DPV obtuvo voltágrafos como el de la Figura 5, en las condiciones indicadas en la misma Fig., con un barrido anódico entre 0 y +0,6 V., y con un $E_p \approx +0,30$ V. característico.

Si bien inicialmente se emplearon valores altos de t_{ret} (de hasta 1 h. o más), siempre es conveniente emplear menos tiempos para las cuantificaciones de AgNPs. Para poder medir concentraciones entre 0,01 y 20 ppm (valores medios de concentraciones que nos podemos encontrar en muestras o contaminación de éstas NPs), son precisos tiempos de retención (t_{ret}) como mínimo del orden de 10-15 minutos, para obtener señales voltamétricas con i_p del orden como mínimo de 0,005 μ A. No obstante, para las concentraciones más pequeñas, fueron necesarios t_{ret} del orden de 30 min. o incluso de 40 min. (<5 ppm), para obtener valores de $i_p \approx 0,05$ μ A.

Otro aspecto importante, fué el rango de potenciales para el barrido anódico de cuantificación de las AgNPs. Se observó que en presencia del grupo tiol, es muy fácil la oxidación electroquímica de la Ag(0) a Ag⁺, es decir que se produce a potenciales muy pequeños. Evidentemente, esto dificulta las medidas, pues potenciales tan sólo algo más positivos de E_p , podrían oxidar muy fácilmente a éstas NPs, o a la inversa, potenciales de medida algo catódicos que E_p de reducción de Ag*, podría reducir muy fácilmente a iones Ag⁺ retenidos (con mucha más afinidad, incluso) por el ligando L-cys inmovilizado sobre el ET. Este aspecto se estudió, y se describe un poco más adelante. Por éste motivo, la cuantificación de las AgNPs se realizó por DPV en el rango más pequeño posible, entre +0,2 y +0,45V. La forma del pico y E_p no cambió con un rango mayor (0,0 a +0,6 V.), sin embargo, se obtuvo mayor irreproducibilidad en valores de i_p por este motivo.

Sucesivas medidas DPV realizadas consecutivamente, hicieron disminuir i_p , lo que significa la pérdida parcial (no completa durante el dominio de tiempo de la propia medida) de las AgNPs retenidas por la L-cys. Por ejemplo, midiendo 20 ppm de AgNPs ($\varnothing=40$ nm.), $t_{ret}=80$ min., cinco medidas consecutivas produjeron valores de i_p de 1,34 μ A, 0,78 μ A, 0,38 μ A, 0,19 μ A, 0,15 μ A, y 0,12 μ A, lo que significa que disminuye la cantidad de AgNPs retenidas al pasar a Ag⁺ durante las medidas. Además, estos iones Ag⁺ generados pasan a la disolución y no son retenidos por la L-cys, lo que se comprobó midiendo con un barrido de potenciales inverso (catódico), como se indica a continuación.

Las medidas de los picos voltamétricos responden linealmente a la concentración de AgNPs, por ejemplo, dispersiones de 5-10-20 ppm ($t_{ret}=80$ min.) produjeron corrientes de pico de $i_p=0,180-0,255-1,34$ μA , respectivamente.

En el caso de querer mejorar la sensibilidad, ésta aumenta al aumentar los tiempos de retención previa a la cuantificación voltamétrica (se llevan a cabo en disoluciones distintas). Sin embargo, es preciso evitar la saturación de los sitios de unión, pues en ese caso, mayores tiempos no significan un aumento de las señales. En un caso muy extremo, se ensayó un $t_{ret}=3$ días (120 h.), para una dispersión de 20 ppm AgNPs, no aumentando las señales ($i_p=1,032$ μA), lo que indica la saturación con AgNPs de todos los grupos funcionales de retención. Sin embargo, para tiempos pequeños, no se produce esta saturación aun con grandes cantidades de AgNPs. Por ejemplo, 200 ppm de AgNPs con $t_{ret}=7-10-15$ min., produjeron máximos de corriente de $i_p=0,193-0,211-0,65$ μA , respectivamente.

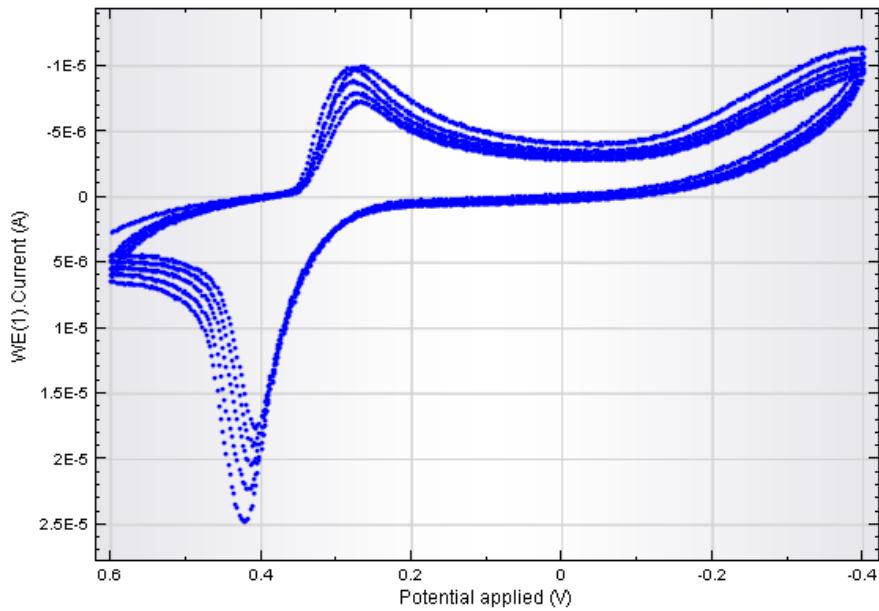
La reproducibilidad de las medidas fue aproximadamente del orden del 10% RSD (desviación estándar relativa) para dispersiones de 10 ppm ($t_{ret}=30$ min.), que si bien no tienen un valor bajo, es suficiente para la finalidad de detección rápida (*screening*) de contaminación producida por éstas NPs. Los valores de LOD (límite de detección) fueron del orden de 0,05 ppm ($t_{ret}=60$ min., $3X SD_{blanco}$), y el LOQ (límite de cuantificación ($t_{ret}=60$ min., $10X SD_{blanco}$) fue de 2 ppm de AgNPs, con este ligando.

En el trabajo que realizamos, consideramos muy importante la posibilidad de diferenciar analíticamente entre NPs sólidas (AgNPs) e iones Ag^+ , dada la facilidad con la que pueden oxidarse o reducirse estas especies en presencia de L-cys, y por lo tanto producirse muy fácilmente a pequeños potenciales o incluso en presencia de disoluciones con oxígeno disuelto (previamente se desoxigenaron con el paso de corriente de N_2 durante 5-10 min.). La forma de diferenciar es clara, los iones Ag^+ producirán un pico de reducción durante un barrido catódico, mientras que las AgNPs sólo podrán producir un pico de oxidación voltamétrica en un barrido anódico. Ambas especies son retenidas por la L-cys, y todavía con más afinidad los iones Ag^+ que las AgNPs. Se realizaron también ensayos de una oxidación (o reducción) previa de las AgNPs (o sobre una disolución de Ag^+), previa al barrido de potenciales correspondientes, para confirmar los picos voltamétricos obtenidos. De esta forma, se consiguió detectar (y cuantificar) de forma distinta (especiación) a las AgNPs y a los iones Ag^+ .

Para comprobar la presencia de Ag^+ , que también se retiene fuertemente por el ET modificado con L-cys, se realizaron estudios a partir de disoluciones de Ag^+ , y también estudios de preconcentración electroquímica previa (E_e , t_e) antes de un barrido anódico (oxidación de las AgNPs formadas por el pretratamiento catódico), o un barrido catódico (reducción de las Ag^+ retenidas por la L-cys, formadas por la oxidación previa de AgNPs o de la propia disolución de medida). De esta forma, se realizó su especiación voltamétrica.

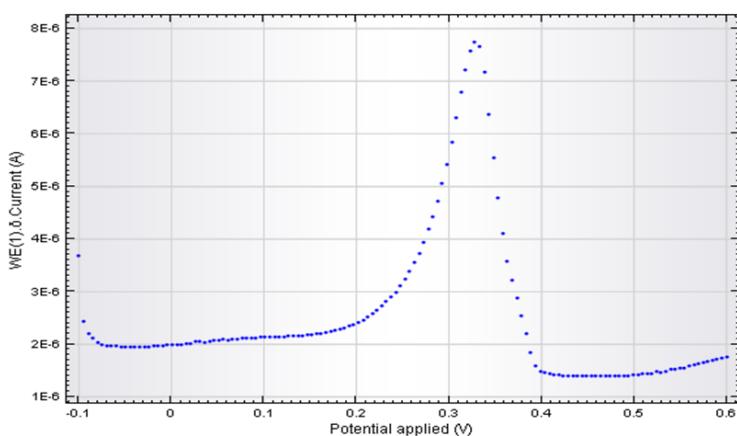
En la Figura 6, se muestran CVs de una disolución de Ag^+ de 100ppm ($v=20\text{mV/s}$, $n=5$ ciclos), observándose una disminución de los valores de i_p anódicos y catódicos, a medida que va disminuyendo la cantidad de Ag^+ retenida por la L-cys.

Figura 6. Voltágrafos cíclicos ($n=5$ ciclos) de una disolución de 100 ppm de Ag^+ , con electrodo GC-L-cys.



La introducción del electrodo ET-L-cys en una disolución de Ag^+ (200 μL , 20 ppm Ag^+ , $t_{\text{ret}}=15$ min.), una vez trasladado a la disolución de medida voltamétrica (V total cubeta=5mL KNO_3 , para medir, DPV), produjo picos DPV (barrido desde -0,1 V. a +0,6 V.) con $E_p=+0,3$ V. e $i_p = 1,43 \mu\text{A}$ (Fig. D F6). En el caso de electrolysis previa de la disolución adsorbida (potencial de electrólisis, $E_e = -0,10$ V.; tiempo de electrolysis, $t_e=150$ s.), se obtuvo un pico $i_p=6,18 \mu\text{A}$. En condiciones de $t_e=300$ s., se obtuvo $i_p=14,29 \mu\text{A}$ (Fig. E F7), y si $t_e=450$ s., $i_p=14,31 \mu\text{A}$, lo que significa una saturación (*i.e.*, la señal no aumenta con mayores tiempos de electrolysis para la generación de plata metálica $\text{Ag}(0)$, al estar saturados los sitios de unión de la L-cys).

Figura 7. Voltágrafo DPV de una disolución de Ag^+ , con un electrodo GC modificado con L-cys.



Barridos catódicos sirven también para la cuantificación sensible de Ag^+ formada a partir de AgNPs retenidas por la L-cys. Para indicar valores de referencia, 20ppm AgNPs ($t_{\text{ret}}=50$ min, $t_e=300$ s, $E_e=-0,1$ V, DPV de +0,1 a +0,4V), produjo picos con i_p del orden de 0,104uA lo que indica que hay Ag^+ que se ha generado a partir de la electrólisis previa y posteriormente determinada de forma muy sensible por voltametría de redisolución.

Para mayor confirmación, sobre iones Ag^+ retenidos por la L-cys, se llevaron a cabo barridos catódicos y anódicos, cada uno de ellos medidos por primera vez, para evitar oxidaciones o reducciones electroquímicas anteriores debidas al potencial empleado en medidas previas. Se comprobó de esta forma que únicamente aparece el pico catódico de la Ag^+ , dado que no es posible su oxidación, y de esta forma, con los cuidados comentados, podremos especiar en una muestra real y diferenciar entre plata iónica y partículas metálicas.

Esto es especialmente importante en el estudio de muestras reales, puesto que las AgNPs pueden estar recubiertas de óxido de plata, y por lo tanto encontrarse parcialmente oxidadas previamente a las medidas voltamétricas. Además, tratamientos de电解sis previa sobre las NPs (o Ag^+) retenidas, permiten su transformación electroquímica total, permitiendo así cuantificar la cantidad total de plata de una muestra contaminada con estas NPs, en pequeñas cantidades.

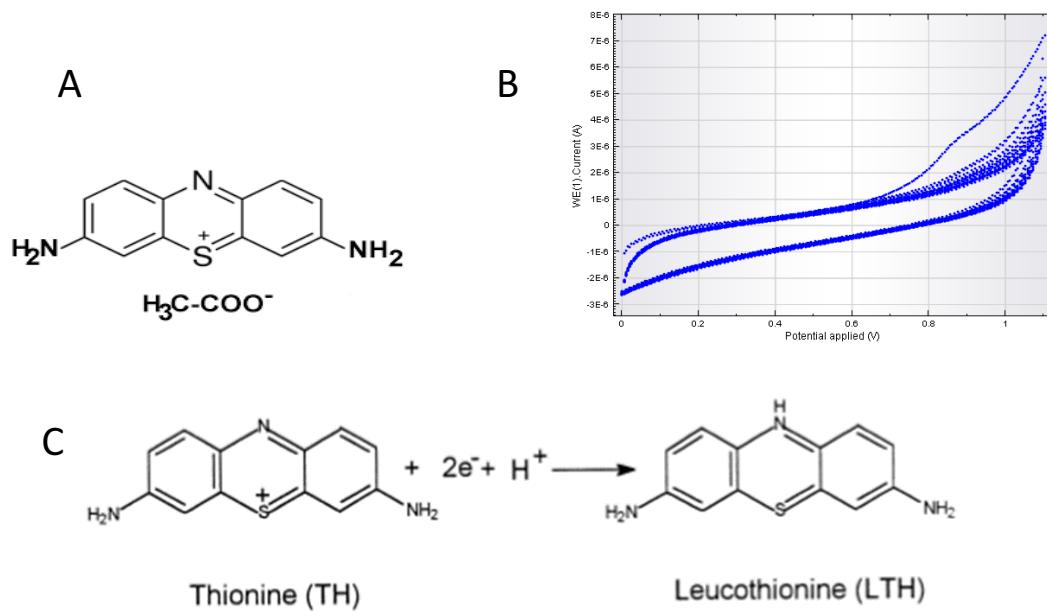
Otra posibilidad que se ha ensayado para la modificación del electrodo de trabajo de Pt (y Au) con L-cys es el procedimiento denominado ***casting***, en lugar de electroquímicamente, por simple deposición de una concentración de L-cys y su posterior secado sobre el ET (sección 2.3.2). En este caso, sobre el electrodo metálico de Pt y de oro se produce la quimisorción de la L-cys, a través de la unión fuerte del grupo tiol sobre el carbono (formaciones de monocapas autoensambradas, con un enlace coordinado del átomo $-\text{O}^-$ del grupo carboxilo, formando una estructura cíclica muy estable y con los grupos amino orientados externamente [(18)] (Figura 3-C). No se ha llevado a cabo en la bibliografía científica ningún estudio anterior de esta estructura para la retención de AgNPs, hasta nuestro conocimiento. Sin embargo, la orientación que produce esta adsorción sobre el electrodo metálico (Figura 3-C), produjo una baja capacidad de retener a las AgNPs, y se obtuvieron sensibilidades mucho menores que en el caso de la formación de enlaces $-\text{C}-\text{N}$ - electroquímicamente. La retención de las Ag^+ es incluso mayor que las AgNPs, y mayor en el caso del Pt que en el caso del ET metálico de Au. Por ejemplo, 20 ppm Ag^+ ($t_{\text{ret}}=15 \text{ min.}; E_e=-0,1\text{V.}, t_e=300\text{s}$) produjo picos $E_p=+0,32 \text{ V.}$, con $i_p=0,11 \mu\text{A}$ (Pt) y de $i_p=0,05 \mu\text{A}$ (Au). Al igual que ocurría con la modificación electroquímica, los picos voltamétricos DPV disminuyen en posteriores medidas con barridos DPV sucesivos. El comportamiento distinto de los substratos de electrodo puede deberse a la mucha mayor adsorción del metal Au hacia el grupo tiol, que con respecto al Pt.

3.2. Ligando Tionina

La tionina (Th) (Figura 8) es una fenotiazina con dos grupos amino distribuidos simétricamente en los dos lados de la estructura aromática de la molécula. La tionina (Th) (Figura 8-A) puede oxidarse electroquímicamente formando polímeros de poli-tionina (PTh) que se unen a través de enlaces de $-\text{NH}-$ [(20)], pero que tienen diferente estructura química dependiendo de la forma de llevar a cabo esta electropolimerización [(21)]. Los oligómeros formados electroquímicamente, son insolubles en agua, por lo que quedan fuertemente adheridos sobre el GC. El polímero PTh tiene una buena conductividad, y presenta altas velocidades de transferencia de carga, por lo que a veces se le ha empleado como mediador de transferencia de carga en biosensores electroquímicos [(22)].

Los polímeros PTh contienen un gran número de grupos funcionales amino externos, por lo que potencialmente pueden retener selectivamente NPs de Plata. El objetivo es usarlo como ligando de retención de las AgNPs, para su posterior cuantificación por voltametría de redisolución. Esta posibilidad no se ha estudiado hasta la fecha en la bibliografía científica, en nuestro conocimiento [(21) (20) (22)].

Figura 8. Molécula de Tionina (Th) (A). Electropolimerización (B) y reacciones electroquímicas del monómero (C)

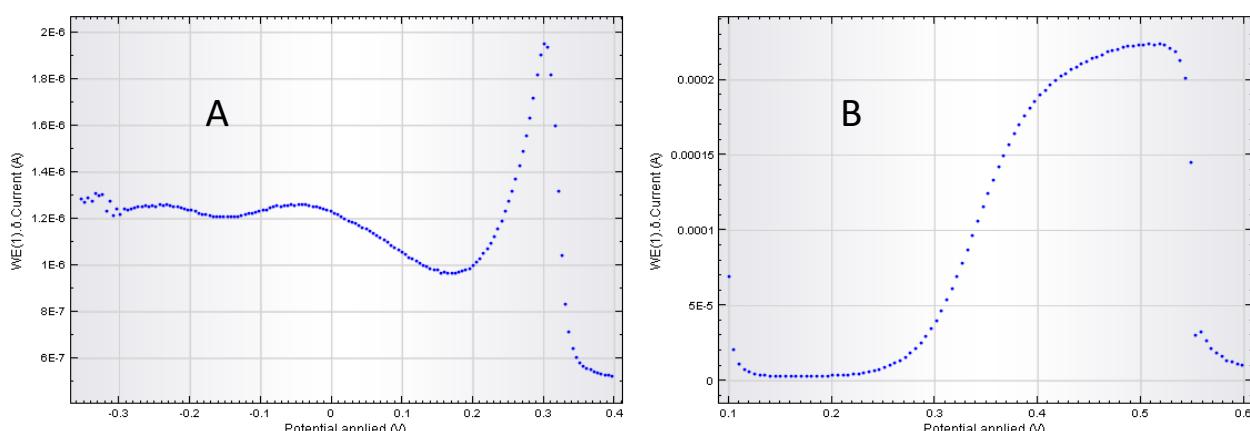


Como se observa en la Figura 8 (electropolimerización de laTh para dar lugar a la PTh), se produce una disminución importante de la corriente anódica entre el primer ciclo y ya el segundo, lo que indica la fácil pasivación del ET por el aumento de la resistencia eléctrica del oligómero que autolimita su posterior formación en mayor cantidad. El ligando tionina se electropolimeriza provocando que los grupos aminos se eliminen de la molécula permitiendo la unión entre los extremos de los anillos de dos moléculas distintas. Para poder unirse al electrodo y que tenga el amino libre para retener las nanopartículas debe de estar en la forma reducida.

En general, los electrodos modificados por la ElPolym de Th (GC-PTh) produjeron menores retenciones que los modificados con L-cys, como se muestra en los resultados indicados a continuación.

Comenzando con la retención de Ag^+ (100 ppm, $t_{\text{ret}}=30\text{min}.$), se realizó su medida por voltametría de redissolución: $E_e=-0,4\text{V}$, $t_e=60\text{s}.$, DPV desde -0,4 a +0,6, obteniéndose $i_p=1,01\mu\text{A}$, $E_p=+0,28\text{ V}$. (ver Figura 9).

Figura 9. Voltagrama típico DPV de reducción de Ag^+ retenida sobre GC-PTH (A). Voltagrama DPV de reducción de Ag^+ (100 ppm), sobre electrodo GC-PTH (B).



En cuanto a su determinación voltamétrica directa (no por redisolución), 10 ppm de AgNPs, $t_{ret}=30$ min., produjo picos de corriente muy pequeños ($i_p \approx 0,005 \mu A$, $E_p \approx 0,26-0,30 V.$).

De forma notable, se producen picos de redisolución asimétrico, con una bajada brusca de corriente en el momento de la pérdida completa de AgNPs sólidas retenidas sobre el ET. Pero, sin embargo, son precisas concentraciones muy grandes para poder obtener estos picos voltamétricos, dada la baja capacidad de retención que tiene el pTh sobre las AgNPs, en estas condiciones experimentales de preparación. Por lo tanto, deberían de estudiarse más a fondo estas condiciones experimentales, para considerar su uso como ligando de afinidad y con mejores propiedades que otros ligandos ya ensayados. Este estudio ya quedó fuera del alcance del trabajo del TFG que se presenta, limitado en el tiempo y en la dedicación de créditos ECTS), pero abre una muy interesante vía de trabajo de investigación.

Otro aspecto importante, es la caracterización del diámetro de las NPs, pues influye enormemente en sus propiedades físicas, químicas, y toxicológicas. Es de prever cambios energéticos en la retención de las AgNPs por los ligandos empleados y en función de su tamaño. Estos cambios, pueden traducirse en energías potenciales diferentes en los voltogramas de medida, es decir, en variaciones de E_p , como ya han reportado otros autores con otros tipos de NPs metálicas [(7) (9) (8)]. Se empleó el procedimiento de voltametría de nanopartículas inmovilizadas, colocando sobre el ET-PTh 2 μL de una dispersión de AgNPs de 20 ppm, para posteriormente realizar (una vez secadol la medida voltamétrica DPV. Los resultados de 4 experiencias realizadas con el mismo ET-PTh se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Potenciales y corrientes de los picos voltamétricos DPV en función del diámetro de las AgNPs (20 ppm, VnP 2 μL).

Nº de experiencia	Diámetro (nm)	Potencial (E_p , V.)	Corriente DPV (i_p , μA)
1	40	0,296	0,402
	60	0,257	0,354
	80	0,231	0,326
2	40	0,290	0,399
	60	0,256	0,350
	80	0,234	0,322
3	40	0,300	0,398
	60	0,260	0,360
	80	0,236	0,321
4	40	0,301	0,400
	60	0,262	0,358
	80	0,235	0,322

De estos resultados, se comprobó que menores diámetros de AgNPs conllevan un cambio hacia mayores valores de E_p y a un aumento de los valores de i_p . Este comportamiento es similar al observado por otros autores (dentro de nuestro grupo de investigación) [(8) (9)], y permite evaluar el tamaño de las AgNPs

mediante esta técnica voltamétrica, comparando los resultados que se obtienen en función del diámetro que tienen estas NPs.

Se midieron las variaciones de la corriente en función de las cantidades de AgNPs (dispersiones de 5, 10 y 20 ppm), para los tres diámetros estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 2. En estos resultados, se comprobó una relación lineal entre la cantidad de AgNPs depositadas sobre el ET modificado con PTh y las corrientes máximas de los picos voltamétricos DPV.

Tabla 2. Variación de la corriente (i_p) y del potencial de pico (E_p) de los picos voltamétricos VnPi (DPV) para distintas cantidades de AgNPs inmovilizadas sobre electrodo ET-PTh.

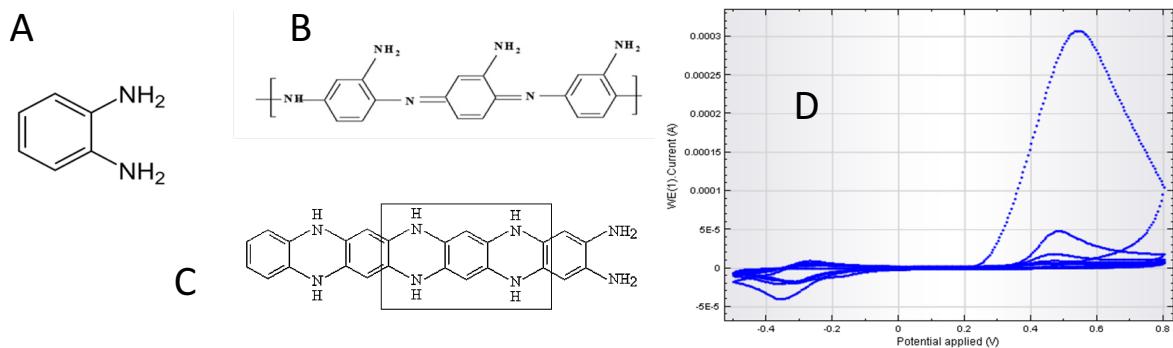
Nº de experiencia	AgNPs (ppm)	Potencial (E_p , V.)	Corriente DPV (i_p , μA)
1 (40 nm)	5	0,299	0,040
	10	0,298	0,200
	20	0,300	0,406
2 (60 nm)	5	0,255	0,020
	10	0,256	0,177
	20	0,256	0,360
3 (80 nm)	5	0,233	0,010
	10	0,232	0,155
	20	0,234	0,318

3.3. Ligando o-fenilen-diamina (oPD)

La orto-fenilen-diamina (oPD) (Figura 10-A) es un compuesto orgánico que puede ser electropolimerizado, a través de la formación inicial de un radical, y que forma polímeros (oPPD) no conductores. Por el propio carácter no conductor de la oPPD, a medida que se van sintetizando capas de oligómeros sobre el electrodo va aumentando su resistencia eléctrica, por lo que su crecimiento va disminuyendo, y normalmente se autolimita a polímeros oPPD de un espesor del orden de 10 nm. [(14)]. Dependiendo de la forma en la que se realiza la electropolimerización, el polímero oPPD resultante tiene una estructura química distinta que, a priori, puede cambiar drásticamente su capacidad para retener selectivamente a las AgNPs. Tampoco se ha descrito en la bibliografía su síntesis para esta finalidad, si bien en nuestro grupo de investigación sí lo hemos empleado para entrampar enzimas y en biosensores amperométricos enzimáticos [(14)].

La EIPolym a E cte. y con barridos CV hacen que los dos grupos funcionales amino reaccionen de distinta forma. El polímero oPPD resultante de la electropolimerización a E=cte. es de tipo I (Figura 10, B), mientras que un barrido cíclico forma una estructura con mayor cantidad de grupos amino externo terminales (Figura 10, A), y por lo tanto, *a priori* con mayor capacidad de retener AgNPs.

Figura 10. Molécula de monómero de oPD (A), que da lugar a polímeros oPPD no conductores (B, C) mediante electropolimerización con barridos cíclicos de potencial (D).



Con la ortofenilendiamina (OPD) se realizan dos tipos de electropolimerizaciones, de tipo 1 (barrido cíclico), y de tipo 2 (a potencial constante), en la forma que se indica en la sección 2.3.4.

La electropolimerización tipo 1 provoca que los grupos aminos de la molécula formen enlaces con el doble enlace de la siguiente molécula, donde se pierden dos protones de los aminos lo que deja disponibles los electrones para la reacción. Con esta estructura, queda un nitrógeno externo disponible para retener las nanopartículas de plata (Figura 10-B) [14]).

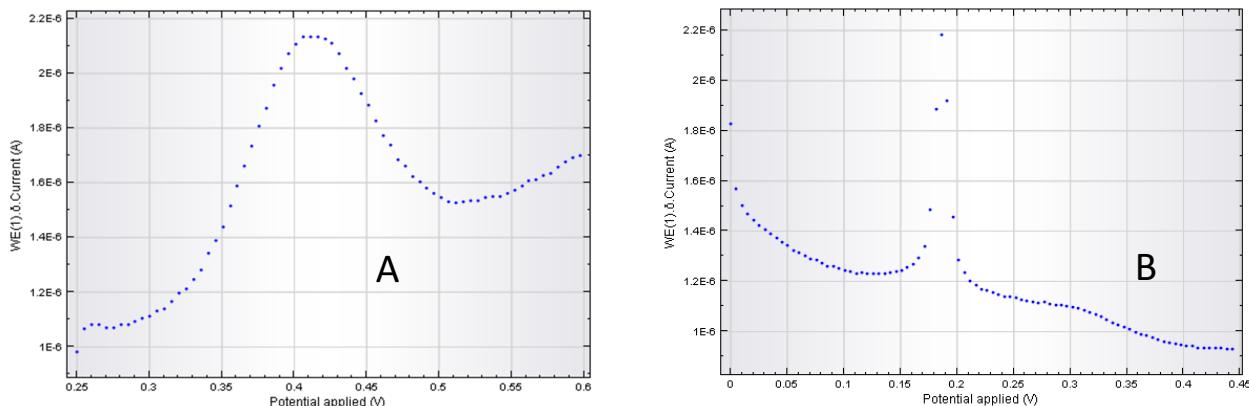
En la ElPolym de tipo 2, cada uno de los grupos amino forma un doble enlace con el siguiente anillo quedando este modificado sus dobles enlaces para que ambos estén conjugados con el primero. Esta conformación le permite a la molécula tener dos grupo amino libres por cada anillo aromático, aunque teniendo *a priori* una menor capacidad de retención de plata (como luego se comprobó experimentalmente) dada su posición y entorno molecular (Figura 10-C) [14]).

Una vez modificados ETs de GC con ambos procedimientos, se comprobó su comportamiento en la retención de AgNPs con experiencias de retención selectiva similares a las descritas para los otros ligandos (AgNPs 10 ppm; $\varnothing=40$ nm.; retención y medida voltamétrica DPV). Los electrodos modificados con la ElPolym de tipo 2 no tienen capacidad de retener a las AgNPs, lo que concuerda con una estructura de grupos funcionales amino poco accesibles para esta retención. Sin embargo, con la ElPolym de tipo 1 (barridos cíclicos de potencial), sí que se observó esta capacidad de retener selectivamente a las AgNPs, también concordante con la estructura química del polímero oPPD resultante (Fig. 10-B).

Con el electrodo de tipo 1, se realizaron ensayos con concentraciones (dispersión) entre 0,5 ppm y 20 ppm de AgNPs, y con $t_{ret}=10-60$ min. Los picos de redisolución (DPV) fueron más pequeños para similares condiciones que los que se obtuvieron para los ligandos L-cys y PTh, con lo cual la sensibilidad de este ligando para la cuantificación de AgNPs fue menor con el ligando PTh. Los valores de E_p se encontraron (para este diámetro de las AgNPs, 40 nm), en valores próximos a $E_p=+0,41$ V. En la Figura 11-A se muestra un voltágrafo DPV típico de AgNPs retenidas con el electrodo GC-oPPD, en donde se muestra que los picos voltamétricos son también más anchos que con el resto de ligandos estudiados.

Se comprobó si el pico que aparecía en el potencial +0,41 V interfería con la medida de las AgNPs o simplemente no retenía estas nanopartículas. Para ello se electropolimerizó el electrodo de trabajo y después se hicieron dos ciclos de 0 a +0,6 V para conseguir que el monómero retenido se electropolimerizase. Después de esto, se dejó 20 minutos en adsorción con 10 ppm de AgNPs. A continuación, se midió y no se observó ningún pico. Tras realizarse varias pruebas, todas ellas con el mismo resultado, se determinó que la oPPD no retiene las AgNPs.

Figura 11. Voltágrafos DPV típicos de determinación de AgNPs: (A) AgNPs retenidas con electrodo GC-oPPD. (B) AgNPs (20 ppm) depositadas (2 μ L, *casting*) sobre electrodo GC-*bare*, y posterior redisolución voltamétrica.



3.4. Electrodo GC sin modificar (*bare*)

Por último, y en la dedicación (limitada) propia de un trabajo TFG (créditos ECTS y finalidad de este trabajo), se realizaron experiencias del mismo tipo a las anteriores con electrodos GC sin modificar. Las AgNPs se depositaron directamente sobre el ET-*bare* (2 μ L), se secaron cuidadosamente con corriente de N₂ (\approx 5 min.), y se llevó a cabo a continuación la determinación voltamétrica (DPV) introduciendo el ET modificado en el electrolito soporte (KNO₃). Este tipo de medida, tiene mucha similitud con la denominada voltametría de partículas inmovilizadas. Las ventajas frente a la retención de las AgNPs dispersas en una disolución son las de emplear menores volúmenes de muestra o de estándar (2 μ L frente a 200 μ L), y experiencias mucho más rápidas, pues no son necesarios tiempos de retención que, en algunos casos (como ya se ha mencionado), llegaban a más de 60 min. Los voltágrafos de AgNPs depositadas (*casting*), dieron lugar a picos voltamétricos de redissolución muy estrechos (Figura 11-B), lo que significa una velocidad de transferencia de carga muy rápida.

En experiencias que he descrito antes, ya hemos empleado el mismo procedimiento (*casting* sobre el ET de la muestra). Por lo que podremos comparar los resultados en función de los ligandos anteriores frente al GC-*bare* (sin modificar). Como se indica en este trabajo, la L-cisteína y la tionina consiguen retener las AgNPs con gran afinidad, mientras que la oPPD tiene una capacidad de retención mucho menor. Estos ligandos permiten aumentar la señal al preconcentrar eficientemente las AgNPs sobre los ET, y por lo tanto proporcionan corrientes mayores que, por ejemplo, en el caso del GC-*bare*, y cuando se emplea la técnica que hemos denominado de retención selectiva. Sin embargo, los electrodos GC-*bare* constituyen otra posibilidad interesante en combinación con la técnica que hemos denominado de *casting* (adsorción física de las AgNPs sobre la superficie del electrodo): si bien se pierde la selectividad del ligando, se gana en sensibilidad. La selectividad del electrodo GC-*bare* para cuantificar solamente AgNPs se debe a los valores de E_p, distintos a los de otras NPs metálicas, por ejemplo, NPs de Au, que también son muy empleadas.

Mediante el *casting* (adsorción) de las AgNPs (40 nm.), se realizaron medidas DPV en el intervalo de 0,15 V a 0,3 V., obteniéndose picos voltamétricos dependientes de la concentración en valores E_p \approx 0,20 V. En la TX se muestran los resultados de una curva de calibrado entre 0,50 y 20,0 ppm. Se obtuvo una relación lineal entre la concentración dispersa de AgNPs de los estándares medidos y las corrientes máximas de los picos

voltamétricos DPV (i_p), en el intervalo de concentraciones estudiado ($R=0,9953$, coeficiente de correlación lineal).

Tabla 3. Medidas de una curva de calibrado de AgNPs, mediante VnP inmovilizadas.

AgNPs (ppm)	Ep (1)	Ep (2)	Ep (media)	ip (1)	ip (2)	ip (media)
0,5	0,212	0,206	0,209	0,031	0,029	0,030
1	0,217	0,201	0,209	0,063	0,050	0,056
2	0,212	0,201	0,207	0,138	0,152	0,145
5	0,207	0,196	0,202	0,422	0,377	0,400
10	0,200	0,205	0,203	0,790	0,659	0,724
15	0,210	0,191	0,201	0,965	1,000	0,983
20	0,203	0,199	0,201	1,501	1,325	1,413

También se obtuvo una buena reproducibilidad en la determinación replicada de 10 ppm de AgNPs ($n=10$ medidas): $0,790 \pm 0,070 \mu\text{A}$ (media \pm SD), con una desviación estándar relativa de $\%RSD=8,86\%$. Los límites de detección y de cuantificación (sobre medidas replicadas de blancos), definidos anteriormente fueron respectivamente: LOD=0,01 y LOQ=0,09 ppm de AgNPs.

En conclusión, el procedimiento voltamétrico (casting+VnP sobre electrodo GC-bare) permite la detección selectiva y la cuantificación sensible de AgNPs en los rangos de concentración estudiados.

4. Conclusiones

A continuación, resumo las **conclusiones más importantes** de este trabajo.

1. Se ha estudiado la capacidad de retención de AgNPs en pequeñas concentraciones en dispersión (0,1-20 ppm), sobre ligandos inmovilizados sobre electrodos de trabajo GC y metálicos (Pt y Au), y su posterior cuantificación mediante voltametría de redisolución. El procedimiento permite detectar y cuantificar AgNPs de forma selectiva (debido al ligando), y sensible (debido a la posterior determinación voltamétrica de las NPs retenidas sobre el ET).
2. Se ha estudiado otro procedimiento (que hemos denominado voltametría de nanopartículas inmovilizadas), por el que hemos depositado un pequeño volumen (2 μL) de dispersión de AgNPs (*casting*), que posteriormente se determina por DPV para cuantificar de forma también muy sensible las AgNPs adsorbidas. En este procedimiento, el depósito sobre el ligando permite retener selectivamente a las AgNPs, frente a electrodos GC-bare sin modificar. En ambos casos, la sensibilidad obtenida fue alta, con LODs del orden de 0,01 ppm y LOQs del orden de 0,10 ppm de AgNPs.
3. Hemos propuesto la inmovilización sobre electrodos GC de los ligandos L-cys por formación de enlace – C-N- con la aplicación de un potencial oxidante, y de Ph y oPD mediante un novedoso procedimiento de electropolimerización con la finalidad de obtener polímeros con gran cantidad de grupos funcionales externos con capacidad de retener selectivamente a las AgNPs sobre la superficie de los electrodos de trabajo, previa a su determinación voltamétrica. En el caso de la electropolimerización del oPD, la

morfología del oligómero oPPD obtenido es muy distinta si se realiza a potencial constante o mediante un barrido cíclico, lo que influye enormemente en su capacidad de retener las AgNPs (mucho mayor en el barrido cíclico, al dejar los grupos amino en posición más externa).

4. Hemos observado distintas capacidades de retención de las AgNPs entre los tres ligandos estudiados (L-cys, Th, oPD) y con respecto a electrodos GC-*bare*. De forma muy resumida, la capacidad de retención de los ligandos L-cys y PTh es muy superior a la capacidad de la oPPD. A su vez, es menor todavía la capacidad de retención de las AgNPs (casi inexistente) sobre la superficie del *glassy-carbon* (GC) sin modificar. Sin embargo, las AgNPs se quedan fuertemente adheridas sobre la superficie del GC-*bare* (casting), que permite su cuantificación sensible por voltametría de redisolución (VnPi, voltametría de NPs inmovilizadas).
5. Los ligandos estudiados se unen a las AgNPs dispersas en los patrones (o muestras) a través de grupos amino presentes en gran cantidad, no solamente por mecanismos de afinidad entre el grupo amino, sulfuro o carboxilo y la plata metálica, sino también a través de atracción electrostática, dado que las AgNPs empleadas se hallaban recubiertas de aniones citrato para mejorar su estabilidad en dispersión y evitar su agregación.
6. Se ha conseguido el objetivo propuesto de detectar y cuantificar de forma rápida, selectiva y sensible a nanopartículas de plata, mediante técnicas de preconcentración y medidas voltamétricas novedosas para esta finalidad. Los procedimientos descritos permiten también diferenciar distintos tamaños de AgNPs ($\varnothing \approx 40-80$ nm), y entre nanopartículas metálicas y sus correspondientes iones disueltos (Ag^+), lo que es muy importante en muestras contaminadas con estas NPs, en donde es importante esta caracterización por la presencia natural de estos diversos estados, por ejemplo, en muestras de medio ambiente.
7. Los procedimientos electroquímicos descritos permiten el diseño de (bio)sensores para AgNPs, con técnicas de transducción voltamétricas, muy importantes y muy necesarios como indican las directrices europeas, que demandan cada vez una mayor tecnología analítica para NPs y NM. Estos (bio)sensores tienen su utilidad más importante en la detección precoz (métodos de screening) de estas NPs, y para su cuantificación sencilla y muy rápida. Normalmente, como sistemas de alerta y de paso previo a técnicas de confirmación más lentas y con instrumentación mucho más compleja y sofisticada.

5. Bibliografía

1. *Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact.* López-Serrano, A. et al. 2014, Analytical Methods, Vol. 6, págs. 38-56.
2. *Evaluating engineered nanoparticles in natural waters.* Weinberg, H. et al. 2011, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, págs. 72-83.
3. *Applications and Toxicity of Silver Nanoparticles: A Recent Review.* Stefania, M. et al. 2015, Current Topics in Medicinal Chemistry, Vol. 15, págs. 1596-1604.
4. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches.* Zhang, X.F. et al. 2016, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 17, págs. 1534-1558.
5. *Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review.* Haider, A. et al. 2015, Advances in Materials Science and engineering, Vol. 2015, págs. 1-16.
6. *Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples.* Laborda, F. et al. 2016, Analytica Chimica Acta, Vol. 904, págs. 10-32.
7. *Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles.* Liu, J.F. et al. 2012, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 33, págs. 95-106.
8. *Silver nanoparticle detection and characterization in silver colloidal products using screen printed electrodes.* Cepriá, G. et al. 2014, Analytical Methods, Vol. 6, págs. 3072-3078.
9. *Selectivity of silver nanoparticle sensors: Discrimination between silver nanoparticles and Ag⁺.* Cepriá, G. et al. 2016, Sensors and Actuators B, Vol. 230, págs. 25-30.
10. *Electrochemical sensing of heavy metal ions with inorganic, organic and bio-material.* Lin-Cui, J.W. et al. 2015, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 63, págs. 276-286.
11. *Improving the Rate of Silver Nanoparticle Adhesion to 'Sticky Electrodes': Stick and Strip Experiments at a DMSA-Modified Gold Electrode.* Compton, R.G. et al. 2014, Electroanalysis, Vol. 26, págs. 285-291.
12. *Sensors as tools for quantitation, nanotoxicity and nanomonitoring assessment of engineered nanomaterials.* Sadik, O.A. et al. 2009, Journal of Environmental Monitoring, Vol. 11, págs. 1782-1800.
13. *Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H₂O₂ biosensor based on poly(thionine).* Ru, Y. et al. 1999, Electrochimica Acta, Vol. 44, págs. 1585-1596.
14. *Electropolymerization of O-Phenylenediamine on Pt-Electrode from Aqueous Acidic Solution: Kinetic, Mechanism, Electrochemical Studies and Characterization of the Polymer Obtained.* Sayyah, S.M. et al. 2009, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 112, págs. 3695-3706.

15. *Sticky electrodes' for the detection of silver nanoparticles.* Tschulik, K. et al. 2013, Nanotechnology, Vol. 24, págs. 295502-295508.
16. *Covalent modification of glassy carbon electrode with cysteine for the determination of dopamine in the presence of ascorbic acid.* Zhang, L. et al. 2008, Vol. 161, págs. 191-200.
17. *Investigation of the electrochemical behavior of L-cysteine in acidic media.* Dourado, A.H.B. et al. 2016, Journal of electroanalytical chemistry, Vol. 765, págs. 87-91.
18. *Voltammetric determination of cysteine at a graphite electrode modified with gold nanoparticles.* Perevezentseva, D.O. et al. 2012, Journal of Solid State Electrochemistry, Vol. 16, págs. 2405-2410.
19. *A homogeneous redox catalytic process for the paired synthesis of L-cysteine and L-cysteic acid from L-cystine.* Babu, K.F. et al. 2011, Electrochimica Acta, Vol. 56, págs. 9797-9801.
20. *Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system.* Qiang, G. et al. 2003, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 19, págs. 277-282.
21. *Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system.* Qiang, G. et al. 2004, Talanta, Vol. 62, págs. 477-482.
22. *Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on a glassy carbon electrode modified with polythionine and gold nanoparticles.* Wang, Q.X. et al. 2012, Microchimica Acta, Vol. 176, págs. 279-285.
23. *Investigation of the electrochemical behavior of L-cysteine in acidic media.* André H.B: Dourado, Rodrigo Queiroz, Marcia L.A. Temperini et al. 2016, Journal of Electroanalytical Chemistry, págs. 87-91.

Abreviaturas empleadas en esta memoria

ΔE	Potencial de paso (barrido de potenciales)
ΔE_p	Incremento de potencial del pulso (barrido de potenciales DPV)
AdSV	Voltametría de redisolución por adsorción
Bare	Electrodo sin modificar
CV	Voltametría cíclica (<i>cyclic voltammetry</i>)
DPV	Voltametría diferencial de pulsos (<i>differential-pulse voltammetry</i>)
EAM-UV-Vis	Espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible
E_e	Potencial de electrólisis
E_f	Potencial final (barrido de potenciales)
E_i	Potencial inicial (barrido de potenciales)
ElPolym	Electropolimerización
E_p	Potencial de pico
ET	Electrodo de trabajo
GC	Carbón vítreo (<i>glassy-carbon</i>)
GC-bare	Electrodo de carbón vítreo sin modificar
GC-oPPD	Electrodo de carbón vítreo modificado con PTh
GC-PTh	Electrodo de carbón vítreo modificado con oPPD
i_p	Intensidad de pico
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
oPD	o-fenilen-diamina (monómero)
oPPD	Poli-o-fenilen-diamina (oligómero)
PTh	Poli-tionina (oligómero)
SV	Voltametría de redisolución (<i>stripping voltammetry</i>)
SW	Voltametría de onda cuadrada (<i>square-wave</i>)
t_e	Tiempo de electrólisis
TFG	Trabajo fin de grado
t_m	Tiempo de cada paso (barrido de potenciales DPV)
t_p	Tiempo de duración del pulso (barrido de potenciales DPV)
t_{ret}	Tiempo de retención
VnPi	Voltametría de nanopartículas inmovilizadas

Resumen técnico (información adicional)

L-Cisteina

Se ha comparado su inmovilización sobre el electrodo (limpio y pulido con alúmina) mediante depósito y secado (0,01 M. L-Cys, $t_{ads} \approx 10$ min.), y con formación electroquímica de enlaces covalentes con la superficie del electrodo (5 mM L-Cys en PBS 0,1 M., barrido cíclico de 0 a +1,5 V., 20 mV/s, 20 ciclos). En el segundo caso, las AgNPs dieron picos del orden de ($E_p \approx +0,21$ V.), mientras que la Ag^+ produce picos catódicos a un $E_p \approx +0,32$ V. Los extremos de potencial se ajustaron a los picos para evitar la fácil oxidación o reducción electroquímica sobre este electrodo modificado. La L-Cys se adsorbe fuertemente sobre el GC a través del grupo tiol e hidroxilo del carbonilo, dejando el grupo $-\text{NH}_2$ dirigido hacia el exterior, aunque se obtuvieron sensibilidades algo menores para la detección de las AgNPs y su cuantificación, en un procedimiento de modificación alternativo más sencillo.

Tionina (Th)

El monómero de Th produce en su electropolimerización (10^{-4} M. Th en KNO_3 0,1 M., $E_{cte} = -1,1$ V., $t_e = 5$ min., y barrido cíclico de -0,6 a +1,2 V., n=1 ciclo) oligómeros aromáticos con grupos $-\text{NH}$ (uno por molécula de monómero) y en su parte terminal $-\text{NH}_2$. Por primera vez, se ha comprobado su unión a AgNPs, que, una vez retenidas sobre el electrodo modificado, produjeron picos voltamétricos de redisolución anódica ($E_p \approx +0,25$ V., corrientes de pico $i_p \approx 0,45$ μA , tiempo de retención $t_{ret} = 10$ min., entre 5-25 ppm AgNPs).

Estudiando distintos tamaños de AgNPs (diámetro 40-60-80 nm.), se observó que a medida que aumenta el diámetro, disminuyen los valores de E_p (desde 0,3 a 0,23 V. aproximadamente), probablemente por la menor energía de desadsorción al aumentar el tamaño de las AgNPs.

Se observaron variaciones lineales de i_p con dispersiones de AgNPs entre 0,5 y 20 ppm (i_p desde 0,05 a 0,4 μA aproximadamente).

o-fenilen-diamina (oPD)

La electropolimerización a potencial constante del monómero oPD (0,1 M. en KNO_3 , +0,65 V.) proporciona un oligómero conjugado aromático con poca capacidad de retención de las AgNPs. Mediante un barrido cíclico (de -0,5 V. a +0,8 V., n=6 ciclos a 50 mV/s) se sintetiza una estructura menos conjugada con posición de los grupos funcionales $-\text{NH}_2$ en posición más externa, lo que produjo mayor capacidad de retención de las AgNPs.

Se obtuvieron variaciones lineales de señal, con tiempos de retención de 10,0 min., entre cantidades de 0,5 a 20 ppm de dispersión AgNPs ($i_p \approx 1$ μA y $E_p \approx +0,41$ V.).

Electrodos de trabajo GC-bare

En este caso, se empleó voltametría adsorptiva de NPs (en dispersión) inmovilizadas (depósito de 2 μL). Los picos de redisolución tienen un $E_p \approx +0,21$ V., y el límite de cuantificación es de 0,09 ppm. Si bien la sensibilidad AdSV es mayor que en el caso de retención electrostática y por afinidad, la selectividad viene dada únicamente por el potencial del pico de redisolución (E_p).

También se ensayaron otros ligandos (e.g. ácido cisteico, L-tiramina), si bien no produjeron buenos resultados, dado que no se obtuvieron suficientes grupos funcionales amino para la retención sensible de AgNPs a partir de suspensiones de AgNPs en concentraciones de pocos $\mu\text{g/mL}$.