



**Universidad
Zaragoza**



Síntesis y caracterización de nanoclusters de oro. Aplicación al desarrollo de sensores fluorescentes para la determinación de oxígeno

Trabajo Fin de Grado en Química

Javier Camacho Aguayo



Departamento de Química Analítica

Grupo de Biosensores Analíticos

Directora: Susana de Marcos Ruiz

A mis padres y mi hermano por estar siempre ahí apoyándome.

A mis amigos porque sin ellos este camino no hubiese sido igual.

A Susana y Alba, por enseñarme, aconsejarme y dar un giro de 180° a mi pesimismo.

*Al grupo de Biosensores Analíticos, en especial a Jesús, por
hacerme sentir como uno más.*

RESUMEN

El estudio de los nanomateriales ha supuesto una revolución en las investigaciones de diversos campos científicos. Dentro de la nanoescala, destacan por sus excepcionales propiedades fisicoquímicas los nanoclusters metálicos, entre ellos, los de oro. En este trabajo se han sintetizado Au-NCs haciendo uso de seroalbúmina bovina y ácido lipoico como ligandos estabilizadores. Estos presentan propiedades fluorescentes con longitudes de onda de excitación/emisión de 370/670 nm para los sintetizados con BSA y 400/700 nm para los de ácido lipoico. Una de las características de estos nanoclusters fluorescentes, es el tiempo de vida largo; que favorece la desactivación por especies como el oxígeno. Esta atenuación de la fluorescencia o quenching ha sido utilizada como principio de un método analítico diseñado con el fin de medir los niveles de oxígeno del medio.

Haciendo uso de las condiciones óptimas anteriormente descritas, se ha obtenido que las constantes de desactivación de Stern Volmer (K_q), toman los valores de 13253 M^{-1} y 6413 M^{-1} para los NCs sintetizados con BSA y ácido lipoico respectivamente. El objetivo del estudio es el diseño de un sistema de reconocimiento que, acoplado a un transductor, sea capaz de determinar la concentración de oxígeno en fase gas. Para ello, se han estudiado distintos soportes donde inmovilizar los Au-NCs, obteniéndose los mejores resultados con las láminas de sílica.

ABSTRACT

The study of nanomaterials has initiated a revolution in the research of different scientific fields. Within the nanoscale, the metallic nanoclusters highlight for their exceptional physicochemical properties, like the gold ones. In this project, Au-NCs have been synthesized using bovine serum albumin and lipoic acid as stabilizing ligands. Au-NCs have fluorescent properties with excitation/emission wavelengths of 370/670 nm (BSA) and 400/700 nm (lipoic acid). One of the most pointed characteristics of the fluorescent nanoclusters, is the long life time; that facilitate deactivation by species such as oxygen. This phenomenon, known as quenching, has been used as the principle of an analytical method designed to measure environmental oxygen levels.

Using the optimal conditions, quenching constants of Stern Volmer (K_q) where found to be 13253 M^{-1} and 6413 M^{-1} for the NCs synthesized with BSA and lipoic acid respectively. The proposal of the study is the design of a recognition system that could be coupled to a transducer. This sensor would be able to measure the concentration of oxygen in gas phase. For this purpose, different supports were studied in order to immobilize the Au-NCs, obtaining the best results with the silica film.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Nanoclusters de oro	1
2. Objetivos y planteamiento	3
3. Parte experimental	4
3.1 Reactivos	4
3.2 Materiales	5
3.3 Instrumentos y aparatos	5
3.4 Procedimiento experimental.....	5
3.4.1 Síntesis de nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina (BSA)	5
3.4.2 Síntesis de nanoclusters de oro con ácido lipoico	6
3.4.3 Preparación de las muestras para ICP-OES	7
3.4.4 Caracterización de nanoclusters de oro mediante fluorescencia.....	7
3.4.6 Estudio desactivación de la fluorescencia por oxígeno en soporte sólido	9
4. Resultados y discusión	13
4.1 Síntesis de nanoclusters	13
4.1.1 Síntesis nanoclusters de oro con BSA	13
4.1.2 Síntesis de nanoclusters de oro con ácido lipoico	13
4.2 Concentración de nanoclusters de oro.....	14
4.3 Caracterización de nanoclusters de oro por fluorescencia	14
4.3.1. Nanoclusters de oro con BSA	14
4.3.2. Nanoclusters de oro con ácido lipoico	15
4.4 Estudio desactivación de la fluorescencia por O_2 en disolución	16
4.4.1. Nanoclusters de oro con BSA	17
4.4.2. Nanoclusters de oro con ácido lipoico	18
4.5 Estudio desactivación de la fluorescencia por O_2 en soporte sólido	19
4.5.1 Soportes de celulosa	20
4.5.2 Soporte de silicona	20
4.5.3 Soportes de sílica.....	20
4.5.4 Soporte gel de poliacrilamida.....	22

5. Conclusiones.....	24
6. Bibliografía	25
Anexos	26
Anexo I: Caracterización NCs.....	26
Anexo II: Estudio desactivación de la fluorescencia por O_2 en disolución.	29
Anexo III: Estudio desactivación de la fluorescencia por O_2 en soporte sólido.....	33

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace años, el estudio y utilización de nanomateriales ha estado progresando de manera exponencial, actuando como punto de encuentro entre distintos campos de la investigación (Física, Química, Biología, Tecnología...). Los nuevos avances que se están llevando a cabo en este nano-mundo tienen repercusión en todos los ámbitos, incluyendo sectores tan variados como la medicina, el medio ambiente, el sector energético, la electrónica, la construcción o el sector textil¹.

Estos materiales presentan propiedades tan únicas y diferentes a la de estos mismos a nivel macroscópico gracias a su reducido tamaño. La elevada área superficial, la selectividad y la reactividad, además de las propiedades eléctricas y ópticas, son algunas de las características tan especiales que incluso se pueden ver alteradas al desplazarse en esta escala tan pequeña².

El prefijo nano hace referencia a un factor de 10^{-9} , sin embargo a diferencia de otras escalas mayores, es suficiente una pequeña variación en el tamaño, para provocar importantes cambios en las propiedades físico-químicas de estos materiales³. Es esta pequeña y a la vez gran diferencia, la que nos permite distinguir entre nanopartículas y nanoclústers, siendo estos últimos el centro del estudio.

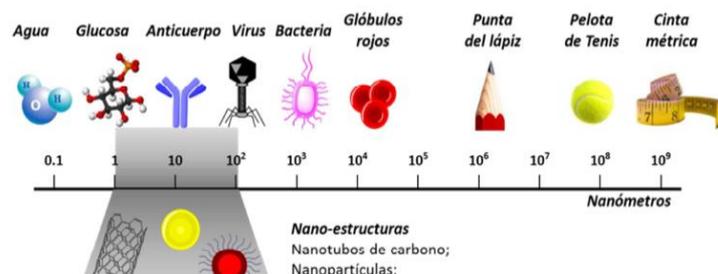


Figura 1: Escala métrica donde se muestra el rango que abarca la nanoescala y se contextualizan los tamaños en referencia a estructuras y/o moléculas ya conocidas.⁴

Los nanoclústers marcan el límite inferior de esta escala; consisten en pequeñas agrupaciones de átomos con una composición bien definida y unas pocas estructuras geométricas, que se comportan de manera más similar a las moléculas que a las nanopartículas. Para entender este mundo debemos abandonar la mecánica clásica, pues son los efectos cuánticos los responsables de las propiedades químicas, electrónicas y ópticas.³

Los nanomateriales de metales nobles⁵ como el oro, son unos de los más relevantes en el mundo de la nanociencia. Sus pequeñas dimensiones (< 3 nm) son comparables a la longitud de onda del nivel de Fermi⁶, y es su tamaño el que les confiere propiedades tan destacadas como la fluorescencia.

1.1 NANOCLUSTERS DE ORO

Los nanoclusters (NCs) de oro presentan fluorescencia en la zona del visible y del IR cercano, con un tiempo de vida largo, y con un importante desplazamiento de Stokes que permite trabajar cómodamente en un rango más amplio que el que nos ofrecen otras especies con propiedades ópticas similares.

Actualmente existen distintas estrategias para llevar a cabo la síntesis de estos nanoclusters, siendo el control del tamaño y la estructura, los pilares sobre los que se asienta. Entre los distintos métodos, destaca la reducción química, donde los parámetros controlados son la naturaleza y la concentración de los ligandos estabilizadores, la concentración de Au (III), el pH, la concentración del agente reductor, la temperatura y el tiempo.

Los compuestos con grupos tiol son utilizados normalmente como agentes estabilizadores debido a que pueden formar interacciones Au-S muy fuertes tanto con los átomos como con los iones oro⁷. Las proteínas son biomoléculas que suelen tener como sustituyentes de la cadena peptídica aminoácidos con grupos SH, y es por ello, que son empleados como ligandos; aunque también pueden ser utilizadas moléculas de tamaño más reducido.

Durante los últimos años, las aplicaciones con NCs de oro han ido ganando en relieve debido a sus excepcionales propiedades. Entre algunas de estas aplicaciones, podemos destacar la detección de cationes de metales pesados como el mercurio, cadmio o plomo que son responsables de enfermedades y muertes debido a su alta toxicidad por bioacumulación⁷. También han sido utilizados en el análisis de aniones como los cianuros (extremadamente tóxicos debido a su capacidad para inhibir enzimas participantes en la respiración celular), ofreciendo como ventaja frente a métodos de detección tradicional la elevada selectividad que presentan los NCs de oro hacia esta especie.⁸

La fluorescencia es un método muy sensible que permite trabajar con unos límites de detección de varios órdenes de magnitud menor que otras técnicas clásicas como la espectroscopía de absorción. Sin embargo, esta técnica debe hacer frente a un tipo de desactivación no radiante comúnmente llamada quenching; donde la especie desactivadora colisiona con el fluoróforo cuando se encuentra en el estado excitado, provocando la transferencia de energía de una especie a otra.

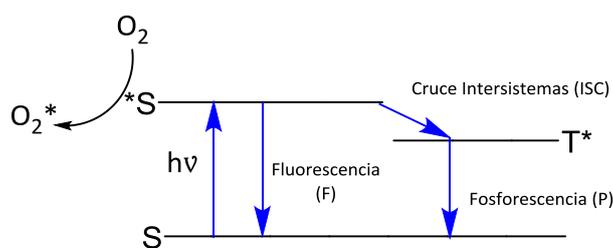


Figura 2: Diagrama de Jablonski representando la desactivación por oxígeno.

El oxígeno actúa como desactivador de fluorescencia o quencher, reduciendo la intensidad de la fluorescencia debido a sus propiedades paramagnéticas⁹, pudiendo utilizarse esta propiedad con fines analíticos. Además se ha comprobado en trabajos anteriores¹⁰ que estos NCs mantienen su fluorescencia a altas temperaturas, lo que amplía su campo de aplicación.

Si unimos los avances de los Au-NCs a los de química supramolecular y de biotecnología, nos encontramos ante un campo de con un potencial enorme donde las enzimas jugarán un papel muy importante.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Como se ha planteado previamente en la introducción, los nanoclusters están sufriendo un importante apogeo debido a sus excepcionales propiedades físico-químicas donde se puede destacar la fluorescencia como propiedad óptica. Los NCs se caracterizan entre otras cosas, por un tiempo de vida largo ya que son capaces de permanecer de manera prolongada (nanosegundos) en el estado excitado, antes de volver al fundamental emitiendo un fotón. Un tiempo de vida largo favorece una mayor exposición a la desactivación por moléculas como el oxígeno (quenchers). Y aunque este fenómeno puede dar origen a complicaciones para la determinación de compuestos que han sido excitados, en este estudio se hará uso de esta propiedad para medir la concentración del oxígeno.

El primer objetivo es estudiar la respuesta de los NCs al oxígeno basándose en las propiedades anteriormente comentadas. Para ello se desarrollan los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de nanoclusters utilizando seroalbúmina bovina (BSA) y ácido lipoico como agentes estabilizadores.
2. Caracterización de los nanoclusters en disolución mediante fluorescencia; pues es necesario encontrar los máximos de excitación y emisión.
3. Estudio de la capacidad desactivante del oxígeno con los NCs en disolución. Lo que conlleva averiguar la constante de Stern Volmer y su dependencia con la concentración de los Au-NCs.

El objetivo final del trabajo es la utilización de los Au-NCs como sensores ópticos de oxígeno, para lo cual se plantea:

4. Estudio de distintos soportes sólidos donde inmovilizar los nanoclusters de oro, y de su respuesta a la desactivación de la fluorescencia por oxígeno en fase gas.
5. Con el soporte que presente una mejor respuesta al oxígeno, implementarlo en un dispositivo comercial y estudiar sus características analíticas.

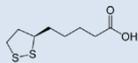
3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS

➤ Síntesis de Nanoclusters de oro con seroalbúmina bovina (BSA):

Nombre	Fórmula	Proveedor	REF	P (%)
Tetracloroaurato (III) de sodio dihidritado	$\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Stream Chemical	79-0500	99,8
Hidróxido de sodio (1M)	NaOH	Panreac	131687-1211	99
Seroalbúmina bovina (BSA)	----	Sigma	A7906-100G	----

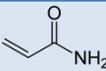
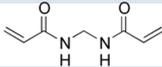
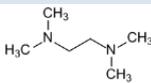
➤ Síntesis de Nanoclusters de oro con Ácido lipoico:

Nombre	Fórmula	Proveedor	REF	P (%)
Tetracloroaurato (III) de sodio dihidritado	$\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Stream Chemical	79-0500	99,8
Hidróxido de sodio (2M)	NaOH	Panreac	131687-1211	99
(±)- α -Ácido lipoico		Sigma	62320-5G-F	>98
Tetrahidroborato de sodio	NaBH_4	MERCK-Schuchardt	8.063.730.100	>96

➤ Preparación de la muestra para ICP-MS:

Nombre	Fórmula	Proveedor	REF	P (%)
Disolución agua regia (3HCl : HNO ₃)	HCl	Panreac	1.310.201.611	37
	HNO ₃	Panreac	1.332.551.611	65
Disolución piraña (3 H ₂ SO ₄ : H ₂ O ₂)	H ₂ SO ₄	Panreac	1.310.581.611	96
	H ₂ O ₂	Panreac	1.410.771.211	33

➤ Preparación de láminas de poliacrilamida (PAA) y de Silicona

Nombre	Fórmula	Proveedor	REF	P (%)
Acrilamida		Sigma	A-3553	>99
N,N'-Metilénbisacrilamida		Sigma	M-7279	>99,5
Persulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Sigma	A-3678	98
Tetrametiletilendiamina (TEMED)		Biorad	110-18-9	-
Triclorometano (Cloroformo)	CHCl_3	Panreac	361252	99

3.2 MATERIALES

- Centrifugal Filters Amicon Ultra – 4 ml (UltraCell - 10K Membrane), Millipore (UFC801024)
- Centrifugal Filters Amicon Ultra– 0,5 ml (UltraCell -10K Membrane), Millipore (UFC501024)
- Material desechable: cubetas de fluorescencia, viales, tubos falcon, puntas de micropipeta, tubos de centrifuga, probetas
- Material de vidrio: frascos de 5 mL, 50 mL y 100mL, vidrio de reloj, matraz de 25 mL
- Tubos eppendorf 0,5 mL; 1 mL y 2mL
- Kit de oxígeno; Visocolor ECO test Oxígeno2. Rango 1 - 10 mg/l O₂.Referencia 931088RM
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Micropipetas de volumen variable: Socorex (5-50 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL) y Pipetman Gilson(2-20 µL, 50-200 µL y 200-1000 µL).
- Pre-coated TLC-sheets Polygram Sill G, Macherey-Nagel
- Láminas de celulosa (Grado 1)-Espesor: 180 µm; Tamaño del poro: 11 µm, Whatman®,Sigma Aldrich
- Mezclas de celulosa al 3 y 10 % (W/V)

3.3 INSTRUMENTOS Y APARATOS

- Centrifuga eppendorf 5427 R (con control de temperatura)
- Baño Ultrasonidos P Selecta, Precistern
- Placa agitadora magnético-calefactora IKA C-MAG HS7
- Balanza analítica de precisión (<20mg). Sartorius CP225D.
- Balanza analítica de precisión. Precisa XT 120^a (máx. 210g, min. 0,01g)
- Incubadora Edmun Bühler GmbH, Johanna Otto
- Espectrofotometro Fluorescencia Photon Technology International (PTI) modelo TimeMasterTM TM-2/2003

3.4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.4.1 SÍNTESIS DE NANOCUSTERS DE ORO CON SEROALBÚMINA BOVINA (BSA)

En un bote de vidrio de 25 mL protegido de la luz, climatizado en un baño de agua a 37°C y con agitación magnética, se añaden 5 mL de una disolución de NaAuCl₄·2H₂O (10 mM) y otros 5 mL de una disolución de BSA (50 mg/mL). Tras 10 minutos de agitación donde se produce la interacción electrostática entre las dos especies, se observa un cambio de color de amarillo a amarillo oscuro. En este momento se adicionan 0,5 mL de NaOH (1M), alcanzándose un color marrón amarillento, que revela la formación de nanoclusters.¹¹

La mezcla se incuba a 37°C durante una noche, comprobando que durante las primeras horas el pH se mantiene en torno a 12 puesto que la albúmina muestra su poder reductor a pHs alcalinos¹².

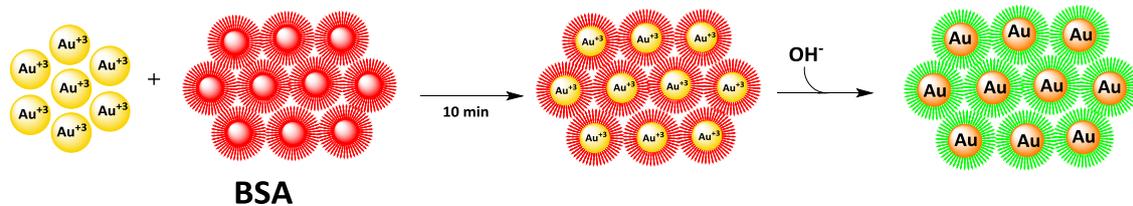


Figura 3: Representación esquemática de la síntesis de NCs-BSA

3.4.2 SÍNTESIS DE NANOCUSTERS DE ORO CON ÁCIDO LIPOICO (LIP)

En un frasco de 50 mL se añaden 20 mL de agua Mili-Q, 50 μ L de NaOH (2M) y 30 μ moles de ácido lipóico. La disolución resultante se sumerge en un baño de ultrasonidos alrededor de 15 minutos. Una vez se ha conseguido disolver el ácido lipóico, el bote se protege de la luz y se somete a agitación magnética. Posteriormente se añaden 200 μ L de una disolución de oro (50 mM) consiguiendo que la proporción Au:ligando sea 1:3 y que la disolución tome un color amarillo.

Tras 5 minutos a temperatura ambiente se añaden 400 μ L de NaBH_4 (50 mM), que actúa como agente reductor, y se deja reaccionar durante toda la noche con agitación constante obteniéndose una disolución de color marrón claro.¹³

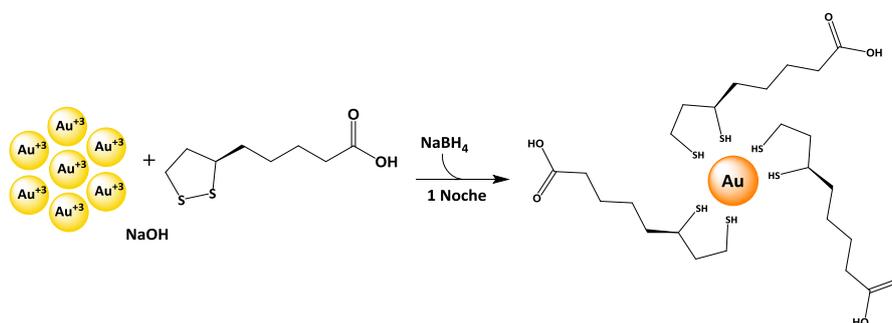


Figura 4: Representación esquemática de la síntesis de NCs-Lipóico

-Purificación Y Concentración-

El exceso de ácido lipóico y de tetrahidruoborato de sodio obliga a llevar a cabo una etapa de purificación seguida de una etapa de concentrado. Mediante ultrafiltración en centrífuga y haciendo uso de filtros de membrana con tamaño de poro de 10K, se lleva a cabo el siguiente protocolo:

Nº Ciclo	Fuerza de centrífuga	Tiempo
1º	1676 g	25 min
2º + 2 mL de H ₂ O Mili-Q	1676 g	20 min
3º + 1 mL de H ₂ O Mili-Q	1676 g	20 min

Se obtiene un volumen final de alrededor de 2 mL.

3.4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ICP-OES

La determinación de la cantidad de oro presente en las disoluciones de NCs es llevada a cabo utilizando la Espectroscopía de Emisión Atómica mediante Plasma de Acoplamiento Inductivo. Para realizar la medida de manera correcta, es necesario la eliminación de la materia orgánica que pueda interferir en el análisis; para ello, se trata la muestra siguiendo un protocolo de digestión con el fin de romper los enlaces de carbono (BSA y ácido lipoico) además de disolver el oro:

- 1.- Adicionar 200 μL de la muestra en un eppendorf de 2 mL.
- 2.- Añadir gota a gota 100 μL de la disolución piraña ($\text{H}_2\text{O}_2:3\text{H}_2\text{SO}_4$) y esperar 15 min (en la disolución de BSA se añade el doble).
- 3.- Adicionar 300 μL de agua regia (3 $\text{HCl}:\text{HNO}_3$) y esperar 2 horas a temperatura ambiente (en la disolución de BSA se añade el doble).
- 4.- Incubación a 60°C hasta observar que la materia orgánica ha desaparecido
- 5.- Traspaso cuantitativo a un matraz aforado y enrase con H_2O Mili-Q hasta 25 mL.

El doble de cantidad que se añade a la disolución preparada utilizando BSA como agente estabilizador responde a la gran cantidad de materia orgánica que ésta presenta.

3.4.4 CARACTERIZACIÓN DE NANOCUSTERS DE ORO MEDIANTE FLUORESCENCIA.

Se lleva a cabo los espectros de fluorescencia de los nanoclusters de oro en disolución utilizando el equipo PTI en modo Scan. El estudio, en el que se espera obtener las longitudes de onda de excitación/emisión óptimas para los siguientes ensayos, se realiza utilizando las siguientes condiciones:

NCs DE ORO CON BSA				
Espectro Excitación	Espectro Emisión	Rendijas	Velocidad de barrido	Diluciones
$\lambda_{\text{exc}} = 200\text{-}660\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 670\text{ nm}$	$\lambda_{\text{exc}} = 370\text{ nm y } 500\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 380\text{-}900\text{ nm}$	$r_{\text{ex}} = 5\text{ nm}$ $r_{\text{em}} = 5\text{ nm}$	1000 nm/min	Stock 1:2 1:5 1:10 1:15 1:20

NCs DE ORO CON ÁCIDO LIPOICO				
Espectro Excitación	Espectro Emisión	Rendijas	Velocidad de barrido	Diluciones
$\lambda_{\text{exc}} = 200\text{-}690\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 700\text{ nm}$	$\lambda_{\text{exc}} = 400\text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 410\text{-}900\text{ nm}$	$r_{\text{ex}} = 10\text{ nm}$ $r_{\text{em}} = 10\text{ nm}$	1000 nm/min	Stock 1:2 1:5 1:10 1:15 1:20

Además de estos dos estudios, también se lleva a cabo el análisis de las aguas del filtrado de los NCs preparados con ácido lipoico para comprobar si han sido sintetizados nanoclusters de menor tamaño que pudiesen haber sido perdidos en las aguas de filtrado (Anexo I.A).

También se procede al análisis de los blancos de las muestras (sin adición de oro) (Anexo I.B). Así mismo, los NCs preparados con BSA también se estudian a las longitudes de onda propias de las proteínas: 280 nm (Triptófano y Tirosina) con el fin de comprobar que las señales obtenidas se deben principalmente a los NCs y no al ligando. (Anexo I.C)

A partir de los espectros obtenidos, se eligen las diluciones adecuadas para llevar a cabo el estudio de la influencia del oxígeno en las determinaciones; es decir, se escogen la dilución a partir de la cual no se observe filtro interno, saturación de los picos...

3.4.5 ESTUDIO DESACTIVACIÓN DE LA FLUORESCENCIA POR OXÍGENO EN DISOLUCIÓN

El estudio se lleva a cabo utilizando simultáneamente el equipo PTI en modo Timebased y una sonda de oxígeno.

-Sonda de Oxígeno-

La sonda mide la concentración de oxígeno mediante fluorescencia. Para ello, excita una sal de rutenio (fluoróforo) con una longitud de onda de 450 nm a través de una fibra óptica bifurcada. El oxígeno, que actúa como quencher, desactiva el fluoróforo haciendo que la intensidad emitida sea de menor intensidad. Esta intensidad de luz llega al detector a través de la otra rama de la fibra. Las medidas que se realizan, se llevan a cabo a diferentes concentraciones de oxígeno para lo que se hace uso de una corriente de oxígeno, para conseguir la mayor saturación, y una de nitrógeno para conseguir la mayor desoxigenación posible. El proceso consiste:

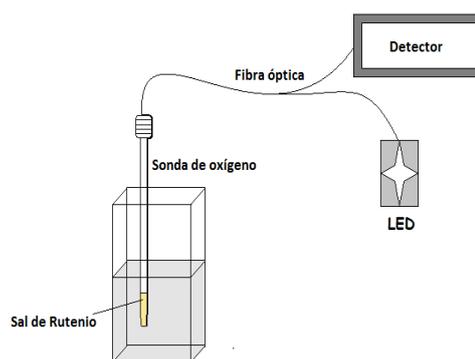


Figura 5: Representación esquemática de la sonda de oxígeno

1. Medir con la sonda la disolución inicial.
2. Retirar la sonda y medir con el equipo hasta la estabilización de la señal.
3. Introducir una corriente de nitrógeno y borbotear la disolución durante 3 min.
4. Introducir la sonda y medir.
5. Retirar la sonda y medir con el equipo (se tapa la cubeta para evitar la pérdida de N_2).
6. Repetir desde el paso 3 para asegurar que se ha desplazado todo el O_2 .
7. Repetir los mismos pasos desde 3 hasta 5 pero utilizando una corriente de oxígeno.

Las medidas tomadas utilizando el equipo PTI son llevadas a cabo en las condiciones de máxima fluorescencia:

Tipo de Au NCs	λ Excitación (nm)	λ Emisión (nm)	Rendijas (nm)	Diluciones		
NCs Au con BSA	370	670	10	1:10 1:15	1:20 1:25	1:30
NCs Au con A. Lipoico	400	700	5	1:2 1:3	1:5 1:10	1:15 1:20

Una vez obtenidos las intensidades de fluorescencia, se ajustan los resultados a la ecuación de Stern Volmer utilizando los valores de concentración de oxígeno hallados mediante el uso de un kit de oxígeno y la sonda.

-Test Kit de Oxígeno Disuelto en Agua-

Haciendo uso de este Kit se calcula la concentración de oxígeno disuelto que hay en el agua Mili-Q obteniéndose los siguientes valores:

- $[O_2]$ en condiciones normales: $2,2 \cdot 10^{-4}$ mol/L
- $[O_2]$ tras el paso de una corriente de nitrógeno (3 min): $1,2 \cdot 10^{-4}$ mol/L
- $[O_2]$ tras el paso de una corriente de oxígeno (3 min): no se puede obtener un valor haciendo uso de este método debido a que se encuentra fuera de la escala provista por el Kit (1-10 mg/L). Como consecuencia, es necesario obtener este valor haciendo uso de la sonda.

3.4.6 ESTUDIO DESACTIVACIÓN DE LA FLUORESCENCIA POR OXÍGENO EN SOPORTE SÓLIDO

Una vez se ha estudiado el comportamiento desactivante del oxígeno en disolución, se procede al estudio de éste una vez que los Au-NCs se encuentran inmovilizados sobre un sólido. Estos soportes además de ser capaces de poder alojar los NCs, deben permitir la difusión del oxígeno y el paso de luz a su través.

Para el estudio se hace uso de un sensor comercial de oxígeno (LuminOx™) modificado; donde la sal de Rutenio que actúa como fluoróforo es sustituida por el soporte tal y como se muestra en la *Figura 6.A*. El sensor consta de un LED de 420 nm cuyo haz emisor incide sobre el material fluoróforo provocando su excitación. La fluorescencia emitida atraviesa un cristal dicróico que filtra y desvía el haz hacia un fotodiodo adquiriéndose una señal en unidades de voltaje que es inversamente proporcional a la intensidad de fluorescencia.

El sistema está integrado en un dispositivo casero donde también se encuentra el sensor comercial previamente mencionado pero sin modificación alguna (este sensor solamente es capaz de medir la concentración de oxígeno de 0 al 25% V/V). Además también se coloca la sonda de oxígeno con el fin de monitorizar cuando se alcanzan las condiciones deseadas. (*Figura 6.B*).

La señal del sensor se recoge en un programa diseñado por el servicio de instrumentación electrónica de la Universidad de Zaragoza, que permite monitorizar en continuo la variación de la señal tanto del sensor comercial como del modificado con los NCs.

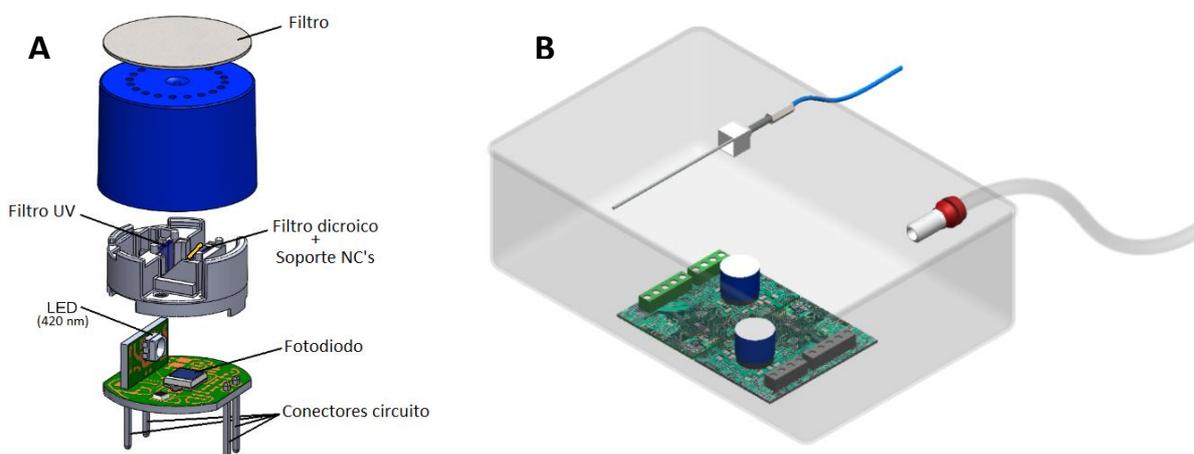


Figura 6: A) Sensor de oxígeno modificado; B) Dispositivo casero para la realización de las medidas de fluorescencia sobre un soporte sólido.

A continuación se detalla el protocolo de medida:

1. Una vez colocado el soporte de Au-NCs, se espera a que la señal se estabilice. De esta manera se obtiene el valor correspondiente a un 22% (V/V).
2. Se introduce una corriente de nitrógeno de manera que desplace todo el oxígeno de la cámara, y se espera a que la señal correspondiente al 0% (V/V) se estabilice. Para este paso se hace uso del sensor comercial y de la sonda como elementos de apoyo para garantizar que se ha alcanzado el equilibrio deseado.
3. Se abre la caja y se deja que la señal vuelva a los valores iniciales.
4. Se introduce una corriente de oxígeno hasta alcanzar el equilibrio correspondiente al 100% (V/V). En este ciclo sólo se puede utilizar como ayuda la sonda de oxígeno puesto que el sensor comercial no trabaja en estos rangos de concentración.

Para obtener rectas de calibrado con más puntos a parte de las condiciones extremas y la habitual, se hacen pasar pequeñas corrientes de oxígeno y se cierra el dispositivo herméticamente para conseguir que la concentración de oxígeno se mantenga constante. Con ayuda de la sonda de oxígeno se averigua qué porcentaje de oxígeno se está midiendo.

Los soportes utilizados para la inmovilización son:

3.4.6.1 Láminas de sílica

La inmovilización de los NCs de oro se lleva a cabo mediante inmersión del soporte sólido en la disolución: se introduce tres veces la lámina realizando una etapa de secado al aire entre cada

inmersión. De este modo se obtiene una distribución homogénea de los NCs en el soporte que luego es colocado en el sistema de detección.

Tanto para el estudio de los NCs de oro estabilizados con BSA como con ácido lipóico se preparan distintas concentraciones en las que sumergir la tira:

Tipo de NCs	Disoluciones Probadas			
NCs Au -BSA	Stock	1:2	1:4	
NCs Au -Lipoico	Stock	x 4	x 5	x 6

Como primer paso para la preparación de los soportes de Au-NCs (Lipoico), se lleva a cabo la concentración haciendo uso de filtros de ultracentrífuga de 0,5 mL con filtro de membrana de 10K hasta conseguir las concentraciones que aparecen en el cuadro anterior.

Una vez los soportes óptimos son encontrados se procede a estudiar la reproducibilidad del método. Así mismo se hallan más puntos de la recta de calibrado ayudándose de la sonda de oxígeno.

3.4.6.2 Celulosa

Se preparan distintos tipos de soporte utilizando la celulosa como adsorbente o como agente entrampador. En estos estudios se realizan las pruebas con Au-NCs de BSA debido a que ofrecen una mayor fluorescencia con menor concentración. El soporte es preparado de tres formas diferentes:

- Láminas de celulosa (Tamaño de poro: 11µm):
 - Inmersión: mismo protocolo que el descrito para la lámina de sílica.
 - Deposición de unas gotas sobre la superficie.
- Preparación: se mezcla la disolución de stock de los NCs sintetizados con BSA con la mezcla de celulosa al 3 y 10% (w/v) a partes iguales y se deja secar a 37°C.

3.4.6.3 Silicona

También se estudia la posibilidad de entrampar los NCs en láminas de silicona para lo que se lleva a cabo dos procedimientos diferentes:

- i) Como primer paso se disuelven 0,3 g de silicona en 5 mL de cloroformo. A continuación se toman 250 mL de la disolución y se mezclan con 250 mL de la disolución de Au-NCs preparados con BSA.
- ii) Se llevan 4 mL de Au-NCs hasta sequedad mediante evaporación y se mezclan con 5 mL de cloroformo donde posteriormente se añade 0,3 g de silicona.

3.4.6.4 Geles de poliacrilamida

El siguiente soporte se realiza preparando una lámina de poliacrilamida donde los NCs se encuentren atrapados. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

1. Mezclar 150 μg de acrilamida con 10 mg de bisacrilamida en 200 μL de agua.
2. Añadir 10 μL de una disolución de persulfato sódico al 4% (m/V).
3. Adicionar 400 μL de la disolución de stock de los NCs preparados con BSA.
4. Hacer pasar una corriente de nitrógeno durante 1 min con el fin de eliminar el oxígeno.
5. Añadir 4 μL de TEMED (iniciador de la reacción radicalaria).
6. Colocar sobre un molde y tapar con un vidrio de modo que no se formen burbujas dentro.
7. Dejar secar hasta que se obtenga una lámina resistente.
8. Tras obtener el gel con la consistencia deseada se guarda en un eppendorf con agua para su posterior uso.

Teniendo en cuenta los resultados que se expondrán en el siguiente bloque, se llevó a cabo un estudio en disolución acuosa siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 3.5.5 utilizando el equipo PTI.

Para ello, como primer paso se hallan los máximos de excitación y emisión en modo Scan y a continuación en modo Timebased se realiza el estudio de la fluorescencia en presencia de oxígeno como especie desactivadora.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

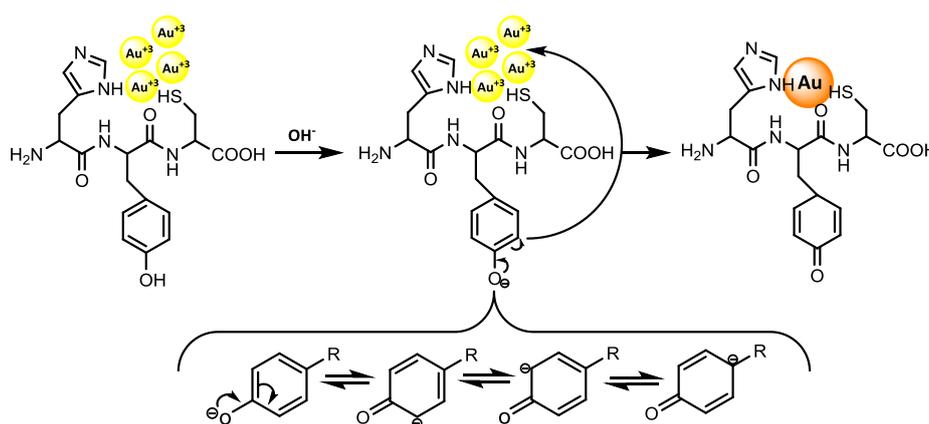
4.1 SÍNTESIS DE NANOCLUSTERS

La síntesis de los nanoclusters se lleva a cabo utilizando dos ligandos estabilizadores que como se comenta en la introducción presentan grupos tiol, quienes se caracterizan por una fuerte interacción Au-S.

4.1.1 SÍNTESIS NANOCLUSTERS DE ORO CON BSA

La seroalbúmina bovina está compuesta por una cadena peptídica de 607 aminoácidos entre los que destacan por su importancia en la síntesis: la cisteína, la histidina y la tirosina. Mientras que los dos primeros se encargan de la estabilización de los NCs, la tirosina es responsable de la reducción del oro¹⁴.

Como primer paso, se produce una interacción electrostática entre los grupos tiol de la cisteína y el grupo imidazol de la histidina con los iones oro. Cuando se añade el NaOH, alcanzándose un pH bastante alcalino, la tirosina es capaz de reducir al oro.



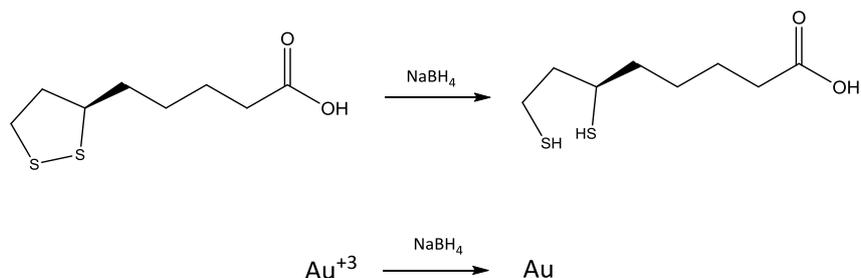
Esquema 1: Síntesis de NCs BSA (Simplificación de una cadena peptídica).

Inicialmente se produce la desprotonación del grupo OH⁻ consiguiendo un compuesto estable debido a la resonancia. Finalmente, el par de electrones son cedidos al oro reduciéndolo.

La síntesis se repite una segunda vez obteniéndose resultados idénticos y confirmándose la reproducibilidad del método.

4.1.2 SÍNTESIS DE NANOCLUSTERS DE ORO CON ÁCIDO LIPOICO

El otro ligando utilizado para la estabilización y formación de los NCs es el ácido lipóico. El agente reductor no solamente reduce el Au (III) a Au, sino también al ácido lipóico dando lugar al ácido dihidrolipóico, que presenta dos grupos tiol libres para interactuar fuertemente con el oro.



Esquema 2: Reducción del Ácido lipoico y del Au^{+3} por NaBH_4

Una vez se reduce el oro y el ácido lipoico, se produce la interacción entre las dos especies formando un complejo como se muestra en la *Figura 4* y con el que se da lugar a los NCs.

Debido al escaso producto que se obtiene, se realizan más síntesis siguiendo el mismo procedimiento; obteniéndose resultados idénticos que manifiestan la reproducibilidad del método.

4.2 CONCENTRACIÓN DE NANOCUSTERS DE ORO

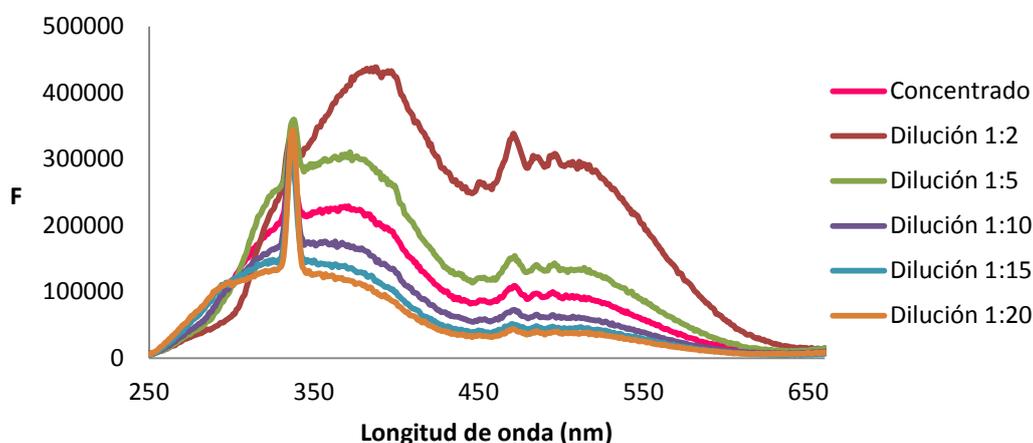
A partir de las muestras llevadas al ICP-OES se obtiene que la concentración de oro tras la síntesis y la posterior purificación es de:

- $497,2 \pm 0,9$ mg/L para los NCs preparados con BSA
- $403,4 \pm 13,2$ mg/L para los NCs preparados con ácido lipoico.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOCUSTERS DE ORO POR FLUORESCENCIA

Como primer paso para la caracterización, se estudian los espectros de excitación y fluorescencia correspondientes a los complejos formados por los nanocusters y los ligandos estabilizadores (BSA y ácido lipoico). De esta manera se obtienen cuáles son las longitudes de onda óptimas para estudios posteriores.

4.3.1. NANOCUSTERS DE ORO CON BSA



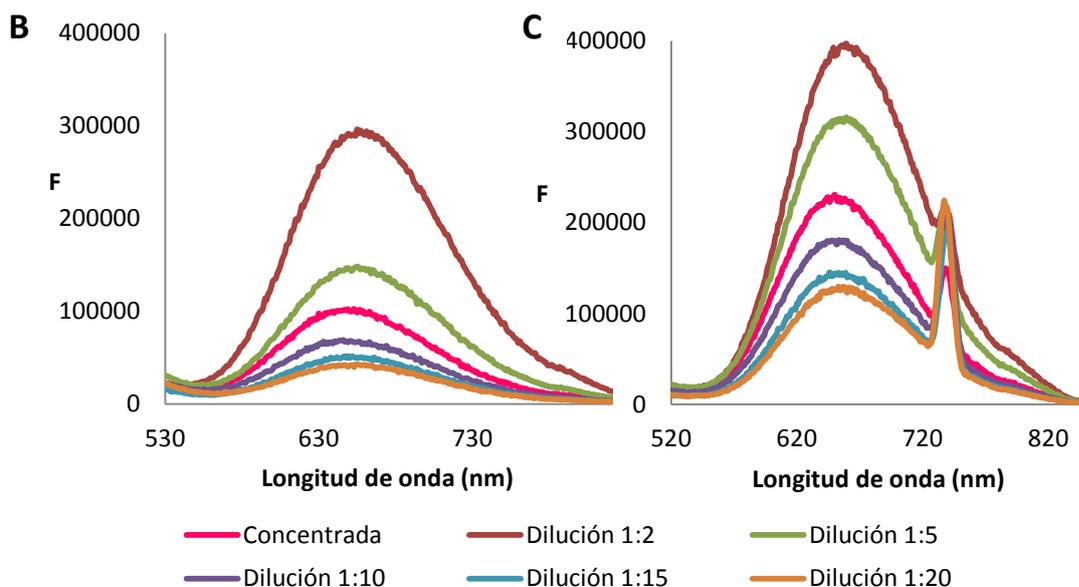


Figura 7: Espectros NCs Au estabilizados con BSA **A)** Espectro de excitación, $\lambda_{em}=670$ nm; **B)** Espectro de emisión, $\lambda_{ext}=500$ nm; **C)** Espectro de emisión, $\lambda_{ext}=370$ nm

Como se puede observar en los espectros, existe una discordancia entre las señales; puesto que la correspondiente a la disolución de stock (más concentrada), emite menor fluorescencia que otras más diluidas. Este fenómeno se conoce como filtro interno y se produce a altas concentraciones de la especie fluorófora (NCs en este caso). Los NCs que se encuentran en la zona previa a la de medida también absorben; provocando que la intensidad de la radiación que llegue a la zona central de la cubeta donde se mide sea menor y por lo tanto la fluorescencia sea más baja de lo esperado. Este fenómeno se consigue eliminar cuando la muestra es diluida. A partir de estos resultados, se escoge la dilución 1:10 como óptima puesto que las diluciones 1:2 y 1:5 presentan picos saturados; y en cuanto a la longitud de onda, 370 nm para la excitación y 670 nm la de emisión.

4.3.2. NANOCUSTERS DE ORO CON ÁCIDO LIPOICO

Como primer paso se lleva a cabo la comparación de los espectros antes y después de la purificación.

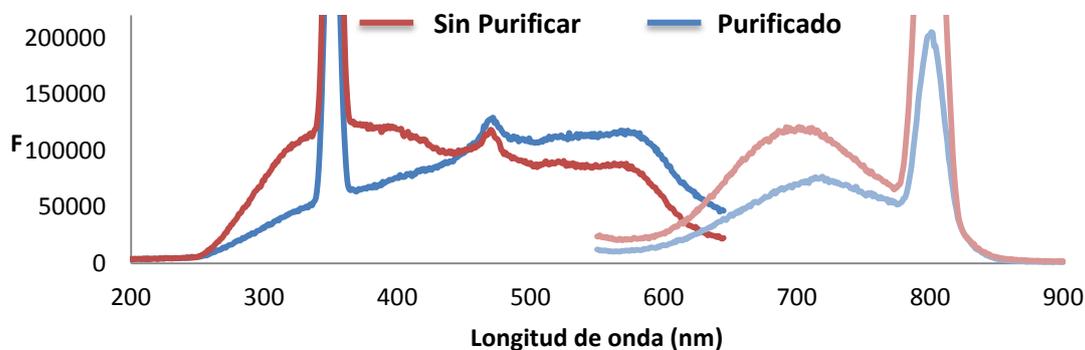


Figura 8. Espectro de fluorescencia de NCs estabilizados con Ácido Lipoico antes y después de la purificación: $\lambda_{ext}=400$ nm y $\lambda_{em}=700$ nm

A simple vista, cabe destacar cómo en la muestra de stock, la señal que aparece en el espectro de excitación a 310 nm, y que no se observa correctamente debido a la presencia del armónico (350 nm), desaparece con la purificación. Asimismo, se observa cómo a pesar de haber concentrado la muestra, la señal de fluorescencia en el purificado es menor que la muestra que no ha sufrido este tratamiento, lo que indica la presencia de filtro interno.

Con el fin de obtener la concentración adecuada para los siguientes estudios se analizan las muestras a diferentes concentraciones.

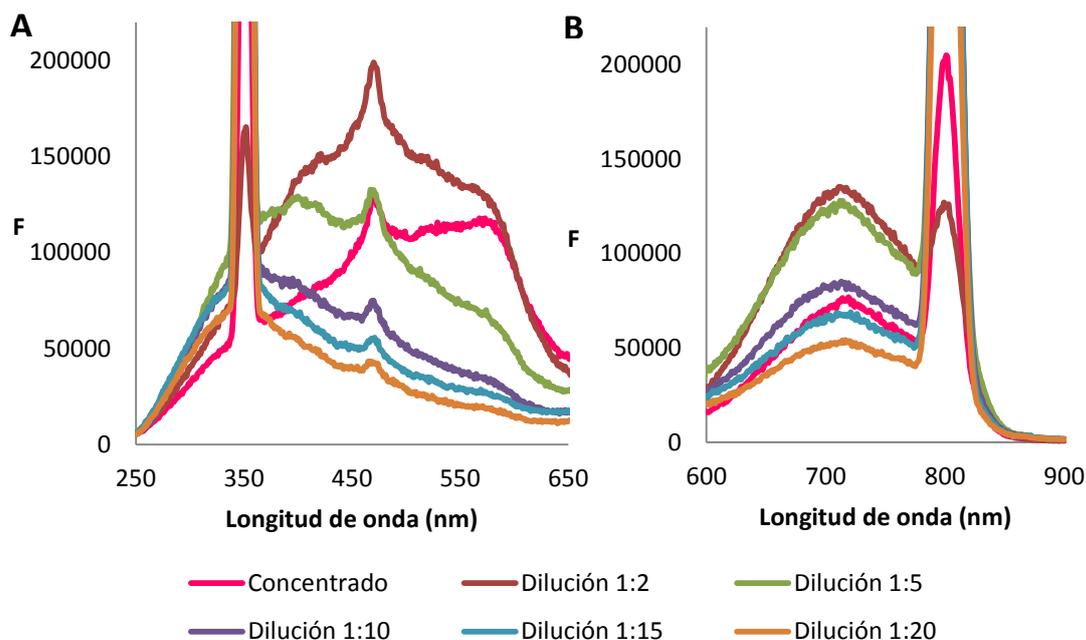
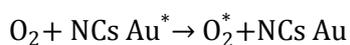


Figura 9: Espectros NCs Au estabilizados con A.Lipoico, **A)** Espectro de excitación, $\lambda_{em}=700$ nm; **B)** Espectro de emisión, $\lambda_{ext}=400$ nm

A partir del espectro de excitación, se observa como la señal a 310 nm aparece a medida que se diluye la muestra debido al filtro interno, al igual que se observa cómo desaparece la señal a 560 nm por lo que para estudios posteriores se hará uso de diluciones a partir de 1:10 pues ofrecen un estado óptimo entre las dos señales. En cuanto a las longitudes de onda se escogen 400 nm como longitud de onda de excitación y 700 nm de emisión.

4.4 ESTUDIO DESACTIVACIÓN DE LA FLUORESCENCIA POR O₂ EN DISOLUCIÓN

El fenómeno quenching hace referencia a la disminución de la fluorescencia por una especie (quencher) que se encuentra en el mismo medio que el fluoróforo, en nuestro caso, los NCs. El oxígeno que se encuentra disuelto en el agua actúa como quencher colisionando con los nanoclusters provocando que la intensidad de la fluorescencia disminuya.



La capacidad desactivadora del oxígeno viene dada a partir de la ecuación de Stern Volmer (1) donde K_q es propia de cada compuesto y del medio en el que se produce la desactivación.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q[O_2] \quad (1)$$

Como ya se ha comentado anteriormente, es necesario conocer la concentración de oxígeno disuelto por lo que, tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.5 se hace uso de un Kit y de la propia sonda de oxígeno para poder calcular la constante de desactivación (K_q).

4.4.1. NANOCUSTERS DE ORO CON BSA

A partir de los valores de fluorescencia obtenidos y de la concentración de oxígeno en agua se halla la constante de Stern Volmer representando: $1/F_0$ frente a $[O_2]$ (Anexo II.A).

Dilución	$F \cdot 10^5$	$[O_2] \cdot 10^{-4}$	$1/F \cdot 10^{-6}$	Pendiente	Ordenadas	F_0	$K (M^{-1})$
1:10	1,59	2,20	6,28	$2,08 \cdot 10^{-2}$	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$5,49 \cdot 10^5$	11428,6
	2,28	1,20	4,39				
	0,985	3,98	10,2				
1:15	1,05	2,20	9,51	$3,00 \cdot 10^{-2}$	$2,45 \cdot 10^{-6}$	$4,08 \cdot 10^5$	12244,9
	1,74	1,20	5,76				
	0,721	3,87	13,9				
1:25	0,592	2,20	16,9	$5,67 \cdot 10^{-2}$	$4,00 \cdot 10^{-6}$	$2,50 \cdot 10^5$	14175,0
	0,904	1,20	11,1				
	0,382	3,86	26,2				
1:30	0,746	2,20	13,4	$4,61 \cdot 10^{-2}$	$3,04 \cdot 10^{-6}$	$3,29 \cdot 10^5$	15164,5
	1,19	1,20	8,42				
	0,450	4,18	22,2				

A partir de los datos obtenidos, se representan los valores de K_q obtenidos frente a las distintas concentraciones.

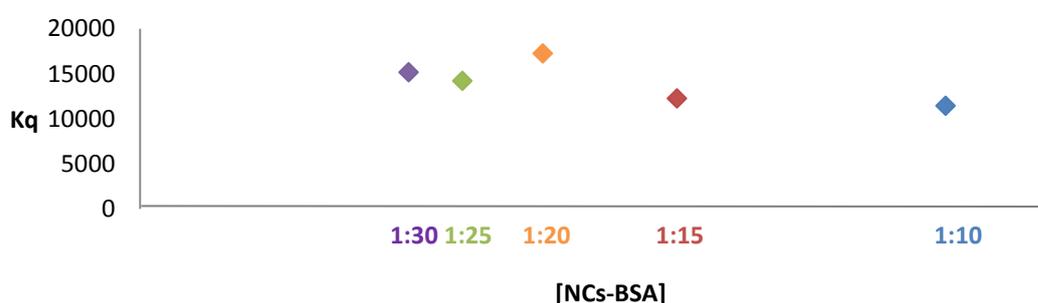


Figura 10: Representación gráfica de la constante de desactivación frente a las distintas concentraciones de NCs

El tratamiento estadístico (Anexo II.C) de estos resultados permite comprobar que no hay diferencia significativa entre el valor de K_q hallado para concentración de Au-NCs, lo que implica que la concentración de estos es independiente de la constante de desactivación.

4.4.2. NANOCCLUSERS DE ORO CON LIPOICO

Al igual que con los nanoclusters preparados con BSA, se representa la ecuación de Stern Volmer a partir de los datos obtenidos para averiguar K_q y se representa frente a las concentraciones (Anexo II.B).

Dilución	$F \cdot 10^5$	$[O_2] \cdot 10^{-4}$	$1/F \cdot 10^{-6}$	Pendiente	Ordenadas	F_0	$K_q (M^{-1})$
1:2	1,95	2,20	5,12	$1,47 \cdot 10^{-2}$	$1,92 \cdot 10^{-6}$	$5,21 \cdot 10^{-5}$	7656,25
	2,70	1,20	3,71				
	1,25	4,10	7,97				
1:3	1,99	2,20	5,02	$1,18 \cdot 10^{-2}$	$2,10 \cdot 10^{-6}$	$4,76 \cdot 10^{-5}$	5619,05
	3,01	1,20	3,32				
	1,54	3,82	6,51				
1:5	1,82	2,20	5,50	$1,41 \cdot 10^{-2}$	$2,11 \cdot 10^{-6}$	$4,74 \cdot 10^{-5}$	6682,46
	2,78	1,20	3,60				
	1,27	4,18	7,89				
1:10	1,95	2,20	5,12	$1,11 \cdot 10^{-2}$	$2,20 \cdot 10^{-6}$	$4,55 \cdot 10^{-5}$	5045,45
	3,20	1,20	3,12				
	1,53	3,98	6,55				
1:15	1,00	2,20	9,95	$2,55 \cdot 10^{-2}$	$3,61 \cdot 10^{-6}$	$2,77 \cdot 10^{-5}$	7063,71
	1,61	1,20	6,20				
	0,721	4,11	0,14				

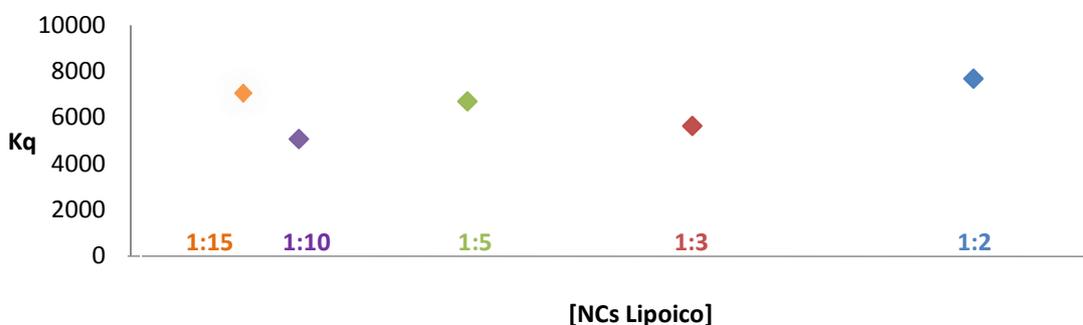


Figura 11: Representación gráfica de la constante de desactivación frente a las distintas concentraciones de NCs

El tratamiento estadístico (Anexo II.C) de estos resultados permite comprobar que no hay diferencia significativa entre el valor de K_q hallado para concentración de Au-NCs, lo que implica que la concentración es independiente de la constante de desactivación.

A partir de los resultados anteriores se calcula el valor de K_q para cada tipo de Au-NCs y que se muestran en la siguiente tabla:

Tipo de NCs	$K_q (M^{-1})$	DSR (%)
Au-NCs BSA	13253	13
Au-NCs Lipoico	6413	17

Hay que tener en cuenta que la ecuación de Stern Volmer es una aproximación de la ecuación real donde no se tienen en cuenta otros factores como la temperatura, la viscosidad, el tiempo de vida... por lo que es normal que los resultados presentan una incertidumbre bastante importante.

4.5 ESTUDIO DESACTIVACIÓN DE LA FLUORESCENCIA POR O₂ EN SOPORTE SÓLIDO

Una vez se ha comprobado en disolución la capacidad desactivante del oxígeno y la independencia de K_q para distintas concentraciones de NCs, el siguiente paso es la inmovilización de los Au-NCs en un soporte sólido manteniendo sus propiedades ópticas. Como se ha comentado en el apartado 3.4.6, se hace uso de la sonda para conocer las condiciones extremas (0 y 100%) así como la concentración de oxígeno en condiciones normales. El sensor comercial no es capaz de facilitar valores por encima del 25% (5V) por lo que ambos se complementan y ayudan a conocer la situación en la que se encuentra la medida. Se obtienen gráficas tal y como se muestra en la figura 12.

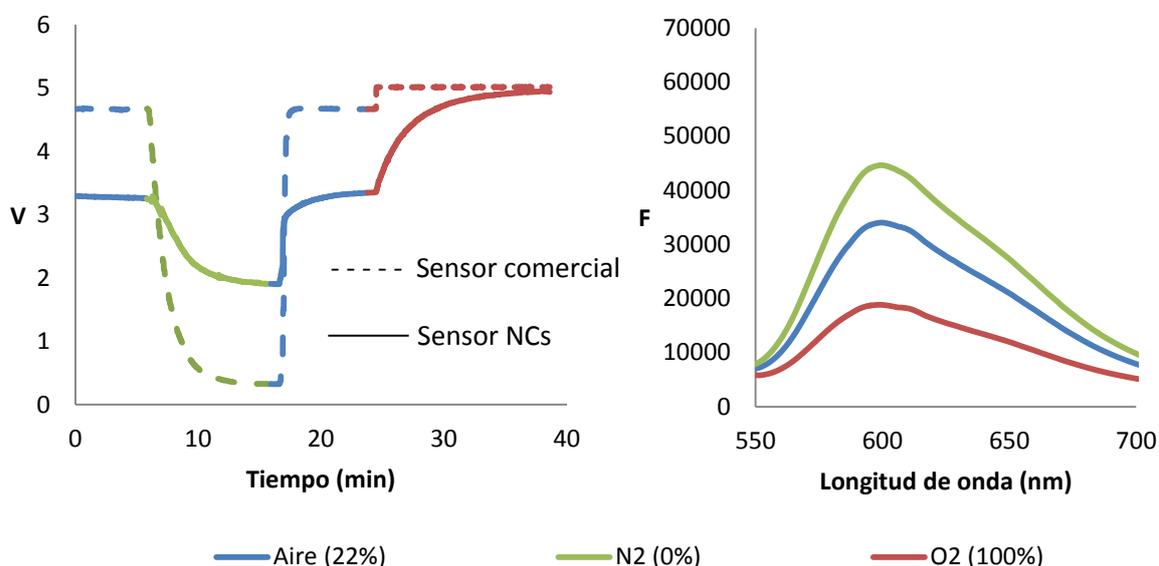


Figura 12: A) Gráfica V (mV) vs t (min) resultante por el programa del sensor que incluye el comercial y el modificado **B)** Respuesta de la sonda.

A la hora de estudiar la inmovilización de los nanoclusters en los diferentes soportes, se optimizan las condiciones para que se pueda medir la concentración de oxígeno en el intervalo de 0 a 100%. Para ello, hay que tener en cuenta que la fluorescencia emitida es menor que en disolución debido a que se no se trabaja en las condiciones óptimas y además, el medio atenúa la transmisión del haz emisor: si la concentración es muy alta la señal se puede saturar y si es muy baja, el programa no es capaz de registrarla.

La inmovilización ofrece como principal ventaja, el aumento de la estabilidad pues no es necesario protección frente a la luz y se pueden almacenar durante un tiempo prolongado.

4.5.2 SOPORTES DE CELULOSA

Como se muestra en la *Figura 13*, la señal varía al introducir una corriente de nitrógeno sin embargo no se observan cambios significativos cuando se introduce una corriente de oxígeno. Esto se debe a que la celulosa es un material impermeable a este último. Las moléculas de oxígeno presentan una baja polaridad, por lo que interactúan débilmente con los grupos polares OH de la celulosa provocando su repulsión.¹⁵

Con el fin de mitigar la impermeabilización de la celulosa al oxígeno se ha tratado de utilizar soportes con una menor proporción de celulosa. Para ello se han desarrollado tiras de papel utilizando celulosa del 3% o utilizando la celulosa del 10% en otras proporciones, sin embargo, las tiras de papel obtenidas, son frágiles y quebradizas impidiendo de esta manera su manipulación.

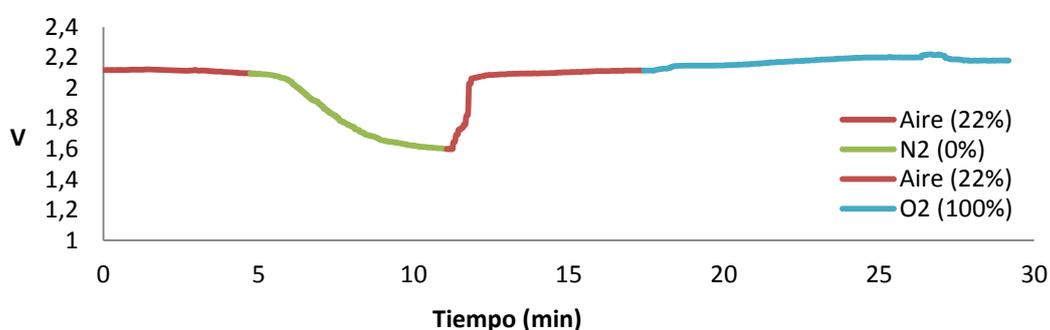


Figura 13: Gráfico V vs tiempo al variar las concentraciones de oxígeno en el dispositivo de medida

4.5.3 SOPORTE DE SILICONA

Los soportes preparados a base de silicona son puestos a prueba al igual que los demás sin obtenerse resultados útiles:

- El primer soporte detallado en el apartado 3.5.6.4 no ofrece una respuesta adecuada. La silicona impide que el agua donde están disueltos los NCs se evapore y queden atrapados en la silicona. De este modo se obtiene una lámina heterogénea donde los resultados obtenidos son incongruentes.
- El segundo soporte no pudo llevarse a cabo debido a la incapacidad para atrapar los NCs de oro en la lámina de silicona. Pues no se encontró ningún disolvente donde los NCs y la silicona fueran solubles.

4.5.1 SOPORTES DE SÍLICA

Tras la preparación de los soportes y la posterior medida de la fluorescencia para las diferentes concentraciones de oxígeno, se obtiene que las disoluciones que ofrecen mejores resultados

son las de stock y x5 (disolución stock concentrada 5 veces) de los Au-NCs preparados con BSA y ácido lipoico, respectivamente.

Para ambas disoluciones se prepararon tres soportes diferentes con el fin de comprobar la reproducibilidad del método:

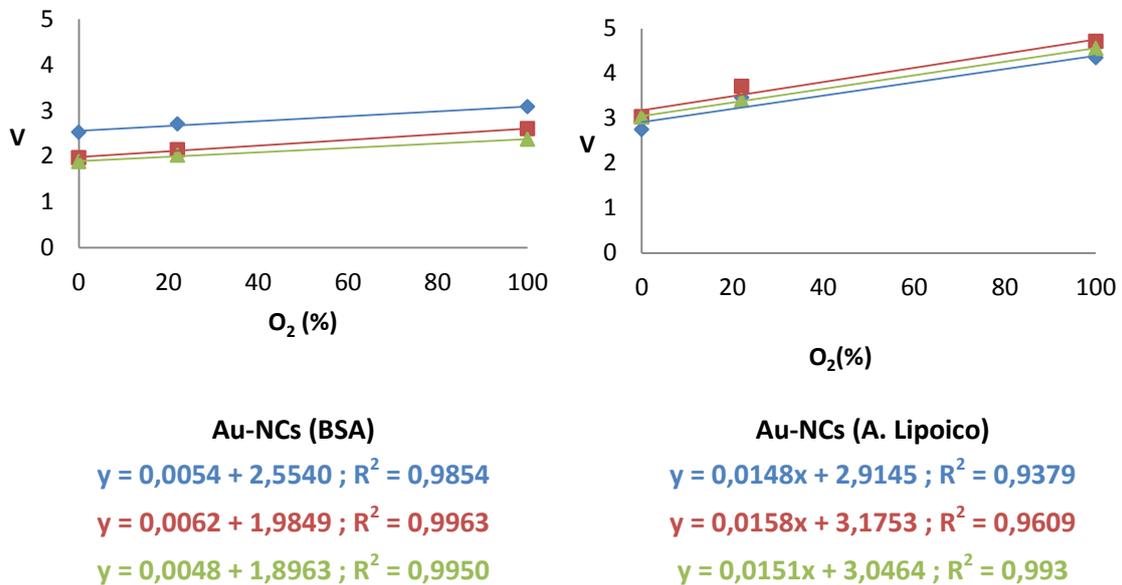


Figura 14: Representación V (señal) frente a porcentaje de O₂ en el ambiente con el fin de estudiar la reproducibilidad **A)** Au-NCs (BSA) **B)** Au-NCs (A. Lipoico)

Aplicando un análisis de la regresión (Anexo III), se comprueba que las pendientes no difieren significativamente y las diferencias se deben principalmente, a la incertidumbre del método, cuya principal fuente de es el modo manual de preparación de las láminas. Una vez se comprueban que los soportes fabricados son capaces de trabajar en las condiciones deseadas, se procede a estudiar de manera más detallada las rectas de regresión obteniéndose una buena linealidad.

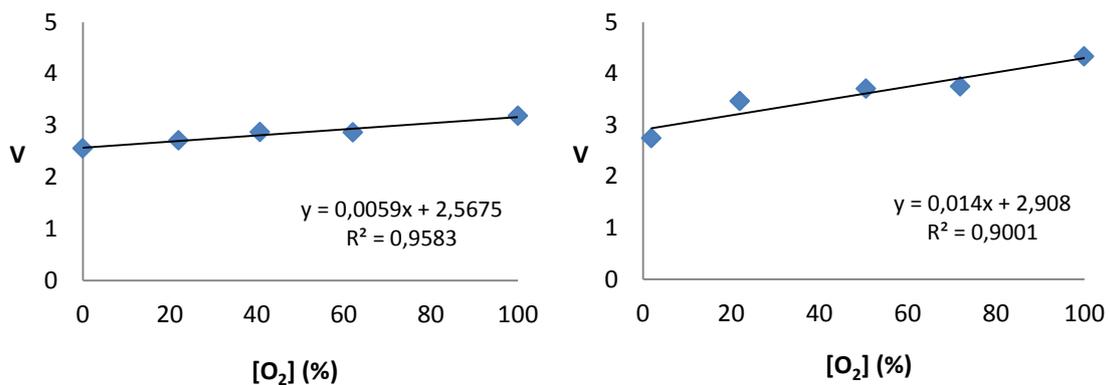


Figura 15: Rectas de calibrado V frente a O₂ (%) **A)** Au-NCs (BSA) **B)** Au-NCs (A. Lipoico)

Estos resultados permiten comprobar que el soporte de sílica es el más adecuado para la inmovilización de los Au-NCs y utilizarlos como base para el desarrollo de sensores de oxígeno comerciales que permitan medir niveles de oxígeno en fase gas en todo el rango de concentraciones (0-100%) y con un seguimiento continuo gracias al programa diseñado.

4.5.4 SOPORTE GEL DE POLIACRILAMIDA

Como se ha comentado previamente, los geles de poliacrilamida presentan unas propiedades físicas bastante buenas como para ser considerados unos soportes muy prometedores: son capaces de entrapar los NCs consiguiendo soportes homogéneos, son permeables al oxígeno, son fáciles de sintetizar y son capaces de dejar pasar la luz a su través mucho mejor que otros soportes.

Sin embargo, los resultados obtenidos con el gel de poliacrilamida no son satisfactorios debido a la inestabilidad de este tipo de geles cuando no se encuentran en disolución acuosa. Se trata de materiales muy porosos donde además de entraparse los NCs, también lo hacen moléculas de agua. Con el paso del tiempo y de las distintas corrientes de gases, los geles se secan provocando cambios en las propiedades ópticas de la lámina. Tal y como se muestra en la figura 16 los puntos hallados no se ajustan correctamente a una recta pero se observa una tendencia lineal.

Estas láminas son de uso único debido a que a medida que pasa el tiempo van modificándose las propiedades físicas que por consiguiente provocan cambios en la fluorescencia.

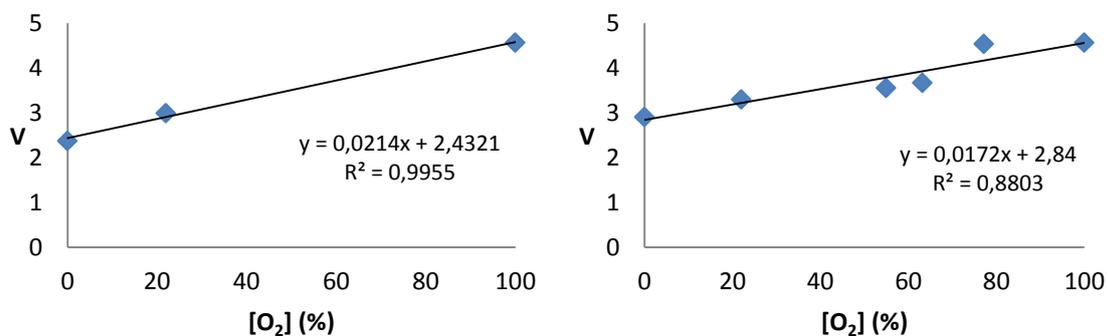


Figura 16: Representación V frente a porcentaje de oxígeno fase gas **A)** Estudio de calibración inicial **B)** Estudio detallado de la calibración

Debido a que el principal problema de este soporte es la inestabilidad en aire se procede a estudiar el soporte en disolución acuosa, ya que podría ser base de un sensor para la medida de oxígeno en disolución. Para ello, se inmoviliza entre un soporte de plástico y se asienta en una cubeta tal y como se observa en la *Figura 17*.

Como primer paso se realiza el espectro de fluorescencia para averiguar las longitudes de onda máximas con las que llevar a cabo el estudio de desactivación de la fluorescencia.



Figura 17: Condiciones de estudio de una lámina de poliacrilamida en disolución

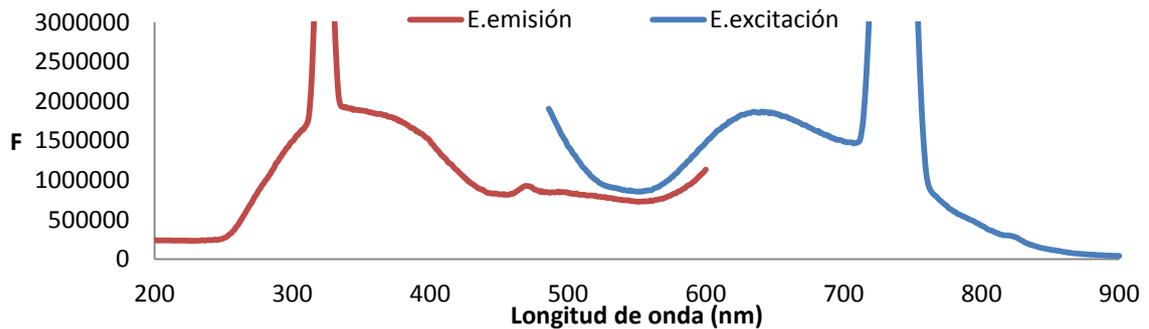


Figura 18. Espectro de fluorescencia de Au-NCs (BSA) entrampados en un gel de poliacrilamida: $\lambda_{ext}=370$ nm y $\lambda_{em}=640$ nm.

Una vez averiguado que el par excitación/emisión es 370/640 nm, se estudia si existe una posible linealidad entre la fluorescencia y la concentración de oxígeno tal y como se realiza en el apartado 3.3.

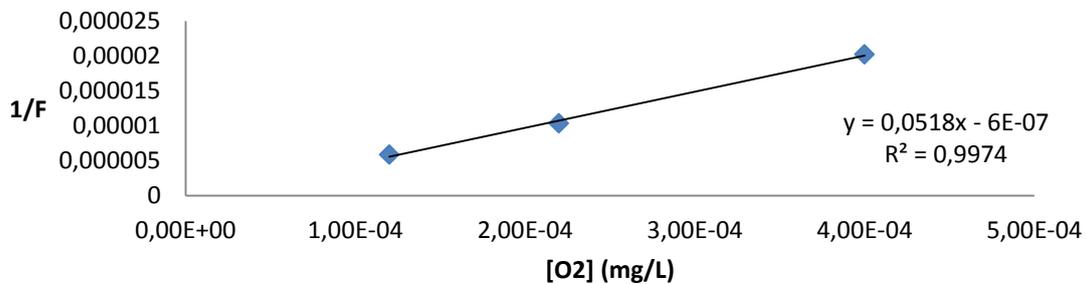


Figura 19: Representación de la ecuación de Stern Volmer a partir de los datos obtenidos.

La tendencia lineal que se observa, abre camino a nuevas investigaciones que pretendan aunar la utilización de los Au-NCs y las enzimas. Estos soportes permitirán realizar estudios de reacciones en medios acuosos donde el oxígeno participe como reactivo o producto y el analito, como sustrato de la enzima.

5. CONCLUSIONES

Durante el estudio se ha procedido a diseñar un sensor óptico de oxígeno utilizando como especie receptora NCs de oro. Las conclusiones que se pueden extraer del estudio son:

- Se han realizado la síntesis de Nanoclusters de oro de manera satisfactoria y reproducible:
 - Se ha llevado a cabo la caracterización de los NCs haciendo uso de la fluorescencia obteniéndose que las longitudes de onda óptimas para la excitación y emisión son 370 nm y 670 nm para los sintetizados con BSA, y 400 nm y 700 nm para los sintetizados con ácido lipoico.
 - Se ha observado como la amplitud de los espectros permite trabajar a distintas longitudes de onda sin perder demasiada sensibilidad, lo que permitirá en futuros estudios la utilización de los NCs junto a otras especies con propiedades ópticas y que trabajen en los mismos rangos.
 - Se ha comprobado que los Au-NCs sintetizados con BSA son más eficientes.
- Se ha concluido que la concentración de NCs es independiente de la constante de Stern Volmer y es posible trabajar en cualquier rango de concentraciones.
- Se han inmovilizado exitosamente los NCs en soportes de sílica y se ha determinado que aquellos basados en celulosa y silicona no son buenos como sensores por razones muy diferentes. Los primeros debido a que los grupos OH impiden la difusión de oxígeno a través de la estructura y los segundos por su incapacidad para entrapar los nanoclusters.
- Por último, se ha averiguado que los geles de poliacrilamida donde se han entrapado los NCs, si bien no son útiles como detectores de oxígeno en el aire debido a su poca estabilidad, sí que lo son en disolución acuosa. Este fenómeno abre camino a nuevas líneas de investigación donde los NCs se entrapen junto a enzimas en las que el oxígeno participe como reactivo o producto y se lleguen a utilizar como biosensores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) García Martínez, J.; Abellán, G.; Carrillo, A. I.; Linares, N. Nanomateriales Para Aplicaciones Avanzadas. *Actas 2006-2007* **2007**, 1–10.
- (2) Alonso-Núñez, G. Nanoquímica: Ingeniería de Nanomateriales. *Mundo Nano | Artículos* **2008**, 1 (1), 45–50.
- (3) Cobo, E. R. Síntesis , Propiedades y Funcionalización de Clústeres Metálicos, Universidad de Santiago de Compostela, 2012.
- (4) Alfonso, L. T. Síntesis y Evaluación de Nanomateriales Metálicos Fluorescentes Como Marcadores En El Desarrollo de Inmunoensayos. **2013**.
- (5) Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (3), 888–889.
- (6) Zheng, J.; Nicovich, P. R.; Dickson, R. M. Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58 (1), 409–431.
- (7) Chen, L. Y.; Wang, C. W.; Yuan, Z.; Chang, H. T. Fluorescent Gold Nanoclusters: Recent Advances in Sensing and Imaging. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (1), 216–229.
- (8) Liu, Y.; Ai, K.; Cheng, X.; Huo, L.; Lu, L. Gold-Nanocluster-Based Fluorescent Sensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Cyanide in Water. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20 (6), 951–956.
- (9) Douglas A. Skoog; F. James Holler; Stanley R. Crouch. *Principios de Análisis Instrumental, 6ta Edición* -.
- (10) Martín-Barreiro, A.; de Marcos, S.; Galbán, J. Gold Nanoclusters as a Quenchable Fluorescent Probe for Sensing Oxygen at High Temperatures. *Microchim. Acta* **2018**, 185 (3), 1–7.
- (11) Hu, L.; Han, S.; Parveen, S.; Yuan, Y.; Zhang, L.; Xu, G. Highly Sensitive Fluorescent Detection of Trypsin Based on BSA-Stabilized Gold Nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 32 (1), 297–299.
- (12) Govindaraju, S.; Ankireddy, S. R.; Viswanath, B.; Kim, J.; Yun, K. Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal Fluid. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–12.
- (13) Aldeek, F.; Muhammed, M. A. H.; Palui, G.; Zhan, N.; Mattoussi, H. Growth of Highly Fluorescent Polyethylene Glycol- and Zwitterion- Functionalized Gold Nanoclusters. *ACS Nano* **2013**, 7 (3), 2509–2521.
- (14) Shumyantseva, V.; Bulko, T.; Kuzikov, A.; Masamrekh, R.; Archakov, A. Analysis of L-Tyrosine Based on Electrocatalytic Oxidative Reactions via Screen-Printed Electrodes Modified with Multi-Walled Carbon Nanotubes and Nanosized Titanium Oxide (TiO₂). *Amino Acids* **2018**, No. 0123456789, 1–7.
- (15) Peresin, M. S.; Kammiovirta, K.; Heikkinen, H.; Johansson, L. S.; Vartiainen, J.; Setälä, H.; Österberg, M.; Tammelin, T. Understanding the Mechanisms of Oxygen Diffusion through Surface Functionalized Nanocellulose Films. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 174, 309–317.