



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de un nanosensor para la detección de tiramina en envases de alimentos (envases inteligentes).

Development of nanosensors for tyramine detection in food packages (smart-food packaging).

Autor

Mario Domínguez García

Director

Javier Galbán Bernal

Este trabajo ha sido realizado con cargo del proyecto CTQ2016-76864R (MINECO) y las ayudas a grupos de investigación DGA-FEDER (E25\_17R).

## **Resumen**

Este trabajo es parte de una investigación que pretende desarrollar un nanosensor basado en Au(III) para implementar en envases de alimentos que permita la determinación de tiramina. Esta determinación se llevará a cabo por la formación de nanopartículas de oro con una fuerte coloración morada como resultado de una reacción entre Au(III) y tiramina.

El sistema que se quiere desarrollar tiene su fundamento en la inmovilización de Au(III) en plásticos por medio de tectómeros. Los tectómeros son oligoglicinas capaces de fijar moléculas con las cuales hayan interactuado previamente en superficies de diferentes materiales. A lo largo del trabajo se realizan pruebas con diferentes concentraciones de oro y diferentes tectómeros para evaluar la inmovilización del Au(III) en láminas de poli(ácido láctico) (PLA) y se obtiene que la fijación del oro es mayor cuanto más tiempo pasa desde la preparación de la lámina.

Por otra parte, se realiza el estudio y optimización de un método para cuantificar Au(III) a diferentes valores de pH. Este método se basa en la formación del complejo  $\text{AuBr}_4^-$  y su posterior determinación por absorción molecular. Se construyen rectas de calibrado a varios pHs y se comparan estadísticamente mediante tests de significación. Estas rectas de calibrado sirven para cuantificar el oro que se desprende de las láminas tras ser éstas lavadas en agua y evaluar de este modo la fijación del oro a su superficie.

Por último, se lleva a cabo la reacción entre Au(III) y tiramina sumergiendo láminas de PLA con oro inmovilizado en disoluciones de diferentes concentraciones de tiramina, con la finalidad de elaborar una calibración utilizando las coordenadas RGB de las nanopartículas de oro obtenidas en la reacción. Los resultados de esta calibración son prometedores y servirán como base para estudios futuros más detallados.

## **Abstract**

This project is part of research that aims to develop an Au(III)-based nanosensor to be implemented in food packaging that allows tyramine determination. This determination will be made by the formation of gold nanoparticles with a strong purple coloration as a result of a reaction between Au(III) and tyramine.

The system to be developed is based on the immobilization of Au(III) in plastics with tectomers. Tectomers are oligoglycines capable of adhering molecules with which they have previously interacted on surfaces of different materials. Throughout the work, tests are carried out with different concentrations of gold and different tectomers to evaluate the immobilization of Au(III) in PLA sheets and it is obtained that the adherence of gold is greater the longer it takes since the preparation of the sheet.

On the other hand, the study and optimization of a method to quantify Au(III) at different pH values is performed. This method is based on the formation of the  $\text{AuBr}_4^-$  complex and its next determination by molecular absorption. Calibration lines are constructed at various pHs and statistically compared using significance tests. These calibration lines serve to quantify the gold that comes from the sheets after being washed in water. In that way, the adhesion of gold to the surface of the sheet is evaluated.

Finally, the reaction between Au(III) and tyramine is carried out by submerging PLA sheets with immobilized gold in solutions with different tyramine concentrations, in order to develop a calibration using the RGB coordinates of the gold nanoparticles obtained in the reaction. The results of this calibration are promising and will serve as the basis for more detailed future studies.

# Índice

1.-Introducción.....	1
1.1.-Aminas biógenas .....	1
1.2.-Determinación de aminas biógenas .....	2
1.3.-Reacción de Au(III) con tiramina. Formación de nanopartículas de oro .....	2
1.4.-Utilización de tectómeros como plataforma para la fabricación de nanosensores .....	3
2.-Objetivos y planteamiento.....	4
3.-Parte experimental .....	5
3.1.- Reactivos y disoluciones .....	5
3.1.1.- Reactivos y disoluciones generales.....	5
3.1.2.- Disoluciones de oro.....	6
3.1.3.- Disoluciones de tiramina.....	6
3.1.4.- Disoluciones de tectómero .....	6
3.2.- Instrumentación y material.....	6
3.2.1.- Instrumentos.....	6
3.2.2.- Material y aparatos.....	6
3.3.- Procedimiento experimental .....	7
3.3.1.-Método de cuantificación de oro a partir de la formación de un complejo con bromuros.....	7
3.3.2.-Inmovilización del oro en láminas de PLA.....	7
4.-Resultados.....	8
4.1.-Método de cuantificación de oro a partir de la formación de un complejo con bromuros .....	8
4.1.1.-Reacción entre Au(III) y bromuros.....	8
4.1.2.-Estudio analítico del método .....	8
4.1.3.-Efecto de la adición de disoluciones de tectómero 2T y 4T sobre una disolución de Au(III) con bromuros .....	12
4.1.4.-Adición de disoluciones de tectómero 2T y 4T sobre una disolución de Au(III) sin bromuros.....	13
4.2.-Inmovilización del oro en láminas de PLA.....	15
4.2.1.-Estudio de la inmovilización del oro en las láminas de PLA.....	15
4.2.2.-Variación en la cantidad de oro que se desprende de las láminas según el envejecimiento de éstas.....	17
4.2.3.-Variabilidad de las medidas de absorbancia con la concentración de anión bromuro .....	18
4.2.4.-Variación de las medidas de absorbancia con el tiempo.....	18

4.2.5.-Cuantificación del oro que se desprende de las láminas de PLA por absorción molecular.....	20
4.2.6.-Comparación de los resultados obtenidos por absorción molecular con un método de referencia .....	21
4.3.-Determinación de tiramina por reacción con Au(III) .....	22
5.-Conclusiones .....	24
6.-Bibliografía .....	25

# 1.-Introducción

## 1.1.-Aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados básicos formados principalmente por la descarboxilación de aminoácidos o por la aminación y transaminación de aldehídos y cetonas. Se generan durante el transcurso de metabolismos microbianos, vegetales y animales. Son fuentes de nitrógeno y precursores para la síntesis de hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos y proteínas. También pueden influir en diferentes procesos del organismo como la regulación de la temperatura corporal, la ingesta de nutrientes y el aumento o disminución de la presión arterial<sup>1</sup>.

Estos compuestos pueden formarse en alimentos gracias a la acción de organismos microbianos que producen la descarboxilación de aminoácidos presentes en los mismos, como puede verse en la reacción mostrada en la Figura 1.



Figura 1: Reacción de descarboxilación de un aminoácido libre por medio de una enzima descarboxilasa.

Las aminas biógenas que aparecen con mayor frecuencia en alimentos son las que aparecen en la Figura 2.

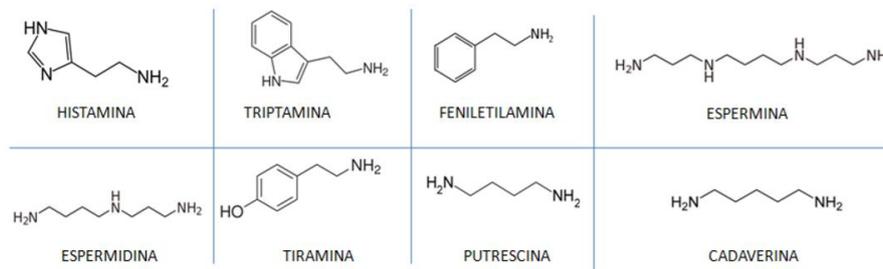


Figura 2: Estructura química de las aminas biógenas presentes en alimentos.

Estos compuestos cumplen una función biológica importante, sin embargo, su ingesta en grandes concentraciones puede dar lugar a episodios de toxicidad en el individuo que los consume, debido a que no pueden ser metabolizados en su totalidad por las enzimas monoamino oxidasa y diamino oxidasa (enzimas encargadas del metabolismo de aminas biógenas) en las concentraciones en las que se encuentran en el organismo. Podemos encontrar altas concentraciones de estos compuestos en alimentos como queso, vino o pescados<sup>2</sup>.

La mayor parte de las intoxicaciones alimentarias por aminas biógenas están relacionadas con la histamina y la tiramina.

## 1.2.-Determinación de aminas biógenas

Existen una gran cantidad de métodos para la determinación de aminas biógenas, aunque los más utilizados para su separación y cuantificación se basan en cromatografías, generalmente en HPLC de fase reversa. Si el detector acoplado a la columna es un detector de fluorescencia o UV, se requiere realizar una etapa de derivatización. Para llevar a cabo la derivatización, el reactivo más utilizado es el cloruro de dansilo. Si se utiliza un detector masas, no se necesita realizar la etapa de derivatización.

Enzimas como la monoamino oxidasa o la tiramina oxidasa han hecho posible el desarrollo de biosensores que permiten la detección rápida y económica de aminas biógenas, basándose en la reacción de oxidación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  obtenido de la reacción de oxidación de la amina biógena a un aldehído en presencia de agua y oxígeno<sup>1</sup>.

## 1.3.-Reacción de Au(III) con tiramina. Formación de nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) son un área de rápido crecimiento de la química debido a la versatilidad química de la superficie AuNP y la relación entre su tamaño y propiedades ópticas<sup>3</sup>.

Los AuNP se han sintetizado utilizando una gran variedad de métodos, aunque el más extendido de todos ellos es la reducción de  $\text{HAuCl}_4$  utilizando citrato de sodio como agente reductor. No obstante, se ha demostrado recientemente que se pueden utilizar ciertas aminas como agentes reductores para la formación de AuNP<sup>4</sup>.

La tiramina es capaz de reaccionar con Au(III) en presencia de la enzima tiramina oxidasa (TAO) para dar lugar a AuNP (Figura 3).

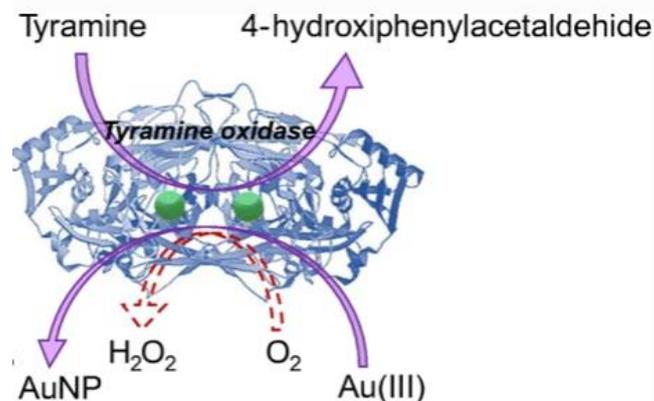


Figura 3: Reacción de formación de nanopartículas de oro a partir de Au(III) y tiramina.

El resultado de la reacción, las AuNPs, tienen una fuerte coloración morada y pueden ser determinadas por espectroscopía UV-vis<sup>5</sup>, por lo que podrían ser utilizadas como nanosensores para la detección de tiramina.

#### 1.4.-Utilización de tectómeros como plataforma para la fabricación de nanosensores

El autoensamblaje de moléculas pequeñas sobre una superficie sólida es una forma atractiva de fabricar materiales avanzados y nanodispositivos.

Las oligoglicinas, que son oligómeros formados por aminoácidos de glicina actuando como unidad monomérica, son capaces de formar dos tipos de estructuras: poliglicina I y poliglicina II. En la poliglicina I, las cadenas peptídicas de oligoglicina forman una  $\beta$ -estructura mientras que en la poliglicina II forman una estructura única.

En la estructura de la poliglicina II, las cadenas peptídicas paralelas están dispuestas como tres hélices que forman una red de enlaces de hidrógeno, en la cual todos los grupos CO y NH están involucrados. Este empaquetamiento es rígido y, por lo tanto, especialmente atractivo para el diseño de monocapas planas. La poliglicina II canónica está formada por un polímero de cadena larga de glicinas en una fase sólida.

La poliglicina II es capaz de generar monocapas autoensambladas rígidas gracias a los numerosos enlaces de hidrógeno que se forman entre sus cadenas. Esta alta densidad de enlaces de hidrógeno aporta una gran estabilidad a la estructura generada de 2D<sup>6</sup>.

La propiedad que posee la poliglicina II de formar monocapas en 2D es intrínseca, lo que quiere decir que generalmente no depende de la plantilla sobre la cual se construya la monocapa, por lo que la cantidad de materiales sobre los que se puede formar es amplia<sup>7</sup>.

Se ha demostrado que las oligoglicinas cortas de  $n=7$  son capaces de imitar la estructura de la poliglicina II si las cadenas se organizan en las formas que aparecen representadas en la Figura 4. Estos péptidos forman conjuntos supramoleculares en 2D en forma de placas (en lo sucesivo denominados tectómeros), que han demostrado ser estables no solo en fase sólida sino también en disoluciones acuosas<sup>6</sup>.

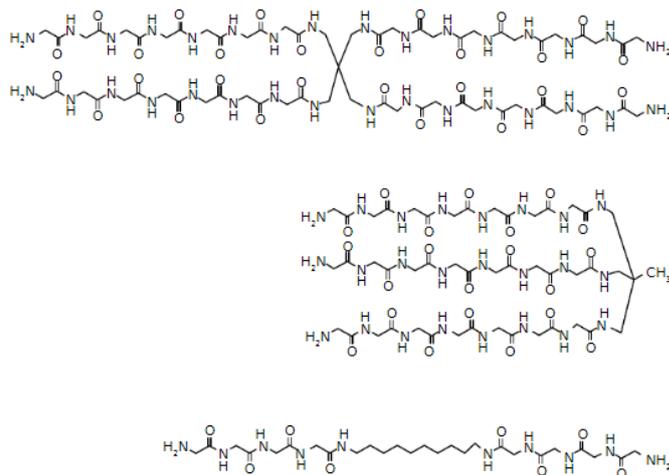
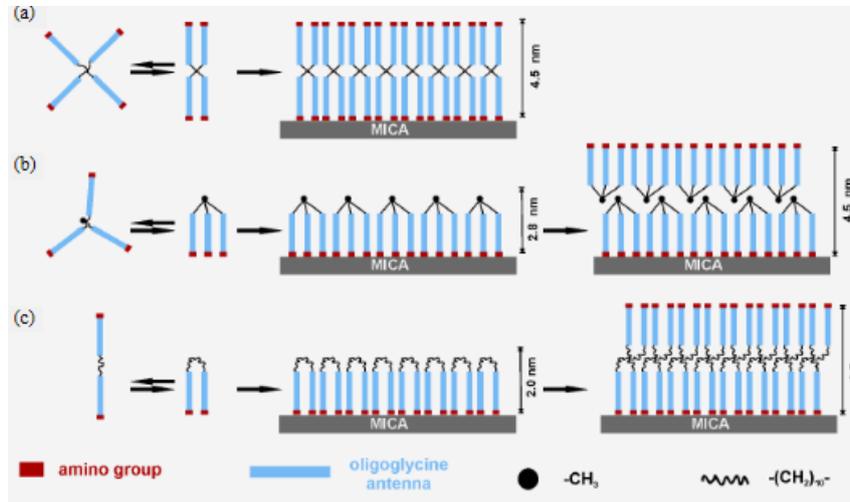


Figura 4: Estructura de oligoglicinas bi-, tri- y tetraantenarias.<sup>7</sup>

Los tectómeros son materiales atractivos para las nanotecnologías, ya que pueden servir como plataforma para la fabricación de nanodispositivos. Éstos son capaces de formar capas cristalinas en 2D en diferentes superficies, permitiendo retener otras moléculas que hayan interactuado previamente con el tectómero en dichas superficies. Los tectómeros tetraantennarios (tectómero

4-tailed, o tectómero 4T) forman una monocapa, mientras que los tri y biantenarios (tectómeros 3T y 2T, respectivamente) pueden formar tanto una monocapa como una bicapa, ya que tienen una zona hidrófoba en la región central por la cual se puede unir otra molécula de tectómero en sentido opuesto a la primera. No obstante, la adherencia entre estas dos capas (por la zona hidrófoba) es baja<sup>7</sup>.



**Figura 5:** Asociación de oligoglicinas sobre una superficie de mica. El tectómero 4T forma monocapas mientras que los tectómeros 2T y 3T pueden formar tanto monocapas como bicapas unidas por la parte hidrófoba.<sup>7</sup>

Cuando la estructura en 2D formada por el tectómero tiene lugar en disolución acuosa, la influencia del pH es importante, ya que en disolución ácida (pH 3,0), las antenas hidrofílicas se protonan en los grupos amino, lo que provoca la aparición de repulsiones entre éstas, impidiendo al tectómero formar el ensamblaje. Sin embargo, a pH básico (por encima de pH=7,4), los grupos amino se desprenden y por eso los tectómeros dan lugar a un agregado, que se separa de la fase acuosa, llegando a precipitar. No obstante, el autoensamblaje del tectómero es completa e inmediatamente reversible en disolución acuosa mediante el cambio del pH de la disolución<sup>8</sup>.

Por lo tanto, el pH adecuado para formar estructuras en 2D con estos materiales es el comprendido entre 3,0 y 7,4, mientras que, si se quiere romper la estructura formada, basta con llevar la disolución en la que se encuentren a pHs inferiores a 3,0.

## 2.-Objetivos y planteamiento

Este trabajo se encuadra dentro de una línea de investigación cuyo objetivo es el desarrollo de un nanosensor basado en Au(III) para implementar en envases de alimentos que permita una determinación rápida y específica de la tiramina. Este sistema se basa en la reacción que sufre el Au(III) en presencia de tiramina para dar lugar a nanopartículas de oro (AuNP) fuertemente coloreadas.

Para ello, será necesario llevar a cabo la inmovilización de Au(III) en un envase de plástico (en el trabajo se ha utilizado poli(ácido láctico)). Esto se realizará mediante la formación de un complejo entre el Au(III) y un tectómero, que posteriormente quedará adherido al plástico gracias a la acción del tectómero.

Por otra parte, también se evaluará un método que permita la detección del oro que no se haya conseguido inmovilizar en el plástico. Este método se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Au(III) y el anión bromuro que permite su detección y cuantificación mediante absorción molecular<sup>9</sup>.

El trabajo se estructura de la siguiente forma, atendiendo al carácter de los diferentes objetivos:

- Objetivos de tipo formativo:
  1. Consultar artículos y material bibliográfico sobre la situación del tema hasta el momento.
  2. Comprender el funcionamiento y aprender el correcto manejo de un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis.
  3. Aprender a resolver un problema en el ámbito de la Química Analítica siguiendo las pautas del método científico.
- Objetivos de carácter científico:
  1. Estudiar y optimizar los parámetros de la formación del complejo  $\text{AuBr}_4^-$ .
  2. Elaborar una recta de calibrado que permita cuantificar Au(III) mediante la formación de dicho complejo a partir de disoluciones de Au(III) de diferentes concentraciones con concentración constante de bromuros con diferentes proporciones entre el tectómero y el oro.
  3. Estudiar el efecto que produce la adición de tectómero 2T y 4T sobre disoluciones de Au(III) en presencia de bromuros con diferentes proporciones entre el tectómero y el oro.
  4. Inmovilizar el complejo formado por el tectómero y el oro en láminas de PLA y realizar un análisis acerca de la inmovilización mediante la cuantificación del oro que se desprende de las láminas.
  5. Validar el método por comparación de los resultados obtenidos sobre las mismas muestras mediante absorción molecular y espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo.
  6. Llevar a cabo una calibración para la reacción entre la tiramina y el oro a partir de distintas disoluciones de tiramina preparadas con tiramina comercial mediante la medida de las coordenadas RGB.
  7. Extraer la información analítica de los datos obtenidos en el laboratorio, llevando a cabo los tratamientos de datos necesarios y exponer los resultados debidamente.

### **3.-Parte experimental**

#### **3.1.- Reactivos y disoluciones**

##### **3.1.1.- Reactivos y disoluciones generales**

- Disoluciones amortiguadoras  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  de pH 6 y 7 de concentración en torno a 0,1M preparadas disolviendo aproximadamente 0,71 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Panreac 131679.1211) en un volumen también aproximado de 50mL de agua mili-Q y ajustando el pH con una disolución de HCl 1M.

- Disolución amortiguadora  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de pH 2 y concentración aproximada de 0,1M. Se pesan en torno a 0,71 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Panreac 131679.1211) y se disuelven en un volumen aproximado de 50mL de agua mili-Q. El ajuste del pH se hace con disoluciones de HCl 5M y 1M.
- Disolución de bromuro de potasio 1,5M. Esta disolución se prepara disolviendo 178,5mg de KBr en 1mL de agua mili-Q.  
Si se necesitan otras diluciones se preparan a partir de ésta diluyendo a un volumen de 1mL con agua mili-Q.

### 3.1.2.- Disoluciones de oro

- Tetracloroaurato de sodio dihidratado,  $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , (Stream Chemicals REF:79-0500). Se prepara una disolución de concentración 50mM utilizando como disolvente agua mili-Q. Las disoluciones con otras concentraciones se preparan a partir de diluciones de ésta, siempre diluyendo en agua mili-Q.

### 3.1.3.- Disoluciones de tiramina

- Tiramina hidrocloreto (Sigma-Aldrich 53300) 98% pureza.  
Se prepara una disolución de concentración 0,1000M disolviendo 17,37 mg en disolución amortiguadora de pH 6 y ajustando el volumen a 1 mL.  
Las disoluciones de concentración deseada se preparan llevando a cabo las diluciones necesarias a partir de la disolución de concentración 0,1M, siempre en disolución amortiguadora de pH 6.

### 3.1.4.- Disoluciones de tectómero

- Tectomer 2-tailed Purity 95%,  $\text{C}_8\text{H}_{10}(\text{-CH}_2\text{-NH-Gly5})_2 \cdot 2\text{HCl}$ , (PlasmaChem GmbH, Cat. No.: PL-TEC-2). Se prepara una disolución disolviendo cuantitativamente 2,9 mg en 1 mL de agua mili-Q.
- Tectomer 4-tailed Purity 95%,  $\text{C}(\text{-CH}_2\text{-NH-Gly7})_4 \cdot 4\text{HCl}$ , (PlasmaChem GmbH, Cat. No.: PL-TEC-4). Se hace una primera disolución disolviendo cuantitativamente 4 mg del tectómero en 1mL de agua mili-Q.

Las disoluciones de tectómero de concentraciones menores se preparan a partir de diluciones de éstas dos, siempre en agua mili-Q.

## 3.2.- Instrumentación y material

### 3.2.1.- Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis SPECORD<sup>R</sup> 210 Plus, con lámparas de wolframio y deuterio y un rango de medida comprendido entre 185 y 1200nm.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión  $\pm 0,01\text{mg}$ .

### 3.2.2.- Material y aparatos

- Vasos de precipitados.
- Micropipetas Socorex de volúmenes 100-1000 $\mu\text{L}$ , 10-100 $\mu\text{L}$ , 5-50 $\mu\text{L}$  y 1-20 $\mu\text{L}$ .

- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur, tubos Falcon.
- Cubetas de plástico desechables de 1 cm de paso óptico.
- Cubetas de plástico de bajo volumen.
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Placas de pocillos nunc™.
- Láminas de poli(ácido láctico), PLA.

### 3.3.- Procedimiento experimental

#### 3.3.1.-Método de cuantificación de oro a partir de la formación de un complejo con bromuros

Todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis. Para preparar las disoluciones de medida se utilizaron cubetas de plástico poniendo un volumen total de 2mL en éstas.

Antes de realizar las medidas, se hacía una medida de referencia, poniendo tanto en la cubeta de referencia como en la de medida agua mili-Q o disolución amortiguadora del pH adecuado.

Los espectros que se registraron presentaban un máximo de absorción a 380nm, que se correspondía con la coloración amarilla del complejo formado por el Au(III) con el anión bromuro. Se realizaba un espectro completo, con el modo “barrido espectral” del equipo, en lugar de realizar la medida a una única longitud de onda para poder comparar no sólo los valores de absorbancia, sino también las formas de los espectros, ya que en ocasiones las disoluciones presentaban algún tipo de dispersión que se producía por la adición de tectómero.

Las disoluciones de medida se prepararon añadiendo en la cubeta los reactivos necesarios sobre agua mili-Q o disolución amortiguadora, según se necesitara en cada caso. En los casos en los que se realizaron adiciones de tectómero sobre una disolución de medida previamente preparada, los valores de absorbancia se recalcularon aplicando el correspondiente factor de dilución.

#### 3.3.2.-Inmovilización del oro en láminas de PLA

La inmovilización se llevó a cabo haciendo una premezcla de las disoluciones de oro y tectómero amortiguada a pH 6 y tomando 20µL de ésta para impregnar la lámina de PLA. Las láminas se dejaban secar un día al aire. Una vez secas, se observaba la formación de una capa sólida de color amarillo adherida a la lámina de PLA. En la figura se puede ver el resultado final de las láminas.



**Figura 6:** Láminas de PLA con diferentes concentraciones de oro inmovilizado. De izquierda a derecha:  $3 \cdot 10^{-3} \text{M Au}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-3} \text{M Au}$ , PLA sin oro inmovilizado.

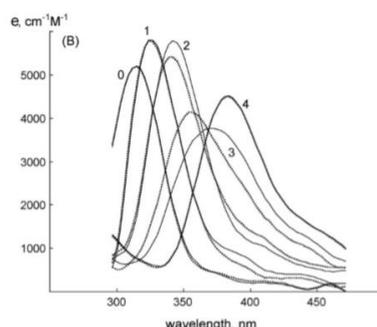
Para comprobar si el oro realmente quedaba inmovilizado en el PLA, se sumergían las láminas en agua mili-Q durante media hora. Después, se tomaba parte del agua mili-Q en contacto con la lámina y se pipeteaba a una cubeta junto con disolución amortiguadora de pH 2. Se añadía también sobre la cubeta disolución de KBr de forma que la concentración de anión bromuro en la disolución de medida fuera de 0,1M. Por último, se llevaban a cabo las medidas de las disoluciones preparadas en el espectrofotómetro de absorción molecular UV-vis.

## **4.-Resultados**

### **4.1.-Método de cuantificación de oro a partir de la formación de un complejo con bromuros**

#### **4.1.1.-Reacción entre Au(III) y bromuros**

El Au(III) forma en presencia de bromuros un complejo de color naranja-amarillo que permite determinar cuantitativamente cantidades de oro contenidas en una muestra mediante la medida de su absorbancia (Figura 7). Se ha demostrado que para concentraciones de anión bromuro iguales a 0,1M, el oro presente en la disolución se encuentra formando el complejo  $\text{AuBr}_4^-$ . La absorbancia máxima de este complejo se corresponde con 380nm (con una  $\epsilon = 4,4 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  en agua y  $a = 0,022 \text{Lmg}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )<sup>9</sup>.



**Figura 7:** Espectros obtenidos para los diferentes complejos formados entre el oro y el bromuro. El número 4 es el correspondiente al complejo  $\text{AuBr}_4^-$ .<sup>9</sup>

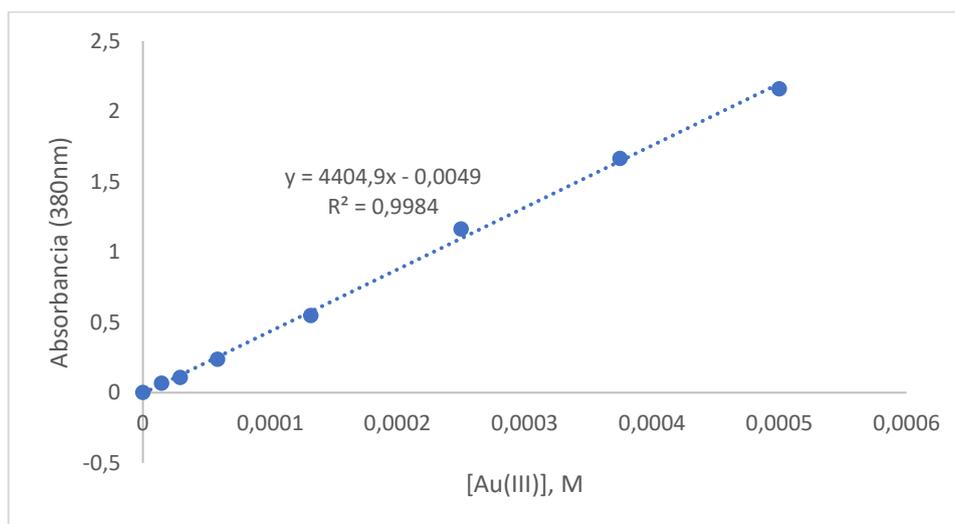
Este método de análisis será optimizado para posteriormente poder utilizarlo en la determinación del oro que se desprende en las láminas de PLA en las que se ha inmovilizado un complejo formado por un tectómero con oro. Durante todo el estudio se utilizarán concentraciones de  $\text{Br}^-$  de 0,1M en las disoluciones de medida, de forma que el complejo sobre el que se efectúen las medidas sea siempre  $\text{AuBr}_4^-$ . El anión bromuro será añadido siempre en forma de bromuro de potasio.

#### **4.1.2.-Estudio analítico del método**

En este apartado se realizó un estudio del pH en la sensibilidad del método y en sus características analíticas.

##### **4.1.2.1.-Calibración sin amortiguar**

En primer lugar, se llevó a cabo la realización de una recta de calibrado para poder estudiar el rango lineal de aplicabilidad del método. En esta recta no se tuvo en cuenta el pH de la disolución.



**Figura 8:** Recta de calibrado para la determinación de Au(III) mediante la formación del complejo AuBr<sub>4</sub><sup>-</sup> sin control del pH.

Esta recta de calibrado a 380nm se tomó como punto de partida para estudiar y optimizar la reacción de formación del complejo AuBr<sub>4</sub><sup>-</sup> teniendo en cuenta otros factores como el pH o la presencia de tectómero y de complejo oro-tectómero.

#### 4.1.2.2.-Calibración a diferentes valores de pH

El tectómero pierde su funcionalidad a valores de pH por debajo de 3,4<sup>8</sup>, por lo que se llevaron a cabo calibraciones a distintos valores de pH para poder optimizar el método para la medida tanto de disoluciones en las cuáles interese que el tectómero mantenga su funcionalidad, como de disoluciones en las cuáles no importe perder la funcionalidad del tectómero. De este modo, se realizaron calibraciones a pH 2, 6 y 7.

Las calibraciones a pH 6 y 7 se hicieron únicamente con las medidas de dos concentraciones diferentes para ver con cuál de los dos valores de pH se obtiene una mayor sensibilidad dentro del rango en el que el tectómero mantenga su funcionalidad.

C[Au(III)]/M	Abs (pH=6)	Abs (pH=7)	Abs (sin amortiguar)
0	0	0	0
2,5*10 <sup>-4</sup>	1,017	0,9524	1,1687
5*10 <sup>-4</sup>	2,1938	1,8986	2,1732

**Tabla 1:** Datos de [Au(III)] (M) y absorbancias de las rectas de calibrado a pH 6 y 7 y de la recta sin amortiguar.

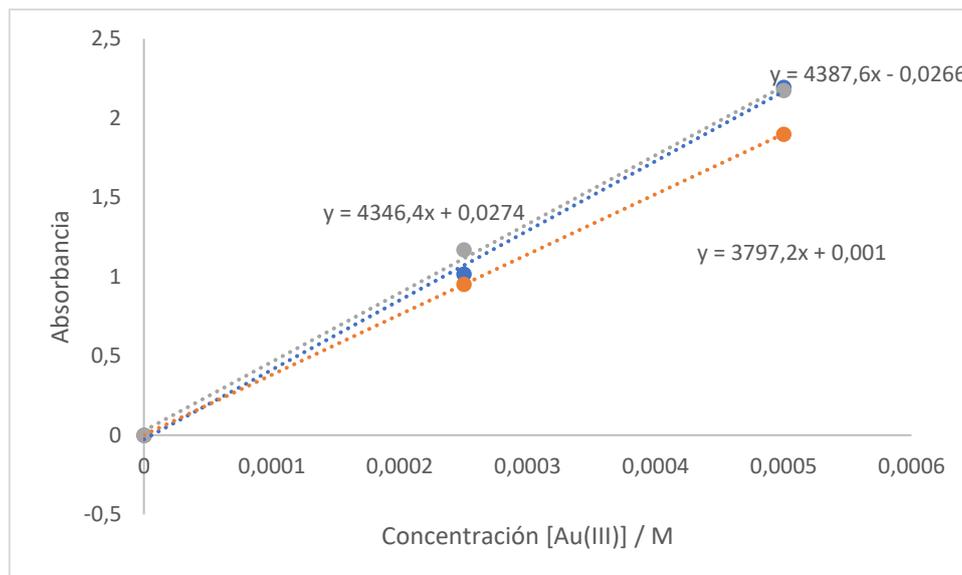


Figura 9: Rectas de calibrado a pH 6 (azul), 7 (naranja) y sin amortiguar (gris).

Para asegurar que la sensibilidad a pH 6 es mayor que a pH 7, se compararon estadísticamente las pendientes de las rectas de regresión obtenidas a ambos pHs. En primer lugar, se realizó un test F para comprobar la homogeneidad de las varianzas de las pendientes en el cual se obtuvo  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ , lo que significa que las varianzas no son homogéneas. Sabiendo esto, se empleó un test t para varianzas no homogéneas cuyos resultados mostraron que ambas pendientes no son significativamente diferentes, ya que  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ .

Recta	Pendiente	s(pendiente)	var(pendiente)	g.de libertad
pH 6	$4,39 \cdot 10^3$	$0,18 \cdot 10^3$	$34,05 \cdot 10^3$	1
pH 7	3797,2	7,2	51,3	1

Tabla 2: Valores de la pendiente y de su desviación estándar, varianza y grados de libertad de las rectas de calibrado a pH 6 y 7.

F calculado	F tabulado	t calculado	t tabulado
664,3	161,4	3,2	12,7

Tabla 3: Resultados de los tests F y t para la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado a pH 6 y 7.

Por lo tanto, no se puede asegurar que la sensibilidad a pH 6 sea mayor que a pH 7. Aun así, el pH 6 será el utilizado para llevar a cabo medidas de absorbancia para las cuáles se requiera que el tectómero siga siendo funcional, ya que, a pH más ácido, el complejo formado entre el oro y el anión bromuro tiene una coloración más fuerte<sup>10</sup>, por lo que dará una mayor absorbancia.

A pH=2, se hizo una recta de calibrado completa, la cual se utilizaría para llevar a cabo la cuantificación de oro en disoluciones en las que no haya o no importe que se pierda el complejo tectómero-oro.

C[Au(III)]/M	Abs
0	0,0001
$1,493 \cdot 10^{-5}$	0,0636
$2,9709 \cdot 10^{-5}$	0,1279
$5,8824 \cdot 10^{-5}$	0,2593
$1,2912 \cdot 10^{-4}$	0,5623

Tabla 4: Datos de [Au(III)] (M) y absorbancia de la recta de calibrado realizada a pH 2.

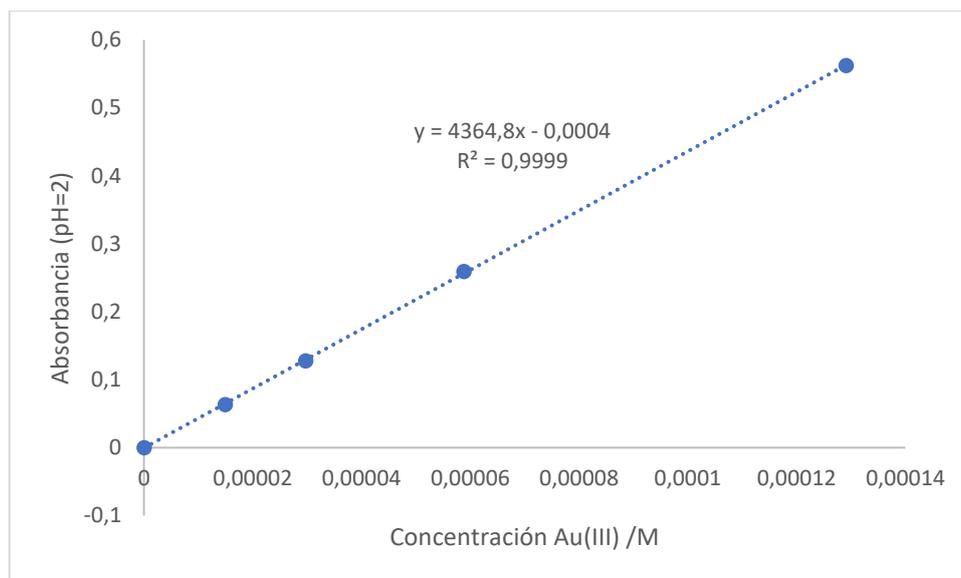


Figura 10: Recta de calibrado a pH 2.

Recta	Pendiente	s(pendiente)	var(pendiente)	g.de libertad
sin amortiguar	4405	89	8003	6
pH 2	4365	20	414	3

Tabla 5: Valores de la pendiente y su desviación estándar, varianza y grados de libertad para las rectas de calibrado a pH 2 y sin amortiguar.

t calculada	t tabulada
0,44	2,45

Tabla 6: Resultados del test t para la comparación de las pendientes de las rectas de calibrado a pH 2 y sin amortiguar.

En un principio, esta recta de calibrado se construyó con 8 puntos de diferentes concentraciones, pero como se obtenía una ordenada en el origen muy grande en valor absoluto, se aplicó el test del residual estándar anómalo sobre los tres puntos de mayores concentraciones, cuyo resultado permitió eliminar estos puntos mejorando el ajuste, aunque perdiendo sensibilidad (disminuyó el valor de la pendiente).

Al tener que eliminar de la recta los puntos de mayor concentración, el valor de la nueva pendiente obtenida es menor que el de la recta sin amortiguar. No obstante, tras comparar las pendientes de las dos gráficas mediante un test t, no se puede asegurar que ambas pendientes sean significativamente diferentes, ya que el valor de  $t_{\text{calc}}$  obtenido es menor que  $t_{\text{tab}}$ .

En cuanto a los parámetros analíticos de la recta de calibrado a pH 2, los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se calcularon tomando 10 medidas consecutivas del blanco para obtener la desviación estándar, que tiene un valor de  $2,0028 \cdot 10^{-4}$  (en unidades de absorbancia), multiplicando esta desviación estándar por 3 y por 10, respectivamente, y dividiendo estos dos valores por la pendiente de la recta. Se obtuvo un LD de  $1,376 \cdot 10^{-7} \text{M}$  y un LC de  $4,588 \cdot 10^{-7} \text{M}$ .

El rango lineal del método va desde el límite de cuantificación hasta el último punto de la recta, es decir, desde  $4,588 \cdot 10^{-7} \text{M}$  hasta  $1,29 \cdot 10^{-4} \text{M}$ .

La sensibilidad del método será igual a  $4364,8 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ .

#### 4.1.3.-Efecto de la adición de disoluciones de tectómero 2T y 4T sobre una disolución de Au(III) con bromuros

El siguiente paso fue observar el efecto que producía sobre la absorbancia la adición de concentraciones conocidas de tectómero, realizando pruebas con tectómero 2T y 4T y con diferentes proporciones entre las concentraciones de oro y tectómero. Se hicieron medidas con relaciones de concentración 0,25:1; 0,5:1; 1:1; y 2:1 (tectómero:oro) poniendo en la cubeta concentraciones de oro de  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$  para el tectómero 2T y de  $5,88 \cdot 10^{-5} \text{M}$  para el tectómero 4T, además de una concentración de 0,1M en bromuros. Sobre cada una de las cubetas se realizaron las correspondientes adiciones de las disoluciones de tectómero y se llevaron a cabo medidas de absorbancia. Posteriormente, se corrigieron los valores de absorbancia obtenidos teniendo en cuenta el factor de dilución producido por las adiciones de tectómero, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 9.

Relación (t:Au)	0,25:1	0,5:1	1:1	2:1
Adiciones de t-2T ( $3,56 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ )/ $\mu\text{L}$	35	70	140	280
Adiciones de t-4T ( $2,14 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ )/ $\mu\text{L}$	15	30	60	120

Tabla 7: Adiciones de tectómero realizadas sobre las disoluciones de Au(III) en presencia de bromuros.

Concentración Au(III)/M	Absorbancia
$2,5 \cdot 10^{-4}$	1,1696
$5,88 \cdot 10^{-5}$	0,2557

Tabla 8: Datos de [Au(III)] y absorbancias de la recta de calibrado sin amortiguar.

Relación t: Au	Medidas de absorbancia:		Correcciones por dilución:	
	Tectómero 2T	Tectómero 4T	Tectómero 2T	Tectómero 4T
0,25:1	1,1479	0,2494	1,168	0,2513
0,5:1	1,1294	0,2446	1,1689	0,2483
1:1	1,0852	0,2347	1,1612	0,2417
2:1	1,0091	0,2204	1,1504	0,2435

**Tabla 9:** Datos de absorbancias obtenidas y sus correcciones por dilución para las disoluciones de Au(III) en presencia de bromuros en las cuáles se han realizado adiciones de tectómero en proporciones molares 0,25:1; 0,5:1; 1:1 y 2:1.

En los resultados se puede ver que disminuyen algo los valores de absorbancia al adicionar tectómero, pero no supone una variación importante ya que al realizar un test t para comparar el primer y el último dato de cada columna de valores de absorbancia con las correcciones por dilución aplicadas, se obtiene en ambos casos que  $t_{calc} < t_{tab}$ , lo que quiere decir que los valores de absorbancia no son significativamente diferentes. Esto se debe a que en este estudio, la disolución de oro con bromuros estaba preparada antes de añadir el tectómero, lo que quiere decir que el complejo  $AuBr_4^-$  ya estaría formado, por lo que no se consigue una gran interacción entre el tectómero y el oro al encontrarse este formando ya otro complejo.

t calculada 2T	t calculada 4T	t tabulada
0,39	1,90	4,30

**Tabla 10:** Resultados del test para la comparación de los valores de absorbancia obtenidos tras la adición de tectómero con la corrección por dilución aplicada.

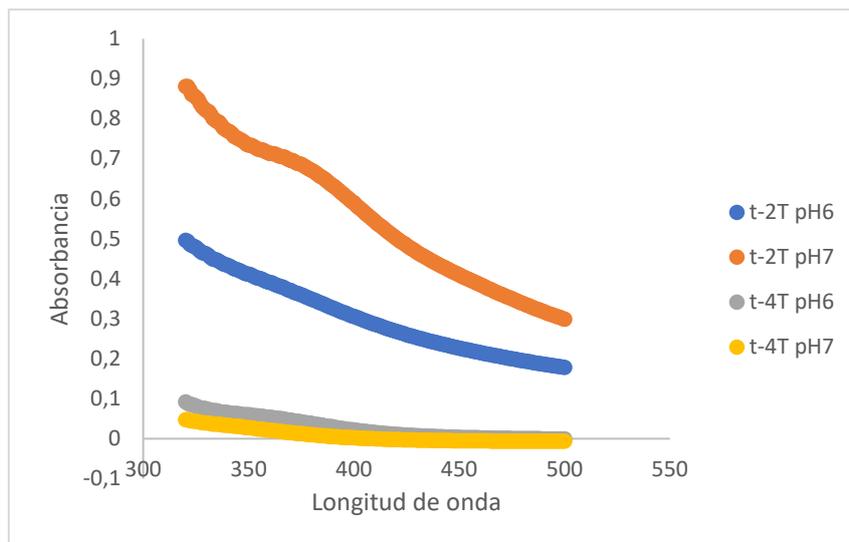
#### 4.1.4.-Adición de disoluciones de tectómero 2T y 4T sobre una disolución de Au(III) sin bromuros

##### 4.1.4.1.-Premezcla tectómero-oro

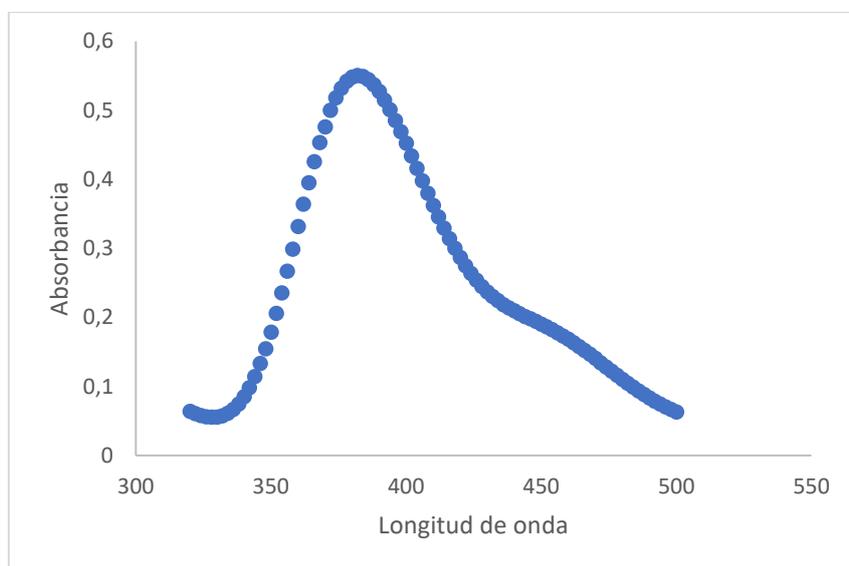
Como se ha visto en el apartado anterior, cuando se añade tectómero sobre una disolución que contenga el complejo  $AuBr_4^-$ , éste no interacciona con el oro, al estar el oro formando un complejo con el anión bromuro. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en realizar el mismo estudio pero esta vez preparando una premezcla entre el tectómero y el oro antes de añadir los bromuros, para poder observar las interacciones que se formaban. Se prepararon cuatro premezclas diferentes, todas ellas con proporción entre el tectómero y el oro de 1:1. Se probó con tectómero 2T y con 4T y tanto a pH 6 como a pH 7.

##### 4.1.4.2.-Medida de las disoluciones preparadas con premezcla tectómero-oro

A partir de cada una de las premezclas se preparó una disolución de medida en la cual hubiera una concentración de oro de  $1,6 \cdot 10^{-4} M$  y una concentración de bromuros de  $0,1 M$ . Los espectros que se obtuvieron fueron los expuestos en la Figura 11.

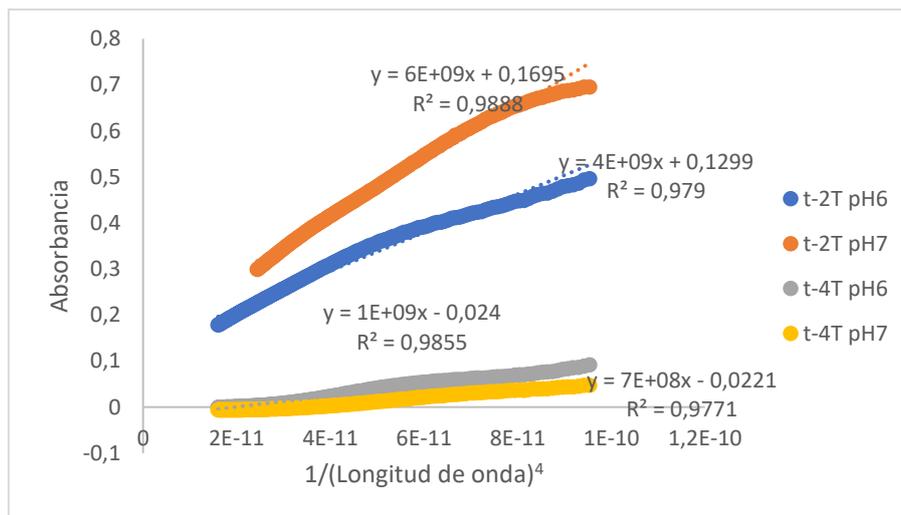


**Figura 11:** Espectros obtenidos para las diferentes disoluciones de medida preparadas a partir de las premezclas entre el tectómero y el oro.



**Figura 12:** Espectro obtenido para una disolución de concentración de Au(III)  $1,6 \cdot 10^{-4}$  M y concentración de bromuros 0,1 M.

Si se observan los espectros obtenidos para las cuatro disoluciones y se comparan con el espectro obtenido para una disolución de esa misma concentración de oro pero sin añadir tectómero (Figura 12), se puede ver que la forma es completamente diferente y que desaparece el pico de absorción característico a 380nm para las dos disoluciones con tectómero 4T y para la de tectómero 2T a pH 6, mientras que para la disolución de tectómero 2T a pH 7 el pico que se observa es muy pequeño. Esto se debe a que al preparar la disolución de medida la interacción formada por el tectómero y el oro da lugar a la aparición de una dispersión que se manifiesta de esta forma al obtener el espectro. Esta dispersión se trata de una dispersión de tipo Rayleigh, ya que, al representar los valores de absorbancia frente al inverso de la cuarta potencia de la longitud de onda, las gráficas obtenidas (Figura 13) se ajustan bastante bien a una recta (exceptuando la obtenida para el tectómero 2T a pH 7 entre 360 y 400nm, ya que en esa zona se podía observar el pico de absorción característico del complejo formado por el oro).



**Figura 13:** Representación del inverso de la cuarta potencia de la longitud de onda frente a la absorbancia y ajuste a una recta de regresión para las disoluciones medidas en la Figura 11.

En el caso del tectómero 4T, no se llega a formar nada de color amarillo correspondiente al complejo oro-bromuros, mientras que para el tectómero 2T además de la dispersión también aparece coloración amarilla, lo que quiere decir que una parte del oro permanecerá unido al tectómero mediante la interacción que había formado previamente, mientras que otra parte forma una interacción más fuerte con los bromuros, dando lugar al complejo que se intentaba medir.

A partir de este momento, se comenzó a utilizar únicamente tectómero 2T y las medidas pasaron a hacerse todas a pH 2, de forma que el tectómero pierda la funcionalidad<sup>8</sup> para que no aparezca dispersión en la disolución de medida que impida cuantificar el complejo oro-bromuro.

#### 4.2.-Inmovilización del oro en láminas de PLA

Una vez se ha encontrado un método para determinar Au(III) en presencia de tectómero, el siguiente objetivo es estudiar la inmovilización del oro en polímeros.

Tras observar que se produce una interacción entre el oro y el tectómero, se comprobó si esa interacción quedaba fijada en polímeros gracias a la unión del tectómero a éstos. Para ello, se realizaron pruebas con láminas de PLA.

Se prepararon láminas de PLA en las cuáles se pusieron premezclas con diferentes proporciones entre el tectómero y el oro, en concreto, se probó con proporciones molares de 1:1; 0,75:1 y 0,5:1. Del mismo modo, se utilizó tanto tectómero 2T como tectómero 4T. El resultado fue la formación de una capa sólida de color amarillo adherida a la lámina de PLA.

##### 4.2.1.-Estudio de la inmovilización del oro en las láminas de PLA

Para comprobar si el oro realmente quedaba inmovilizado en el PLA, se introdujeron cada una de las láminas de PLA en 2mL de agua mili-Q y se mantuvieron media hora. Después, se tomaba 1mL del agua que había estado en contacto con la lámina y se le añadían 840 microlitros de disolución amortiguadora de pH 2 y 160 microlitros de disolución de bromuro de potasio para preparar la disolución de medida. De esta forma, el tectómero que pudiera haberse desprendido de la lámina de PLA quedaría desfuncionalizado al encontrarse a pH ácido, por lo que se rompería

la interacción que formaba con el oro, impidiendo de este modo que interfiriera en la medida del oro.

Se hicieron medidas con tres láminas para cada una de las proporciones y para cada tectómero, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 11:

<b>t-2T (1:1)</b>	<b>t-4T (1:1)</b>	<b>t-2T (0,5:1)</b>	<b>t-4T (0,5:1)</b>	<b>t-2T (0,75:1)</b>	<b>t-4T (0,75:1)</b>
0,0086	0,0062	0,0123	-----	0,0107	-----
0,0039	0,0172	0,0115	-----	0,0058	-----
0,0048	0,0098	0,0135	-----	0,009	-----

**Tabla 11:** Valores de absorbancia obtenidos en la medida de las disoluciones preparadas a partir del agua mili-Q utilizada para extraer el oro que se desprende de las láminas de PLA.

<b>Premezcla</b>	<b>DSR(%)</b>
t-2T (1:1)	43,26
t-4T (1:1)	50,68
t-2T (0,5:1)	8,09
t-4T (0,5:1)	-----
t-2T (0,75:1)	29,27
<b>t-4T (0,75:1)</b>	<b>-----</b>

**Tabla 12:** Valores de DSR entre las absorbancias de la Tabla 11.

Como se puede ver en la Tabla 11, los valores de absorbancia correspondientes a las concentraciones de oro desprendidas de la lámina de PLA pueden ser cuantificados mediante la recta de calibrado de pH 2; sin embargo, para estas medidas, se obtuvieron valores de DSR muy elevados (Tabla 12). Además, en el caso del tectómero 4T, para las proporciones 0,5:1 y 0,75:1 no se observaba el pico característico a 380 nm, viéndose simplemente la línea base del espectro. Por lo tanto, el siguiente paso fue diseñar otro método que permita cuantificar las pequeñas cantidades de oro que salen de las láminas de PLA de forma que los valores de absorbancia obtenidos sean mayores para que, de este modo, la desviación estándar relativa entre las medidas sea menor.

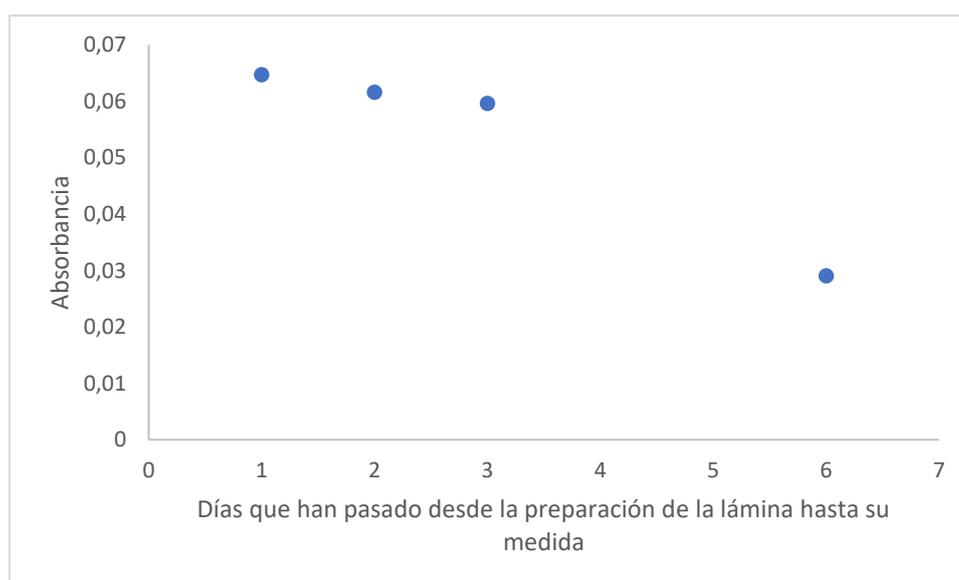
Para ello, se utilizaron cubetas de bajo volumen. De este modo, el volumen necesario para llevar a cabo las medidas de absorbancia sería menor, por lo que las láminas podrían ser sumergidas en menores volúmenes de agua mili-Q para ser lavadas.

Para llevar a cabo las medidas, se introducían dos láminas de PLA, en las cuáles se había inmovilizado la premezcla formada por el tectómero y el oro, en 600µL de agua mili-Q durante media hora. La disolución de medida se preparaba pipeteando 500µL del agua en contacto con las láminas de PLA a una cubeta de bajo volumen, sobre la que posteriormente se añadían 200µL de disolución amortiguadora de pH 2 y 50µL de disolución de bromuro de potasio. De esta forma, suponiendo que se desprenda la misma cantidad de oro por lámina que en el experimento anterior, se obtendrían unas concentraciones de oro en la disolución de medida 8,9 veces mayores. De aquí en adelante, todas las medidas para cuantificar el oro que se desprende de las láminas han sido realizadas mediante este procedimiento.

#### 4.2.2.-Variación en la cantidad de oro que se desprende de las láminas según el envejecimiento de éstas

Una vez se había verificado que el oro quedaba inmovilizado en las láminas de PLA gracias a la interacción que forma con el tectómero, se quiso comprobar si el tiempo que pasaba desde que se inmovilizaba el oro en la lámina hasta que se llevaban a cabo las medidas de absorbancia del oro que se desprendía de ésta al ser sumergida en agua mili-Q afectaba a la cantidad de oro desprendida. Para ello, se prepararon varias láminas el mismo día con el fin de llevar a cabo las medidas de estas en días distintos. De esta forma, las medidas realizadas cada día, se realizarán con láminas más envejecidas que el día anterior, ya que todas ellas fueron preparadas a la vez.

En concreto, se utilizaron 24 láminas de PLA en las cuáles se había inmovilizado una premezcla formada por tectómero 2T y oro en proporción molar 1:1 amortiguada a pH 6. Como por cada disolución de medida que se prepara se necesita gastar dos láminas, se prepararon 12 disoluciones de medida repartidas en cuatro días distintos, midiéndose un total de tres disoluciones nuevas por día. Tras obtener la media de las tres medidas de absorbancia realizadas cada día, se compararon los resultados obtenidos para cada día viéndose que la absorbancia disminuía con el paso de los días (Figura 14).



**Figura 14:** Absorbancia obtenida para la medida del oro desprendido de las láminas de PLA frente a los días que han pasado desde la preparación de la lámina hasta su medida.

<b>t calculado</b>	<b>t tabulado</b>
6,364185743	4,30265273

**Tabla 13:** Resultados del test t para la comparación de las absorbancias obtenidas en la Figura 14 para el día 1 y el día 6.

Una vez comparados estadísticamente estos resultados por medio de un test t, se puede concluir que la absorbancia disminuye de forma significativa cuantos más días pasan desde la preparación de la lámina de PLA hasta que esta es sumergida en agua mili-Q para extraer el oro que se desprende, lo que quiere decir que cuánto más tiempo pasa la premezcla formada por el oro y el tectómero en contacto con la lámina de PLA mayor será su fijación a esta.

#### 4.2.3.-Variabilidad de las medidas de absorbancia con la concentración de anión bromuro

Al realizar las medidas del apartado anterior, se observó que la absorbancia de la disolución de medida aumentaba levemente con el transcurso del tiempo. Se pensó que un aumento en la concentración de anión bromuro podría acelerar el proceso de formación del complejo  $\text{AuBr}_4^-$  y como consecuencia, suponer un aumento en la absorbancia de la disolución para no tener que esperar el tiempo necesario hasta que ésta se estabilice. Para comprobarlo, se prepararon disoluciones de medida a partir de láminas de PLA en las que se había inmovilizado oro del mismo modo que en el apartado 4.2.2. Una vez medida la disolución, sobre esta se realizaban una serie de adiciones de 50 $\mu\text{L}$  de disolución de bromuro de potasio 1,5M y se continuaba midiendo la absorbancia de la disolución tras cada adición. Estas medidas se repitieron con cuatro disoluciones. Teniendo en cuenta que, al realizarse las adiciones, el oro contenido en la disolución se diluye en un volumen mayor y aplicando los correspondientes factores de dilución, se obtienen los resultados mostrados en la Figura 15.

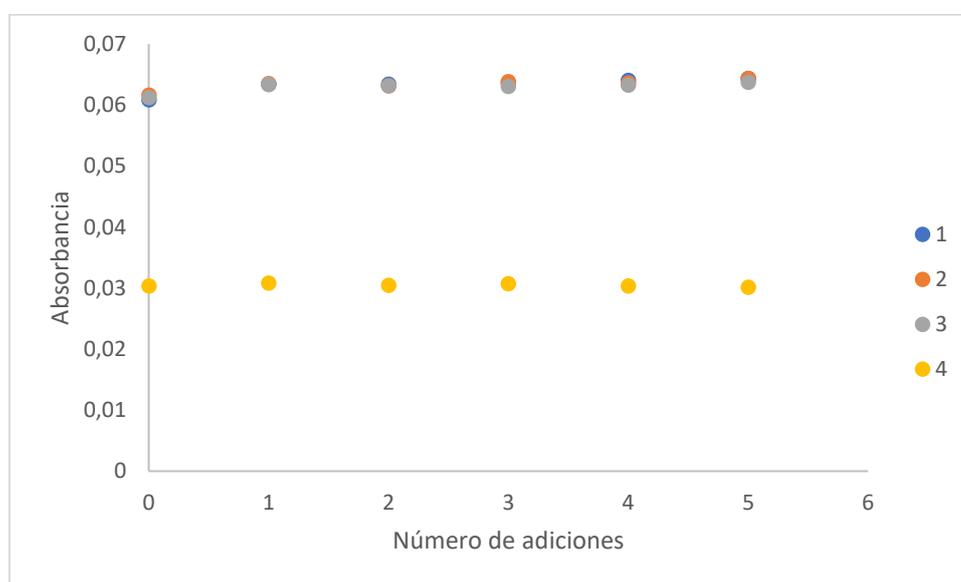


Figura 15: Variación de la absorbancia con las adiciones de disolución de KBr para las cuatro disoluciones medidas.

t calculado 1	t calculado 2	t calculado 3	t calculado 4	t tabulado
3,595531869	2,756515893	2,57284073	0,425709154	4,30265273

Tabla 14: Resultados de los tests t aplicados entre los valores mayor y menor de absorbancia obtenidos para las medidas con adiciones de KBr en las cuatro disoluciones.

Aplicando un test t para comparar los valores mayor y menor de cada serie, se obtiene que en ninguna de las muestras las adiciones de bromuros suponen una variación significativa en las medidas de la absorbancia, ya que para todos los casos el valor de  $t_{\text{calc}}$  es menor que el valor tabulado del estadístico t, por lo que se puede concluir que un aumento de la concentración de ion bromuro en la disolución no supone un cambio significativo en la señal de medida.

#### 4.2.4.-Variación de las medidas de absorbancia con el tiempo

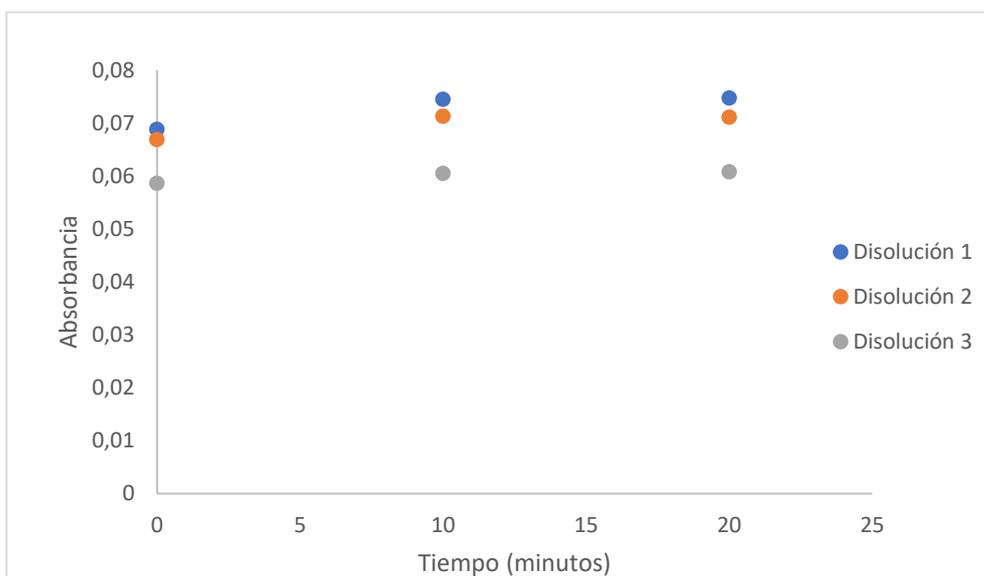
Al observar que la señal de medida del oro desprendido de las láminas de PLA variaba con el tiempo, y tras comprobar que esta variación no se podía solucionar con el aumento de la concentración de bromuros, se procedió a examinar como era esa variación y si realmente suponía una variación importante.

Para ello, las tres disoluciones de medida utilizadas el primer día en que se hizo el experimento descrito en el apartado 4.2.2. (de ahora en adelante, disoluciones 1, 2 y 3) se guardaron y se continuaron midiendo durante varios días. Se evaluó como variaba la absorbancia a corto y a largo plazo:

- Para comprobar como variaba la absorbancia a corto plazo, cada una de las disoluciones se midió una vez preparada, transcurridos 10 minutos desde su preparación y 20 minutos tras su preparación.
- Para ver como cambiaba la absorbancia a largo plazo, se continuó midiendo cada disolución durante varios días después una vez al día.

El resultado que se obtuvo fue que los valores de absorbancia aumentaban un poco durante los primeros minutos (Figura 16) y continuaban aumentando ligeramente durante los dos primeros días y, por último, se producía un descenso continuado durante los siguientes días (Figura 17).

Para saber si estas variaciones son significativas, sobre una de las cubetas se realizaron tres medidas consecutivas para calcular la desviación estándar, obteniéndose una DSR del 1,1%. Aplicando esta DSR al resto de las medidas, se realizó un test t para comparar los diferentes valores de absorbancia (Tablas 15 y 16).



**Figura 16:** Variación de la absorbancia de las disoluciones 1, 2 y 3 durante los primeros veinte minutos tras su preparación.

<b>t calculado dis1</b>	<b>t calculado dis2</b>	<b>t calculado dis3</b>	<b>t tabulado</b>
5,281480229	3,91103292	2,368464929	4,30265273

**Tabla 15:** Resultados de los tests t realizados para comparar las variaciones de absorbancia sufridas por las disoluciones 1, 2 y 3 en los veinte primeros minutos tras su preparación.

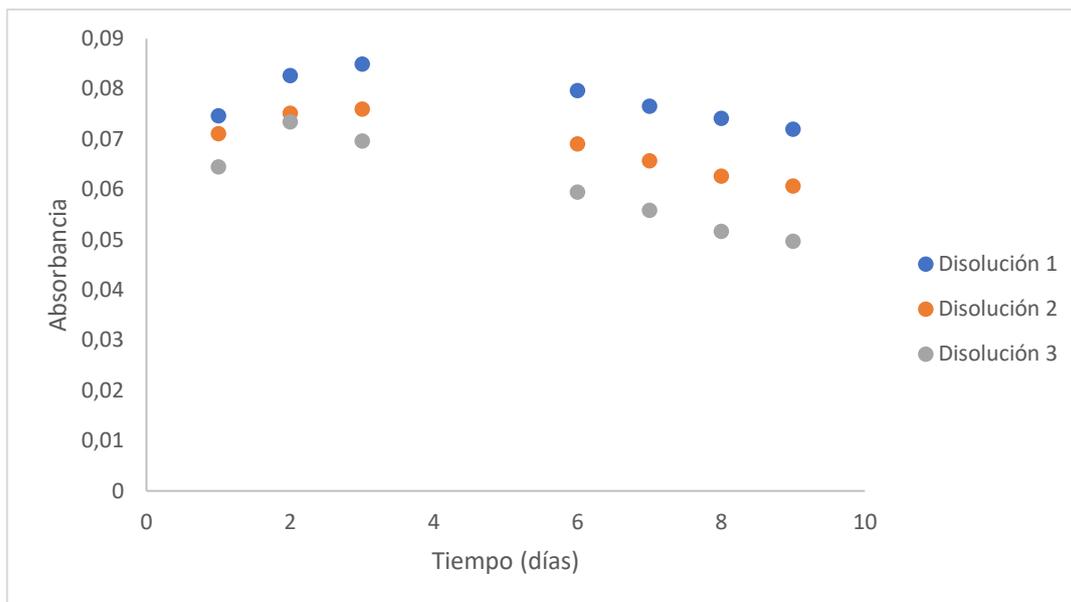


Figura 17: Variaciones de absorbancia de las disoluciones 1, 2 y 3 durante los días siguientes a su preparación.

	t calculado dis1	t calculado dis2	t calculado dis3	t tabulado
Entre día 1 y día 3	8,274718378	4,280208319	4,97791362	4,30265273
Entre día 3 y día 9	10,60919116	14,30019403	21,2392534	4,30265273

Tabla 16: Resultados de los tests t para la comparación de los valores de absorbancia obtenidos para las disoluciones 1, 2 y 3 en diferentes días.

Como puede verse en la comparación entre los valores calculados para los estadísticos t (realizados entre el primer y el último valor de cada comparación) con el valor tabulado, el aumento de la absorbancia a lo largo de los primeros 20 minutos no es significativo salvo para la disolución 1 (para la cual  $t_{calc} > t_{tab}$ ), por lo que se asume que en general, la absorbancia no varía de forma significativa durante los primeros 20 minutos.

Al comparar los valores de absorbancia obtenidos para las medidas realizadas durante los 3 primeros días, se obtiene que el aumento de absorbancia es significativo para las disoluciones 1 y 3, mientras que en las comparaciones realizadas para los valores de absorbancia de los días 3 y 9, el resultado es que el descenso de absorbancia es significativo para las 3 disoluciones. Por lo tanto, se puede concluir que la variación de la absorbancia con el paso de los días es significativa, sufriendo primero un aumento y posteriormente un descenso continuado.

Como se desconoce la razón por la que se producen estas variaciones, la cuantificación del oro mediante absorción molecular se realizará con las medidas tomadas justo después de la preparación de la disolución de medida, ya que la recta de calibrado a pH 2 se construyó con medidas tomadas en esas condiciones.

#### 4.2.5.-Cuantificación del oro que se desprende de las láminas de PLA por absorción molecular

Una vez se ha comprobado que se consigue inmovilizar parte del oro en la lámina de PLA, mientras que hay otra parte que se desprende, la cuál es menor con el transcurso de los días

tras la preparación de la lámina, el último paso es calcular qué porcentaje del oro total que se impregnaba en la lámina se conseguía fijar.

Tomando los valores de absorbancia utilizados en el apartado 4.2.2. e interpolándolos en la recta de calibrado construida a pH 2, se calculó la concentración de oro en las cubetas de medida.

Día en que se midió cada muestra tras su preparación	Absorbancia	Concentración/M	Concentración/ppm
1	0,0674	$1,55 \cdot 10^{-5}$	3,05
2	0,0620	$1,80 \cdot 10^{-5}$	2,80
3	0,0599	$1,76 \cdot 10^{-5}$	2,71
6	0,0290	$1,12 \cdot 10^{-5}$	1,32

**Tabla 17:** Concentraciones de oro en unidades de molaridad y en ppm obtenidas para las disoluciones medidas en el apartado 4.2.2.

En cada lámina se ponen un total de  $5,45 \cdot 10^{-8}$  mol de Au(III), o lo que es lo mismo  $1,07 \cdot 10^{-2}$  mg de Au(III). Suponiendo que todo el oro se desprendiera de la lámina y pasara al agua mili-Q con el que se lava ésta, en la cubeta de medida habría una concentración de oro de  $6,06 \cdot 10^{-5}$  M o **11,88 ppm**. Comparando esta concentración con las obtenidas por interpolación, se cuantifica el porcentaje de oro que se desprende de las láminas.

Día de medida de la muestra	Porcentaje de oro que se desprende(%)
1	25,65
2	23,59
3	22,82
6	11,12

**Tabla 18:** Porcentaje de oro que se desprende de la lámina de PLA según los días que han pasado desde su preparación hasta que es lavada en agua mili-Q.

#### 4.2.6.-Comparación de los resultados obtenidos por absorción molecular con un método de referencia

Para saber si los resultados obtenidos por absorción molecular son fiables, tres disoluciones de medida preparadas como se ha descrito al final del apartado 4.2.1. y cuantificadas por absorción molecular, se analizaron posteriormente mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), tomando este último método como método de referencia. Las concentraciones obtenidas por los métodos, en ppm, junto con sus desviaciones estándar, pueden verse en la Tabla 19.

Nº de muestra	Abs. Molecular	sd(Abs. Molecular)	ICP-MS	sd(ICP-MS)
1	0,835	0,054	1,683	0,103
2	0,792	0,013	1,590	0,023
3	0,479	0,003	0,895	0,037

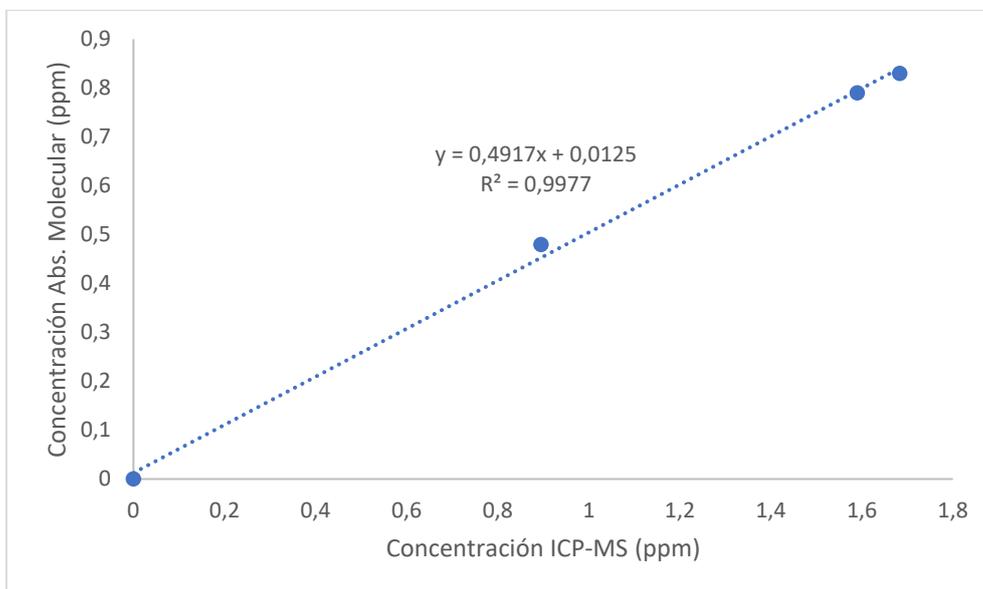
**Tabla 19:** Concentraciones obtenidas para tres disoluciones medidas por absorción molecular y por ICP-MS, en ppm, junto con sus desviaciones estándar.

Tras comparar cada pareja de datos por medio de un test t, el resultado es que todas las muestras dan resultados significativamente diferentes por ambos métodos, al obtener en los tres casos valores mayores para el estadístico t calculado que para el tabulado.

t calc muestra 1	t calc muestra 2	t calc muestra 3	t tabulado
7,276179595	30,33848588	11,31665017	4,30265273

**Tabla 20:** Resultados de los tests t para comparar los resultados de las muestras analizadas por absorción molecular y por ICP-MS.

Representado las concentraciones obtenidas por ICP-MS frente a las obtenidas por absorción molecular, se obtiene que se ajustan a una recta de pendiente 0,49 (Figura 18).



**Figura 18:** Representación de las concentraciones obtenidas por ICP-MS frente a las obtenidas por absorción molecular para tres muestras.

Estos resultados indican que a pesar de encontrarse el tectómero desfuncionalizado a pH 2, no todo el oro se desprende de éste. De este modo, el oro que permanece unido al tectómero no da lugar a la formación del complejo  $\text{AuBr}_4^-$ , por lo que no llega a detectarse mediante este método.

Teniendo en cuenta la pendiente de la recta de regresión, el oro que se cuantifica mediante absorción molecular es un 49% del oro total que se desprende de la lámina de PLA. Aplicando esta relación a los resultados del apartado 4.2.5, se obtiene que la relación real entre los días que pasan desde la preparación de las láminas y el porcentaje de oro que se desprende de estas es la mostrada en la Tabla 21.

Día de medida de la muestra	Porcentaje de oro que se desprende (%)
1	52,35
2	48,14
3	46,57
6	22,69

**Tabla 21:** Porcentaje de oro que se desprende de la lámina de PLA según los días que han pasado desde su preparación hasta que es lavada en agua mili-Q.

#### 4.3.-Determinación de tiramina por reacción con Au(III)

El último objetivo del trabajo consiste en diseñar un método que permita detectar y cuantificar tiramina mediante una reacción con Au(III) que da lugar a la formación de nanopartículas de oro

fuertemente coloreadas<sup>4</sup>. Por otra parte, se quiere comprobar si la tiramina es capaz de reaccionar con Au(III) para dar lugar a AuNP sin la presencia de la enzima TAO en el medio.

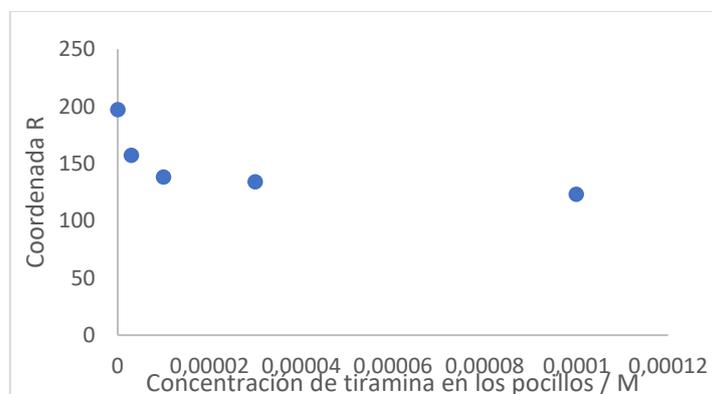
Para desarrollar este método, se llevaron a cabo una serie de reacciones en una placa de pocillos en la cual se colocaron láminas de PLA en las que se había fijado Au(III) por medio de tectómero 2T. Las láminas de PLA que se emplearon se prepararon a partir de dos premezclas de oro y tectómero diferentes, una de ellas con concentración de Au(III)  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M y la otra  $3 \cdot 10^{-3}$  M. En los pocillos en los que se colocaron las láminas se introdujeron 300  $\mu$ L de disoluciones de tiramina de diferentes concentraciones, todas ellas amortiguadas a pH 6, siendo las concentraciones de tiramina empleadas: 0,  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M. De este modo, se pudieron realizar calibraciones para la tiramina a dos concentraciones de Au(III) distintas.

Tras dejar que la reacción transcurra durante un día entero, se pudo observar que en las láminas de PLA tuvo lugar la aparición de un color morado-rojizo que varía de intensidad según la concentración de tiramina empleada, por lo que la reacción entre la tiramina y el Au(III) también tiene lugar sin la presencia de la TAO en el medio.

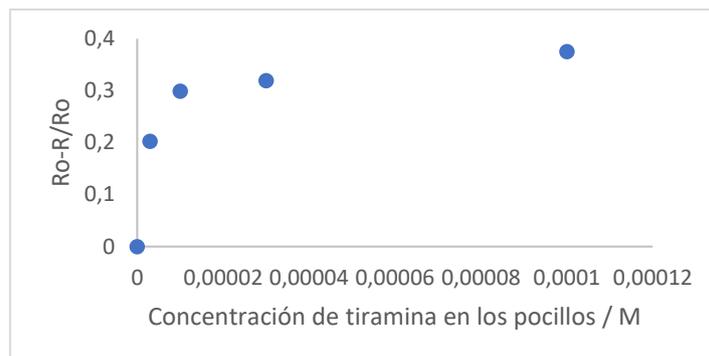


**Figura 19:** Foto del resultado obtenido en el laboratorio para la reacción de láminas de PLA con oro inmovilizado en las que se ha empleado tanto diferentes concentraciones de oro como de tiramina.

Para llevar a cabo la calibración, se midieron las coordenadas RGB de las láminas y se construyó una curva de calibrado para cada una de las concentraciones de oro. Para elaborar las curvas de calibrado se representó la coordenada R frente a la concentración de tiramina y, por otra parte,  $(R_0 - R)/R_0$  frente a la concentración de tiramina, para probar con diferentes ajustes.



**Figura 20:** Representación de la coordenada R obtenida frente a la concentración de tiramina para concentración de oro  $3 \cdot 10^{-3}$  M.



**Figura 21:** Representación de  $(R_o-R)/R_o$  frente a la concentración de tiramina para una concentración de oro  $3 \cdot 10^{-3}$  M.

Aunque los resultados obtenidos no se ajustan a una curva (por lo que no permiten la cuantificación de tiramina), solamente son los primeros pasos de la investigación, por lo que en un futuro se estudiará la optimización del método. No obstante, son unos resultados prometedores ya que se ha probado la validez del método para la detección de tiramina, al observarse que la reacción de formación de nanopartículas se produce dando lugar a la aparición de coloración en la lámina de PLA.

## **5.-Conclusiones**

Las conclusiones a las que se ha llegado se enumeran a continuación:

1. Se ha comprobado que la adición de tectómero sobre una disolución en la que haya Au(III) formando el complejo  $AuBr_4^-$  no produce la rotura del complejo para dar lugar a una interacción entre el tectómero y el oro, mientras que se esa adición se realiza sobre Au(III) sin presencia de bromuros a pH 6 o 7 se produce una interacción que da lugar a la aparición de una dispersión de tipo Rayleigh.
2. Se ha conseguido llevar a cabo la inmovilización de Au(III) en láminas de PLA utilizando las propiedades de los tectómeros 2T y 4T de crear monocapas sobre diferentes superficies pudiendo fijar a éstas moléculas que hayan interactuado previamente con el tectómero.
3. Se ha demostrado que la fijación del oro en las láminas de PLA era mayor cuanto mayor es el envejecimiento de éstas, es decir, cuanto más tiempo ha pasado desde su preparación.
4. Se ha demostrado que en el método de determinación de Au(III) por formación del complejo  $AuBr_4^-$  por absorción molecular no se produce una variación de sus resultados al variar la concentración de anión bromuro en la disolución de medida (siendo siempre esta concentración mayor a 0,1 M), mientras que si se produce variación con el tiempo que pasa desde la preparación de la disolución de medida.
5. Se ha cuantificado el oro que no consigue fijarse a las láminas de PLA por absorción molecular y por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo tomando éste último como referencia y se ha demostrado que el método de absorción molecular sólo consigue cuantificar un 49% de este oro. Esto se debe a que a pesar de encontrarse el tectómero desfuncionalizado a pH 2, sigue formando interacciones con

parte del oro, impidiendo que éste oro llegue a formar el complejo  $\text{AuBr}_4^-$  que permite su cuantificación por absorción molecular.

6. Se ha comprobado que la tiramina es capaz de reducir Au(III) a  $\text{Au}^0$  (en forma de nanopartículas de oro) sin que se encuentre en el medio de reacción la enzima tiramina oxidasa.
7. Se ha conseguido llevar a cabo una reacción que permite detectar tiramina por la formación de nanopartículas de oro fuertemente coloreadas en láminas de PLA. No se ha conseguido llevar a cabo su cuantificación mediante la elaboración de una curva de calibrado que relacione la concentración de tiramina con diferentes parámetros de las coordenadas RGB de las nanopartículas de oro.

## **6.-Bibliografía**

- (1) Doeun, D.; Davaatseren, M.; Chung, M. S. Biogenic Amines in Foods. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26* (6), 1463–1474.
- (2) Benkerroum, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15* (4), 801–826.
- (3) Bai, J.; Flowers, K.; Benegal, S.; Calizo, M.; Patel, V.; Bishnoi, S. W. Using the Enzymatic Growth of Nanoparticles to Create a Biosensor: An Undergraduate Quantitative Analysis Experiment. *J. Chem. Educ.* **2009**, *86* (6), 712–714.
- (4) Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents. *Langmuir* **2006**, *22* (13), 5882–5887.
- (5) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4215–4221.
- (6) Bovin, N. V.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A. Oligoglycines: Materials with Unlimited Potential for Nanotechnologies. *Nanotechnologies Russ.* **2008**, *3* (5–6), 291–302.
- (7) Tsygankova, S. V.; Chinarev, A. A.; Tuzikov, A. B.; Zaitsev, I. S.; Severin, N.; Kalachev, A. A.; Rabe, J. P.; Bovin, N. V. Assembly of Oligoglycine Layers on Mica Surface. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2011**, *02* (01), 91–97.
- (8) Garriga, R.; Jurewicz, I.; Romero, E.; Jarne, C.; Cebolla, V. L.; Dalton, A. B.; Muñoz, E. Two-Dimensional, PH-Responsive Oligoglycine-Based Nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (3), 1913–1921.
- (9) Kudrev, A. G. Calculation of Equilibrium Constants by Matrix Method for Complexes of Gold(III). *Talanta* **2008**, *75* (2), 380–384.