

Tesis Doctoral

Química

Estudio de las Interacciones de Nanopartículas Aniónicas
de Oro con ADN y sus Monómeros Constituyentes

Autor:

José María Carnerero Panduro

Director:

Rafael Prado Gotor

Profesor Titular de la Universidad de Sevilla

Dpto. de Química Física

Facultad de Química

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2016

Tesis doctoral: Estudio de las Interacciones de Nanopartículas Aniónicas de Oro con ADN y sus Monómeros Constituyentes.

Autor: José María Carnerero Panduro

Director: Rafael Prado Gotor

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

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

En Sevilla, a de septiembre de 2017

El Secretario del Tribunal

*A todas aquellas
personas que me han apoyado
durante estos cuatro años.*

Resumen

En la presente Tesis Doctoral se desarrolla un estudio exhaustivo de la agregación de nanopartículas de oro (AuNPs) provocada por la interacción con las distintas unidades monoméricas del ADN, así como el efecto protector de ADN polimérico tanto de hebra doble como simple a la aglomeración inducida por una sal inerte. Se ha establecido un orden de afinidad para las nucleobases a partir de la determinación de valores de energías libres correspondientes al proceso de adsorción, obtenidos por tres procedimientos diferentes. Dicho estudio se ha extrapolado también a la adenosina y a la adenosina monofosfato, donde la agregación fue menor conforme aumentó el grado de complejidad del monómero; sin embargo, el no observarse aglomeración de nanoclusters no es sinónimo de no adsorción, hecho que se ha comprobado en el caso del nucleótido. La fuerza impulsora que diferencia el grado de agregación entre la adenosina neutra o cargada y el AMP es de carácter marcadamente electrostático.

Se ha desarrollado paralelamente un método colorimétrico de detección de ADN de cadena larga tomando como punto de referencia el color azul de la banda de plasmón correspondiente a nanopartículas agregadas. Para ello fue necesaria la optimización de la cantidad de sal a añadir para desestabilizar al coloide, el orden de adición de los diferentes componentes así como el tamaño de la nanopartícula. A diferencia de los oligonucleótidos, donde sólo hay protección contra la agregación inducida por un electrolito para los de cadena simple, se observó un aumento del grado de dispersión del sistema coloidal conforme aumentó la concentración del biopolímero. Así mismo, técnicas como la microscopía de fuerza atómica, medidas de viscosidad o de dispersión dinámica de luz, entre otras, confirman que la mera presencia de nanopartículas aniónicas provoca cambios estructurales en el polinucleótido. Estos cambios reducen la estabilidad del ADN, provocando una preferencia por interactuar con los cationes sodios y protegiendo a las nanopartículas de la agregación. Por otro lado se han obtenido complejos ADN-nanopartículas similares en conformación y estructura a las histonas sin necesidad de funcionalizar la nanopartícula o dotarla de carga positiva, trabajando a diferentes temperaturas y corroborando a través de espectros de dicroísmo circular que el ADN mantiene una conformación similar a la nativa.

Abstract

In the present PhD. Thesis, a thorough study of gold nanoparticles' (AuNPs) interaction, and the nanocluster aggregation induced by it, with different DNA monomeric units has been carried out. A protective effect of polymeric DNA, either double or single stranded, for inert salt-induced agglomeration has been found and explored. An affinity order has been established for the nucleobases based on the determination of their adsorption processes' free energy values, calculated by three different methods. This study has been also extrapolated to adenosine and adenosine monophosphate (AMP), and a lesser aggregation grade was found as the complexity grade of the monomer increased. However, experimental results for adenosine prove that the absence of aggregation-induced color changes does not imply an absence of monomer-particle interactions. The reactivity differences between neutral or charged adenosine and AMP are distinctly charge-based.

A colorimetric method for the detection of long DNA molecules has been concurrently developed, taking as reference point the blue color of plasmon band of aggregated NPs. The optimization of added salt concentrations, as well as the addition order for the different components and the nanoparticle size, were key parts of this study. In contrast to oligonucleotides, where a degree of electrolyte-induced aggregation protection has only been described for single stranded DNA, in our case an increase of the dispersion grade of the colloidal system was observed when the biopolymer concentration rose. Techniques like atomic force microscopy, viscosity measures or light scattering dynamic, among others, support that the mere presence of anionic nanoparticles induces structural changes in the polynucleotide. These changes reduce DNA stability, and in turn increase its affinity for Na^+ cations, reducing their concentration on the medium and protecting the anionic-protected particles from aggregation. Finally, DNA-nanoparticles complexes with remarkable similarities in both conformation and structure to histones have been obtained, without the need to functionalize or change the particle's charge. This work has been carried out at different temperatures, and the DNA has been found to present a conformation not dissimilar to its native form by employing circular dichroism measurements.

Índice

Resumen	vii
Abstract	ix
Índice	xi
1. Introducción	17
1.1. Nanopartículas de oro	17
1.1.1. Importancia de las nanopartículas en la nanociencia	17
1.1.2. Propiedades de las nanopartículas de oro	18
1.1.2.1. Resonancia del Plasmón Superficial	18
1.1.2.2. Predicción del comportamiento de la banda SPR: teoría de Mie	20
1.1.2.3. Estabilidad de las nanopartículas	23
1.1.3. Interés científico y tecnológico de las AuNPs	25
1.2. El ácido desoxirribonucleico como biopolímero	26
1.2.1. Propiedades de las unidades monoméricas	27
1.2.2. Influencia de la longitud y secuencia de la cadena en las propiedades del ADN ..	29
1.2.3. Conformaciones del ADN	30
1.3. Interacción del ADN con nanopartículas de oro	32
1.3.1. Interacciones entre monómeros del ADN y nanopartículas de oro	32
1.3.2. Interacciones entre oligonucleótidos y nanopartículas de oro	34
1.3.2.1. Interacciones de ADN de cadena sencilla con nanopartículas de oro	34
1.3.2.2. Interacciones de ADN de doble cadena con nanopartículas de oro	37
1.3.3. Interacciones entre ADN de cadena larga y nanopartículas de oro	38
1.4. Interés y aplicaciones de las interacciones entre los polinucleótidos y las nanopartículas de oro	39

2. Deconvolución y análisis espectral de las bandas SPR	41
2.1. MiePlot: obtención de espectros de absorción a través de la teoría de Mie	41
2.2. Fityk: análisis de las bandas de los espectros de absorción a través de técnicas de deconvolución	43
2.3. Cuantificación del color a partir de medidas de transmitancia	44
3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro. Fenómenos de agregación. Efecto del disolvente en la banda SPR.	49
3.1. Motivación, antecedentes y objetivos	49
3.2. Materiales y métodos	52
3.2.1. Materiales	52
3.2.2. Espectros de absorción en el UV-vis	52
3.2.2.1. Espectros de absorción para el estudio de la agregación inducida por sal	52
3.2.2.2. Espectros de absorción en presencia de alcoholes tetraédricos	52
3.2.3. Medidas de potencial zeta	52
3.2.4. Medidas de TEM	53
3.2.5. Medidas de índice de refracción	53
3.2.6. Medidas de Dispersión Dinámica de Luz	53
3.2.7. Análisis de las bandas de absorción por deconvolución	53
3.3. Síntesis y caracterización de las AuNPs empleadas en el estudio	54
3.3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 15 nm	54
3.3.1.1. Síntesis de AuNPs de 15 nm	54
3.3.1.2. Caracterización de las AuNPs	55
3.3.2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 30 nm	57
3.3.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 5 nm	59

3.3.4. Estudio del efecto del tamaño de la nanopartícula en la banda SPR a través de la teoría de Mie	60
3.4. Agregación inducida por cloruro sódico	62
3.5. Efecto del disolvente en la banda plasmón. Aplicación de la teoría de Mie	66
3.5.1. Efecto de alcoholes tetraédricos en la banda SPR de AuNPs	67
3.5.2. Análisis del efecto del disolvente a través de la teoría de Mie	70
3.5.3. Interacción de los alcoholes con la superficie de las nanopartículas de oro	72
3.5.4. Estudio de la agregación por deconvolución de las bandas experimentales	76
4. Interacción de monómeros del ADN con nanopartículas de oro	81
4.1. Motivación, antecedentes y objetivos	81
4.2. Materiales y métodos	83
4.2.1. Materiales	83
4.2.2. Espectros de absorción en el UV-vis	83
4.2.2.1. Espectros de absorción para la titulación de monómeros con AuNPs	83
4.2.2.2. Espectros de absorción para el estudio de protección a la agregación del AMP	84
4.2.2.3. Espectros de absorción para el estudio cinético de las interacciones de las bases con las AuNPs	84
4.2.3. Espectros de Resonancia magnética Nuclear de protones	84
4.2.4. Medidas de índice de refracción	85
4.2.5. Obtención de los parámetros CIELab	85
4.2.6. Análisis de deconvolución	85
4.3. Interacción de las nucleobases con nanopartículas de oro	86
4.3.1. Adenina	86
4.3.2. Timina	95

4.3.3. Citosina	100
4.3.4. Guanina	106
4.3.5. Comparativa de las interacciones de las cuatro bases	107
4.3.5.1. Discusión sobre el criterio para establecer el orden de afinidad	107
4.3.5.2. Análisis de los resultados obtenidos	111
4.3.5.3. Estudio de la interacción adenina/AuNPs y timina/AuNPs por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	113
4.4. Efecto de la complejidad estructural del monómero en la interacción	119
4.4.1. Adenosina	119
4.4.2. Adenosina monofosfato	124
4.4.3. Análisis de los resultados obtenidos	125
4.5. Influencia del pH en la interacción de la adenina con las nanopartículas de oro	128
5. Interacción de ADN de cadena larga con nanopartículas	133
5.1. Motivación, antecedentes y objetivos	133
5.2. Materiales y métodos	135
5.2.1. Materiales	135
5.2.2. Preparación del ADN de cadena simple	135
5.2.3. Fragmentación del ADN por sonicación	136
5.2.4. Espectros de absorción en el UV-vis	136
5.2.4.1. Espectros de absorción para el estudio de la agregación inducida por sal en presencia de ADN	136
5.2.4.2. Medidas de cinética	137
5.2.4.3. Medidas de absorbancia diferentes temperaturas: estudios de <i>melting</i> de ADN	137
5.2.5. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones	137

5.2.6. Espectroscopía de Dicroísmo Circular	138
5.2.7. Medidas de viscosidad	138
5.2.8. Medidas de Microscopía de Fuerza Atómica	139
5.2.9. Medidas de Dispersión Dinámica de Luz	139
5.2.10. Análisis de deconvolución	139
5.2.11. Obtención de los parámetros CIELab	140
5.2.12. Medidas de Microscopía de Fluorescencia	140
5.2.13. Medidas de Microscopía de Transmisión Electrónica con filtrado energético ..	140
5.3. Detección colorimétrica de ADN de cadena doble con nanopartículas aniónicas de oro	141
5.3.1. Determinación del orden de adición óptimo para el método colorimétrico	143
5.3.2. Comparativa del método entre ADN de cadena doble y simple	146
5.3.3. Influencia de la longitud de la cadena de ADN	148
5.4. Influencia del tamaño de las nanopartículas en la detección de ADN de cadena larga	151
5.4.1. Criterio para establecer la concentración de AuNPs en las muestras	151
5.4.2. Detección colorimétrica de ADN con AuNPs de 27 nm	152
5.4.3. Detección colorimétrica de ADN con AuNPs de 4.5. nm	153
5.4.4. Diferencias en el efecto de protección según el tamaño	155
5.5. Posibles causas del efecto protector del ADN de cadena larga frente a la agregación de nanopartículas de oro inducida por sal	157
5.5.1. Posibilidad de apertura total o parcial del ADN	158
5.5.2. Captura de cationes sodio por parte del ADN	160
5.5.3. Efectos de las nanopartículas aniónicas en la estructura del ADN	165
5.6. Uso de la temperatura para la formación de complejos de ADN simulando a histonas	174

6. Conclusions	183
7. Conclusiones	185
Referencias bibliográficas	187
Publicaciones, aportaciones a congresos y estancias	199
Anexo 1: Cálculo del número de bases por nanopartícula participantes en la adsorción	201
Anexo 2: Estimación del peso molecular del ADN de <i>calf thymus</i>	206
Índice de Figuras	207
Índice de Tablas	223

1. Introducción

1.1. Nanopartículas de oro

1.1.1. Importancia de las nanopartículas en la nanociencia

La nanociencia y nanotecnología son actualmente los campos más prolíficos y prometedores de la ciencia e industria. Sin embargo, a pesar de ser un campo de estudio tan moderno, los beneficios de la nanotecnología han estado presentes en todo el mundo desde hace ya bastantes siglos. Así por ejemplo, la tinta china (2000 a.C.) no es más que una dispersión coloidal de nanopartículas de carbono en una mezcla de agua y gelatina.¹ Otro curioso ejemplo es la copa de Licurgo (siglo IV d.C.), que presenta diferente color según la luz sea reflejada (verde) o transmitida desde el interior de la copa (rojo) debido a la presencia de nanopartículas de plata y oro en el cristal de la misma.² O así las famosas espadas de Damasco (siglo IX d.C.), cuyo filo era tan famoso como codiciado ya que podía atravesar armaduras y era considerado eterno, presentaban nanotubos de carbono.³

Una de las herramientas básicas de la nanociencia son las nanopartículas. Entendiendo nanopartícula (NP) como “cualquier partícula sólida que tiene al menos una dimensión en la nanoescala (de 1 a 100 nm), compuesta entre unos cien a unos miles de átomos”.⁴ El principal interés por las nanopartículas se debe a que las propiedades que presentan son intermedias a la de los átomos individuales y a la de su correspondiente estado macroscópico (*bulk*), además sus propiedades se rigen por las reglas de la mecánica cuántica por el tamaño que tienen. Por ejemplo, las nanopartículas de metales nobles (cobre, plata u oro) presentan colores totalmente diferentes a los de sus respectivos metales. Esta diferencia de propiedades hace a las NPs idóneas para la realización de complejas tareas como: rápida descomposición de agentes contaminantes, interacción selectiva y sensible con biomoléculas, mejora de la conversión de la luz en corriente eléctrica o almacenamiento de energía.⁵

Dada la ambigüedad de la definición de nanopartícula, existen múltiples formas para su clasificación. Sin embargo, el más habitual es clasificarlas por su composición química, ya que ésta afecta tanto a la estabilidad de la nanopartícula como a las propiedades ópticas y magnéticas.⁶ Según este criterio, se pueden distinguir en: metálicas, semiconductoras,

dieléctricas, poliméricas, de carbono y de biomoléculas. Aunque el abanico de posibilidades que existen es bastante amplio, las nanopartículas de metales nobles (y más concretamente las de oro) han sido las más explotadas ya que se pueden adaptar a múltiples aplicaciones.

1.1.2. Propiedades de las nanopartículas de oro

A pesar de las propiedades eléctricas, magnéticas y catalíticas que el oro coloidal (AuNP) presenta,⁷ son sus propiedades ópticas las que han provocado el interés por éstas, que combinadas con la facilidad química que tiene el oro para anclar diferentes grupos funcionales, han permitido el desarrollo de aplicaciones pioneras en el campo del bioanálisis y de la medicina.

1.1.2.1. Resonancia del Plasmón Superficial

La banda de absorción tan intensa que caracteriza a las nanopartículas de los metales nobles recibe el nombre de Banda de Plasmón Superficial (SPB) o banda de la Resonancia del Plasmón Superficial (banda SPR); ambos nombres se pueden encontrar en la bibliografía científica, aunque bien es cierto que en los últimos años existe una tendencia a unificar el nombre a banda SPR. El origen de dicha banda radica en la interacción de los campos electromagnéticos de la luz con los electrones de la banda de conducción que se encuentra en la superficie, produciéndose la oscilación de esta nube electrónica (véase Figura 1.1). El principal interés de la banda SPR es que sus propiedades (intensidad, posición y anchura) están fuertemente influenciadas por el material, el tamaño, la forma, la polaridad del entorno e incluso la distancia entre partículas, lo que ha dado origen a multitud de aplicaciones de las nanopartículas metálicas.

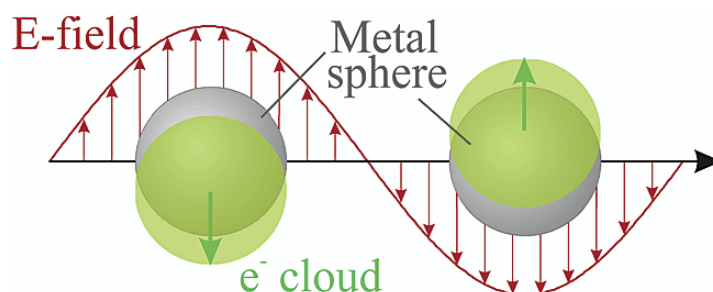


Figura 1.1. Oscilación de la nube electrónica de nanoesferas metálicas en presencia del campo eléctrico de un haz de luz incidente. Reimpreso con permiso de K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 668-677.⁸ Copyright 2003 American Chemical Society.

Así por ejemplo, las AuNPs presentan una banda de absorción en torno a 520 nm mientras que las de plata (AgNPs) la tienen sobre 410 nm. Pero a pesar de que las AgNPs son las que exhiben una banda más estrecha e intensa entre todos los metales,⁹ son las de oro las que han sido ampliamente estudiadas y utilizadas debido a su naturaleza inerte y biocompatibilidad,^{10,11} lo que hace a estas nanopartículas ser excelentes para aplicaciones biomédicas. Respecto al tamaño, ya Michael Faraday en 1857 postuló que el color de la dispersión depende del tamaño del coloide.¹² De hecho, conforme mayor es la nanopartícula a longitudes de onda mayores se encontrará la banda SPR,^{13,14} mientras que partículas inferiores a los 2 nm no exhiben dicha banda.¹⁵ Por otra parte, controlar la forma permite ajustar el espectro de absorción desde el visible hasta el IR,¹⁶ ya que se modifica la polarización de la nanopartícula. Un aumento en el número de lados conlleva un desplazamiento a longitudes de onda mayores mientras que un aumento de la simetría implica potenciar la intensidad.⁹ Por ello las nanopartículas no esféricas tienden a exhibir diversas bandas a longitudes de ondas mayores a las que presentan las NP esféricas. Esta versatilidad ha proliferado en la obtención de triángulos, cubos, prismas, nanorods o nanocorazas, entre algunos ejemplos. En cuanto a la polaridad del entorno, ésta influye en el campo electromagnético que siente la nanopartícula como queda reflejado en la ley de Coulomb a través de la permitividad del medio: cuanto más hidrofóbico sea el disolvente, a mayor longitud de onda se encontrará la banda SPR.¹⁷ Dado que las nanopartículas en disolución no suelen estar desnudas (este aspecto se desarrollará más adelante en el apartado 1.1.2.3), se esperaría que la polaridad del agente protector que cubre la superficie de la molécula afecte a la banda SPR; sin embargo se ha comprobado experimentalmente que la influencia es casi despreciable.¹⁴ Más interesante resulta el efecto que ejerce el ligando, ya sea el que forma la capa protectora de la nanopartícula o un agente interaccionante externo, si provoca cambios según sea donador o aceptor de electrones. Dado a que la banda SPR es un efecto de la oscilación de la nube electrónica, la densidad electrónica que la compone juega un papel fundamental; de manera que una adición de electrones produce un desplazamiento de la banda SPR a longitudes de onda menores mientras la sustracción de electrones conlleva desplazamientos a longitudes de onda mayores.^{18,19} Por último, la influencia de la distancia entre partículas se debe al acoplamiento electromagnético que se provocan entre ellas, de manera que cuanto más cerca se encuentran éstas más complicado se vuelve el espectro de absorción (aparición de nuevas bandas) con desplazamientos de los espectros a mayores longitudes de onda.²⁰ De hecho dicho acoplamiento llega a ser efectivo cuando la distancia es inferior a 5 veces el radio de las partículas ($d \leq 5r$, donde d es la distancia entre partículas y r el radio de las mismas).²¹ Esta dependencia con la distancia de la banda SPR (y por lo tanto del color de la disolución coloidal) ha sido el pilar fundamental de gran parte de los sensores colorimétricos desarrollados con AuNPs.²²

1.1.2.2. Predicción del comportamiento de la banda SPR: teoría de Mie

El entender tanto la naturaleza como la dependencia de la banda SPR con los parámetros que definen a la nanopartícula y al entorno es posible a través de la teoría de Mie. En 1908, Gustav Mie aplicó las ecuaciones de Maxwell para la difracción de la luz por una esfera, estableciendo las condiciones de contorno apropiadas.²³ Dicha teoría atribuye la banda SPR de nanoesferas a oscilaciones de dipolos, los cuales son originados por la creación de carga en la superficie: zonas donde se concentre la nube electrónica genera puntos de carga negativa y su ausencia zonas de carga positiva.¹⁵ La solución obtenida por Mie no sólo ha permitido comprender la forma de la banda SPR, sino también la obtención de los espectros de absorción teóricos de las nanopartículas.

Las suposiciones de partida que estableció Mie para la resolución de las ecuaciones de Maxwell fueron clave, sin embargo también son las que establecen las limitaciones de la propia teoría. Las principales consideraciones son las siguientes:²⁰

- I. Las partículas son esferas perfectas. Las ecuaciones de Maxwell se pueden resolver para diferentes formas, pero obviamente la solución obtenida para cada forma es diferente. Prueba de ello es la teoría de Gans, que no es más que una extensión de la teoría de Mie para partículas que se desvían de formas esféricas (como los nanorods).^{24,25}
- II. La partícula se encuentra aislada, en ausencia de otras partículas análogas a éstas, de manera que en su entorno cercano sólo se encuentran las moléculas de disolvente. Por ello, con la teoría de Mie se obtiene la sección eficaz de extinción de una esfera (σ_{ext}). El motivo de este supuesto radica en que si las partículas se encuentran próximas, los campos electromagnéticos que generan sus propias nubes electrónicas afectarían a las partículas vecinas aumentando la complejidad del sistema.
- III. La partícula y el entorno son homogéneos de por sí y pueden describirse por las correspondientes funciones ópticas dieléctricas del material en forma macroscópica (*bulk*). En el caso del medio envolvente, dicho parámetro se puede considerar independiente de la velocidad angular de la radiación electromagnética incidente ($\epsilon_m \neq f(\omega)$) y por lo tanto, constante; sin embargo, en el caso de la partícula metálica, la función presenta una componente real y otra imaginaria, las cuales dependen de la velocidad angular del campo electromagnético:

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega) \quad 1.1$$

Para expresar dicha función en parámetros conocidos, es necesario el modelo de Drude, el cual describe el movimiento de electrones libres en un metal.^{2,20}

- IV. El tamaño de la partícula es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente ($\lambda \gg 2r$), así todos los electrones confinados en la nanopartícula sienten el mismo campo eléctrico en un instante determinado t (aproximación cuasiestática).¹⁵ De esta forma se origina el dipolo mencionado en el apartado anterior (véase Figura 1.2).

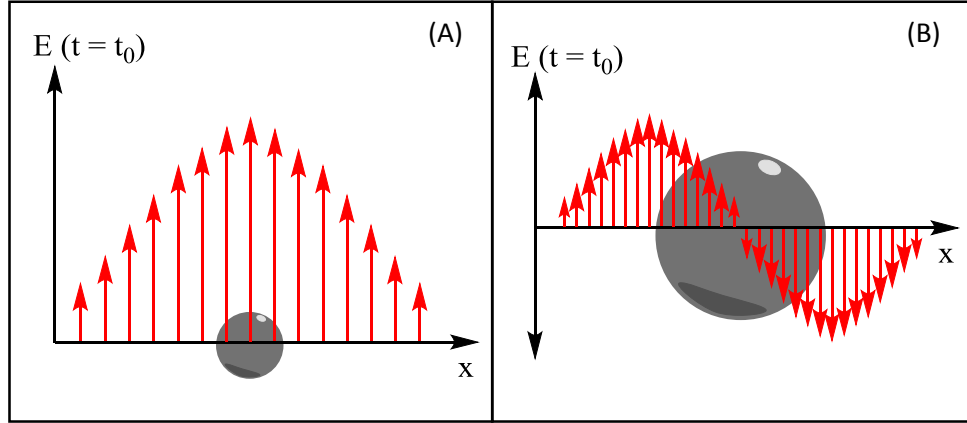


Figura 1.2. Influencia del tamaño de la nanopartícula en el campo eléctrico sentido por la nube electrónica, donde E representa la componente del campo eléctrico y x la dirección de propagación de la luz. Cuando la nanopartícula es mucho más pequeña que la longitud de onda de la luz incidente ($\lambda \gg 2r$), se puede considerar que en cualquier punto de la nube electrónica el campo electromagnético es el mismo, formándose un dipolo (A). Sin embargo, cuando la nanopartícula no es lo suficientemente pequeña el campo no es homogéneo, originándose múltiples dipolos en lugar de un único dipolo.

A partir de las aproximaciones antes mencionadas, la teoría de Mie se puede reducir a la siguiente ecuación:^{20,26}

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{3/2} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + [\epsilon_2(\omega)]^2} \quad 1.2$$

donde σ_{ext} es la sección eficaz de extinción de la partícula, V es el volumen de la misma, c la velocidad de la luz, ϵ_m es la función óptica dieléctrica del medio, ϵ_1 es la parte real y ϵ_2 es la parte imaginaria de la función dieléctrica del metal que constituye a la partícula (véase ecuación 1.1). Si se tiene en cuenta la relación que existe entre la longitud de onda y la velocidad angular de la luz, así como la definición matemática del volumen de una esfera, se obtiene:

$$\sigma_{ext} = \frac{24\pi^2}{\lambda} r^3 \epsilon_m^{3/2} \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + [\epsilon_2(\omega)]^2} \quad 1.3$$

donde r es el radio de la partícula y λ es la longitud de onda de la luz incidente. Si el lector está interesado en profundizar más en el desarrollo de la ecuación 1.3, puede consultar la revisión

Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications (referencia 20).

Tanto la ecuación 1.2 como la 1.3, permite la justificación de las diferentes características que presenta la banda SPR según los parámetros que definen el sistema. Así por ejemplo, la posición del máximo viene determinada por la condición de resonancia $\epsilon_1 = -2\epsilon_m$ (frecuencia de Fröhlich),^{2,9} la cual depende del material con el que está hecha la partícula. En el caso de las nanopartículas de oro y plata, dicha condición se produce en el rango visible del espectro electromagnético. La influencia del tamaño en la intensidad es fácilmente visible en dicha ecuación, ya que dicho parámetro está incluido a través del radio. Sin embargo, no es tan intuitivo el apreciar su efecto en la posición y en el ancho de la banda ya que se debe a modificaciones de la función dieléctrica del metal, lo que implica también un cambio en el valor de la frecuencia de Fröhlich. También se puede explicar la influencia de la polaridad del disolvente donde se encuentra dispersa la nanopartícula, no sólo por la presencia de la constante dieléctrica del medio en la ecuación (ϵ_m) sino por ser determinante a la hora de establecer la condición de resonancia.¹⁷ Respecto a la influencia de la capacidad oxidativa o reductora del ligando que interacciona con la NP, la interpretación no es directa e incluye cierta complejidad, ya que modificar la densidad electrónica de la NP conlleva cambiar la función dieléctrica óptica de la misma. En cualquier caso, la teoría de Mie también encaja con los resultados experimentales.²

A pesar de explicar con bastante exactitud los distintos cambios que puede sufrir la banda SPR, la teoría de Mie no se puede aplicar a todos los casos ya que, como se indicó anteriormente, las propias condiciones establecen unas determinadas limitaciones:

- I. La premisa de que la partícula se encuentra aislada sólo es válida para disoluciones muy diluidas así como la teoría de Mie no se puede aplicar para complejos formados por varias nanopartículas así ni tampoco puede considerar el efecto del proceso de acercamiento entre éstas. Para describir estructuras más complejas se han de recurrir a métodos más modernos como la Aproximación del Dipolo Discreto (DDA) o el Método del Dominio de Tiempo de Diferencia Finita (FDRD).²⁰
- II. Las partículas no son esferas perfectas debido a las irregulares en la forma y defectos que suelen presentar las nanoesferas. No obstante existen modificaciones de la teoría de Mie que permiten corregir la desviación de la esfericidad como la ya mencionada teoría de Gans.^{24,25}
- III. El tamaño también limita bastante el empleo de la teoría de Mie. Por una parte, cuando las partículas son grandes, no se puede aplicar la aproximación de los dipolos (o del estado cuasiestático) ya que la componente electromagnética sería diferente según el

punto de la partícula, por no decir que la dispersión predominaría frente a la absorción (véase Figura 1.3). Por otra parte, conforme más pequeñas sean las nanopartículas más diferente será la función dieléctrica óptica de la correspondiente al *bulk* de dicho material, por ello no se puede aplicar a partículas muy pequeñas.

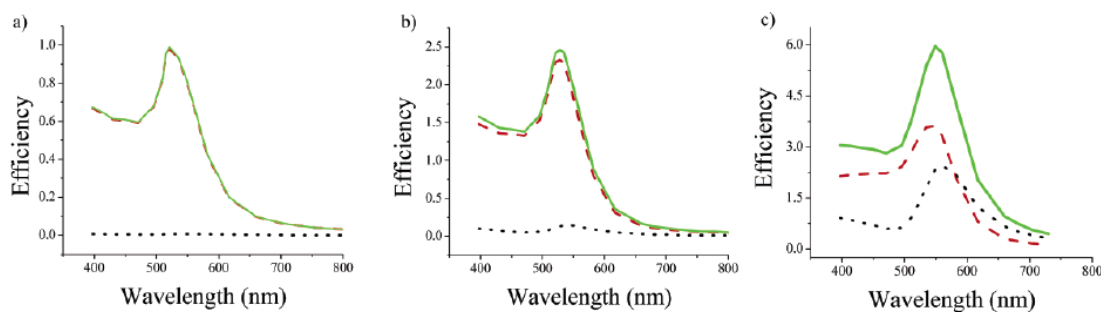


Figura 1.3. Influencia del tamaño de esferas de oro en las secciones eficaces de extinción (línea continua verde), absorción (línea discontinua roja) y dispersión (línea punteada negra). El espectro A corresponde a un diámetro de 20 nm, donde la dispersión es nula; el espectro B es de AuNPs de 40 nm, donde la dispersión influye levemente; el espectro C muestra una dispersión casi similar a la absorción cuando el tamaño es 80 nm. Reimpreso con permiso de P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 7238-7248.¹⁶ Copyright 2006 American Chemical Society.

A pesar de todos estos inconvenientes, la solución de Mie a las ecuaciones de Maxwell es la más empleada en los estudios teóricos de los cambios en la banda SPR, ya que permite obtener los espectros de absorción de las nanopartículas en un amplio rango de tamaños, materiales y disolventes con bastante fiabilidad.

En la subsección 3.5.2, correspondiente a los efectos provocados por alcoholes tetraédricos en fenómenos de agregación de AuNPs, se describe el uso de software específico basado en la ecuación de Mie para la simulación de los espectros de plasmones superficiales de las nanopartículas de oro.

1.1.2.3. Estabilidad de las nanopartículas

Las AuNPs presentan una tendencia natural a agregarse ya que las fuerzas de van der Waals que las diferentes nanopartículas se ejercen entre sí favorece el contacto de sus superficies provocando la fusión de sus núcleos. Desde un punto de vista cinético, la agregación viene dominada por la facilidad que tendrán las partículas para colisionar entre ellas, las cuales presentan movimientos brownianos. Esta inestabilidad inherente de los coloides hace que sea

necesaria la adsorción (o al menos la presencia) de moléculas estabilizadoras en la superficie como aminas, tioles, fosfinas, etc..., que muchas veces llevan implícita la propia funcionalización de la nanopartícula.⁷

Los tipos de estabilización se pueden clasificar en tres: electrostática, estérica o electroestérica (véase Figura 1.4).²² Cuando pequeñas moléculas cargadas cubren la superficie de la NP se produce una estabilización electrostática, ya que las repulsiones originadas por las cargas de mismo signo mantienen a las partículas alejadas. Ésta es la estabilización más común, donde normalmente son moléculas de citrato las que se colocan en la superficie confiriéndole carga negativa.²⁷ Sin embargo, si es una molécula voluminosa pero sin carga (como un polímero) lo que cubre la superficie, el impedimento estérico que generan las moléculas poliméricas hace que los núcleos del coloide no puedan llegar a estar en contacto previniendo así la agregación (estabilización estérica). Algunos ejemplos de moléculas que ejercen este tipo de estabilización son el poli(etilenglicol) (PEG) o los dendrímeros.^{28,29} Si se tratara de un polielectrolito, la estabilización sería una combinación de las dos antes citada; el ADN es la molécula por excelencia para estabilizar electroestéricamente.^{30,31}

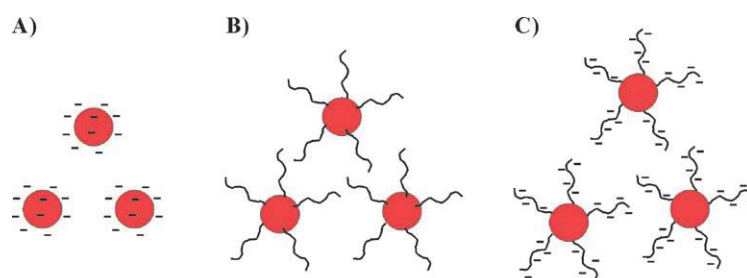


Figura 1.4. Diferentes tipos de estabilización de nanopartículas: a) estabilización electrostática a partir de moléculas cargadas; b) estabilización estérica a partir de la funcionalización de la NP con polímeros o macromoléculas; c) estabilización electroestérica a partir de la funcionalización de la NP con polielectrolitos. Reimpreso con permiso de W. Zhao, M. A. Brook, Y. Li, *ChemBioChem*, 2009, **9**, 2363-2371.²² Copyright 2008 John Wiley and Sons.

Una variación en las condiciones del medio, como un cambio en la polaridad del disolvente o de la fuerza iónica, o la introducción de un reactivo puede provocar la agregación del coloide. Este control de la aglomeración es el pilar de los múltiples sensores desarrollados con AuNPs. Según el mecanismo, se puede distinguir entre agregación por entrecruzamiento de partículas o agregación de no cruzamiento.²² La agregación de entrecruzamiento hace alusión cuando un reactivo con múltiples sitios de unión interacciona con las moléculas que cubren la NP, de manera que dicho reactivo hace de nexo para los diferentes clusters; aunque también se aplica este término cuando un grupo de NPs presenta en su superficie moléculas receptoras y el

otro grupo presenta la molécula que interacciona o molécula complementaria. Por otra parte, la agregación sin cruzamiento consiste en la destrucción de la estabilidad, es decir, a modo de ejemplo, en el caso de la estabilización electrostática, consistiría en el apantallamiento de las cargas o de la expulsión de la superficie de las moléculas cargadas; según la teoría Derjaguin-Landau-Vervey-Overbeek (DLVO), no es necesaria la pérdida total de la carga superficial, sino la suficiente cantidad para que las fuerzas de van der Waals superen la repulsión electrostática.³² En el caso de los polímeros, el desplazamiento de estos o la adición de algún agente que provoque la rotura o un cambio estructural puede inducir a la agregación. Es importante resaltar que la agregación inducida sin entrecruzamiento es más rápida que por entrecruzamiento, debido a los mecanismos por lo que tiene lugar la agregación. En la agregación de entrecruzamiento la cinética está dominada principalmente por las colisiones aleatorias entre partículas, las cuales dependen de un movimiento browniano lento, mientras que la agregación de no entrecruzamiento está dominada por las fuerzas atractivas de Van der Waals, las cuáles se ejercen desde una determinada distancia.²⁰

1.1.3. Interés científico y tecnológico de las AuNPs

Actualmente, las AuNPs presentan prometedoras aplicaciones en diversos campos. Así por ejemplo, la facilidad de controlar la posición de la banda SPR ha permitido la destrucción selectiva de tejidos cancerígenos en vivo sin necesidad de biopsias invasivas, cirugía, quimioterapia o radioterapia: se fijan las AuNPs en las células tumorales y estas partículas absorben radiación con ciertas longitudes de ondas del rango IR, lo que provoca un sobrecalentamiento de la AuNP que destruye la célula maligna sin afectar a la sana.^{33,34} Para ello es necesario AuNPs con baja dispersión pero con una alta absorción en el NIR.¹⁶ También resultan potencialmente útiles en el campo de la biología y medicina para la obtención de bioimágenes así como para la liberación controlada de fármacos.³⁵⁻³⁷

Otra de las metas es la optimización de materiales por inclusión de NPs en éstos. Por ejemplo, existe un gran interés en adsorber AuNPs en la pared lateral de los nanotubos de carbono ya que el nanocompuesto obtenido muestra prometedoras propiedades para el diseño de celdas fotoelectroquímicas, celdas de combustible o incluso sensores.³⁸ O en el caso de la obtención de híbridos de grafeno con AuNPs, el nanoconjugado presentaría las propiedades físicas del grafeno con las ventajas del oro coloidal, lo que podría potenciar la absorción de la luz.³⁹

No obstante, la aplicación más desarrollada de las AuNPs es la de su empleo como biosensor colorimétrico, la cual surge de la combinación de la banda SPR con la tendencia a la

agregación de las AuNPs. Las NPs son funcionalizadas con biomoléculas que interactúan con el analito a detectar (aunque muchas veces no es necesaria la funcionalización), lo que provoca la agregación del coloide cuando la molécula a detectar se halla en disolución, produciéndose un desplazamiento de la posición de la banda SPR. Dicho cambio en la longitud de onda se puede detectar a ojo sin necesidad de equipos sofisticados debido al cambio de color que sufre la solución coloidal (normalmente de rojo a azul, o viceversa si se parte de nanopartículas agregadas). Con dichas estrategias ha sido posible detectar desde simples cationes, como el Hg (II),⁴⁰ hasta complejas biomoléculas, como el antibiótico kanamicina.⁴¹ Sin embargo, las aplicaciones más interesantes son las que están relacionadas con el ADN dando lugar a que el número de trabajos sobre los sistemas ADN-AuNPs haya crecido exponencialmente cada año.⁴²

1.2. El ácido desoxirribonucleico como biopolímero

Desde un punto de vista sencillamente químico, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero de origen natural formado por cuatro tipos de monómeros (nucleótidos). Este monómero está constituido por tres subunidades diferentes: una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina), una pentosa (2-desoxiribosa) y un grupo fosfato (véase Figura 1.5).

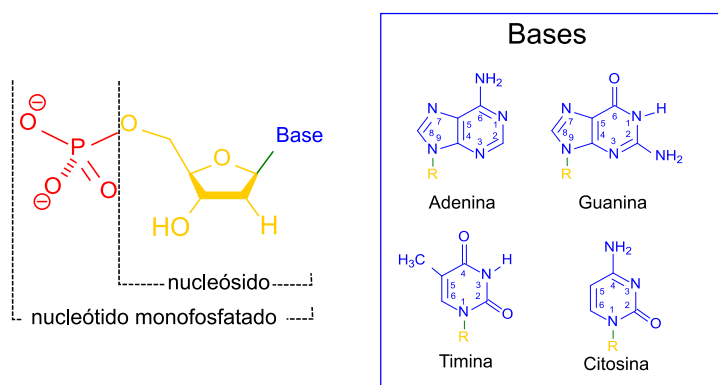


Figura 1.5. Esquema de la unidad básica del ADN y de la estructura de las cuatro bases. La diferencia entre nucleósido y nucleótido yace en la ausencia o presencia del grupo fosfato respectivamente.

Muchas de las propiedades del ADN provienen de sus unidades constituyentes, sin embargo, otras las adquiere al constituirse la macromolécula. Por ello es importante conocer las propiedades que le son adquiridas por los monómeros y las que presenta en su forma polimérica.

1.2.1. Propiedades de las unidades monoméricas

Entre sus propiedades físicoquímicas, las que tienen una fuerte influencia en las interacciones entre moléculas son:

- 1) Carga: debido a los grupos funcionales que presentan las bases (aminos e iminos), el pH ejerce una gran influencia en la carga del monómero. Así, a pH neutro las bases (y por lo tanto, los nucleósidos) carecen de carga, mientras que la protonación ocurre a un pH inferior a 4 y la desprotonación tiene lugar a un pH superior a 9 (véase Figura 1.6).⁴³ Sin embargo, en el caso de los nucleótidos la primera pérdida de protón se produce a un pH de 1 y la segunda a 7.⁴⁴ La carga del monómero es de gran importancia debido a que determina las posibles estructuras tautoméricas, su habilidad para formar enlaces de hidrógenos e incluso sus propiedades espectroscópicas.

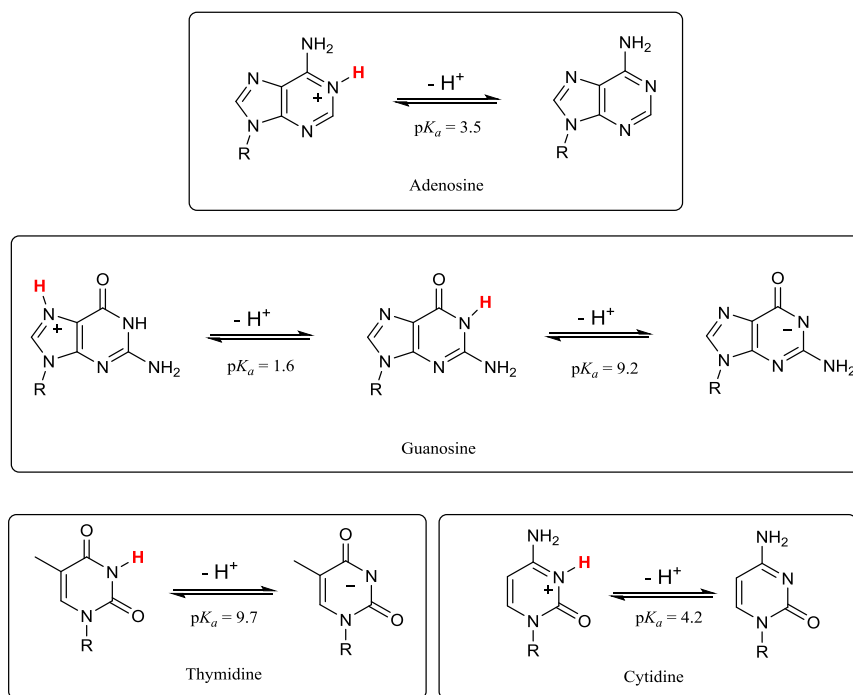


Figura 1.6. Procesos de desprotonación para los cuatro nucleósidos. Los valores de pK_a son a una temperatura de 25 °C y a una fuerza iónica de 0.1.⁴³ El hidrógeno marcado en rojo es el que se intercambia.

- 2) Hidrofobicidad. Dado a que las bases son compuestos aromáticos, presentan una gran hidrofobicidad y son relativamente insolubles en agua. Sin embargo, la generación de carga en las bases modificando el pH les confiere un aumento de la solubilidad. Además, la presencia de un azúcar le confiere un carácter más hidrofílico a los nucleósidos,

mientras el grupo fosfato de los nucleótidos lo hace ser bastante soluble. De hecho esta polarización de la hidrofobicidad en el monómero es la que le confiere a la molécula de ADN su estructura.

- 3) Propiedades espectroscópicas. La resonancia entre los átomos del anillo hace que los enlaces tengan parcialmente características de doble enlace, por ello las cuatro bases absorben luz en la región UV (260-270 nm aproximadamente) con un coeficiente de absorción del orden de $10000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; la presencia de la ribosa y del fosfato provocan ligeros desplazamientos en la longitud de onda donde se encuentra el máximo pero incrementa el coeficiente de absorción.⁴⁵ Estos datos se reflejan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Longitudes de ondas y coeficientes de absorción para los diferentes constituyentes del ADN

Compuesto	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Adenina	260.5	13400
Adenosina	260.0	14900
5'-AMP	259.0	15400
Citosina	267.0	6100
Citidina	271.0	8300
5'-CMP	271.0	9100
Guanina	276.0	8150
Guanosina	253.0	13600
5'-GMP	252.0	13700
Timina	264.5	7900
2'-Desoxitimidina	267.0	9700
(d)TMP	267.0	9600

Esta es la razón por la que la propia molécula del ADN presenta absorción en la región UV. Por otra parte, los nucleótidos presentan una fluorescencia muy débil a pH neutro (el rango de su rendimiento cuántico es desde $3 \cdot 10^{-5}$ a $1.2 \cdot 10^{-4}$, y ~~la~~ el tiempo de vida está en el rango de los picosegundos).⁴³ Sin embargo, en condiciones extremas de pH, sus propiedades de fluorescencia aumentan.^{46,47}

- 4) Capacidad de unión. Debido a la presencia de los grupos carbonilos y aminos, las bases del ADN tienen una gran tendencia a formar quelatos con distintos metales.⁴⁸ Es más,

como cada base presenta grupos donadores y aceptores de electrones para la formación de los puentes de hidrógeno, si no hay restricciones originadas por la geometría de la interacción cada base puede unirse con otra base (ya sea de la misma o diferente naturaleza) o con cualquier molécula que presente grupos aceptores o donadores.⁴³

Aunque se podría pensar que la aportación que realizan los monómeros en cuanto a propiedades es leve para el ADN, no es el caso. La hidrofobicidad de las bases hace que tengan que encontrarse en el interior de la estructura, quedando al exterior los grupos fosfatos que son más hidrofílicos. Que dichos grupos estén en el exterior hace que el ADN sea un polielectrolito de carga negativa ($-2n$, donde n es el grupo de pares de bases), a no ser que se encuentre en un medio extremadamente ácido. La tendencia a la formación de quelatos que presenta el ADN puede conducir incluso a la apertura de la tan estable doble hélice.⁴⁹ Las propiedades espectroscópicas que presenta el ADN provienen de las bases que lo forman, así su capacidad de absorción permite la cuantificación del mismo e incluso la determinación de si la estructura de doble hélice se encuentra total o parcialmente abierta.⁴⁵ Por otro lado, el hecho de que presente una insignificante fluorescencia hace que se puedan estudiar procesos de intercalación ya que la emisión de diversas moléculas se potencian cuando se posicionan entre las bases del ADN.⁴⁹

1.2.2. Influencia de la longitud y secuencia de la cadena en las propiedades del ADN

De todas las propiedades que presenta el ADN, las más influyentes para que tenga lugar una interacción con las AuNPs son su estabilidad y la rigidez del polímero. Sin embargo, éstas dependen en gran medida del tamaño y de la secuencia del ADN:

- 1) Estabilidad (térmica) de la cadena. La desnaturalización del ADN es el proceso de separar las dos hebras de la molécula del ADN en dos cadenas sencillas. Esto conlleva tanto a la pérdida de las interacciones por apilamiento de las bases como a la rotura de los puentes de hidrógenos. De hecho la estructura es más estable, y por lo tanto más difícil de desnaturar, conforme mayor es la proporción de las pares G-C debido a que estos presentan tres puentes de hidrógeno (frente a los dos que presenta la pareja A-T).^{52,53} De igual manera influye la longitud del ADN, ya que cuanto más pares de bases presente la molécula, y por lo tanto más enlaces de hidrógeno, mayor tendrá que ser la cantidad de energía a aportar para superar la estabilidad de la macroestructura y producir la apertura de la doble hélice.
- 2) Rigidez. Los polinucleótidos no son totalmente flexibles. La *longitud de persistencia* (P) es la medida de la rigidez de un polímero, y como tal el ADN viene caracterizado

por un valor de P .⁴⁹ Aunque hay varias formas de definir la *longitud de persistencia*, el modelo más aceptado es el que considera al polímero como una cadena similar a un gusano donde P sería el promedio de las longitudes que no cambian de orientación (véase la figura 1.7):⁵² un valor alto de P implica gran rigidez mientras valores bajos denotan flexibilidad. Las interacciones de apilamiento de bases aumentan la rigidez de los polinucleótidos, de manera que la poliA presenta una *longitud de persistencia* mucho mayor que la poliT.^{54,55} Las repulsiones entre grupos fosfatos vecinos provoca rigidez, así que la neutralización de las cargas confieren una mayor flexibilidad al ADN (disminución de P).⁵⁶ También la longitud repercute en este parámetro, de manera que los oligonucleótidos presentan mayor rigidez respecto a fragmentos de ADN de cadena larga, sobre todo si su longitud se encuentra muy por debajo de P .⁵² Obviamente, que el ADN se encuentre en su forma de doble hélice también influye, ya que esta estructura es mucho más rígida que una cadena simple del mismo ADN; de hecho, para el dsDNA se estima $P_{\text{dsDNA}} \approx 500 \text{ \AA}$ mientras que para el ssDNA oscila entre 7.5 y 85 \AA (según la fuerza iónica).⁵²

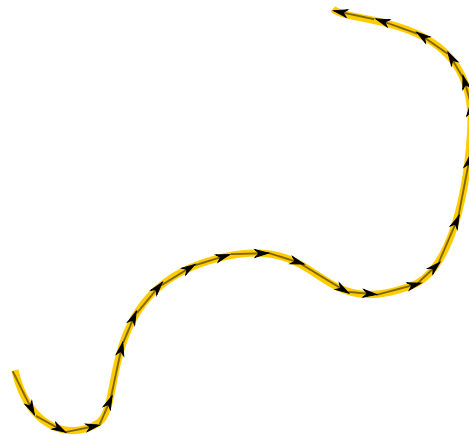


Figura 1.7. Representación esquemática de la descomposición de un polímero con conformación extendida aleatoria (línea gruesa amarilla) en vectores cuya dirección es constante. La longitud de persistencia sería el promedio de los módulos de estos vectores.

1.2.3. Conformaciones del ADN

La estructura del ADN más conocida es la descubierta por James D. Watson y Francis Crick, la cual consiste en dos cadenas complementarias formadas por nucleótidos que se asocian enrollándose alrededor de un mismo eje de forma antiparalela, resultando una doble hélice dextrógira.⁵⁷ En el exterior de la estructura helicoidal hay unos espacios entre los giros de los

grupos fosfatos, los cuales son denominados surcos, distinguiéndose según su tamaño entre surco menor y surco mayor. Debido al gran carácter hidrofílico de los grupos fosfatos y, por otra parte, al gran carácter hidrofóbico de las bases, éstas últimas se disponen en el interior del biopolímero mientras los grupos fosfatos quedan expuestos al exterior. El carácter plano de las bases y su disposición da lugar a la interacción de apilamiento de bases, que implica interacciones de van der Waals y dipolo-dipolo entre ellas.⁵² Además las bases de cada monómero interaccionan con la base de la cadena complementaria que se encuentra en el mismo plano mediante de puentes de hidrógeno. Estos son los dos modos de interacción que presentan las bases dentro del ADN y que le confieren gran estabilidad a la estructura de doble hélice.

Sin embargo, no es la única estructura posible debido a la extraordinaria versatilidad del ADN; existen diversas formas según las condiciones del medio, como pueden ser la fuerza iónica, el disolvente, la temperatura o incluso la propia secuencia del biopolímero. Aunque la forma B es la más estable (que fue la descrita por Watson y Crick), hay otras dos estructuras que han sido bien caracterizadas y serían posibles en la naturaleza: la forma A y la forma Z.

La forma nativa del ADN es la B (ADN-B). Ésta es la estructura más estable que puede adoptar un ADN de secuencia aleatoria en condiciones fisiológicas.⁵³ El diámetro de esta hélice dextrógira es de unos 20 Å, con una periodicidad de 10.5 pares de bases. La distancia entre las bases es de 3.4 Å, lo que significa que 36 Å es la longitud recorrida en una periodicidad.⁵² La forma A consiste en una doble hélice dextrógira pero más gruesa (26 Å), donde el número de pares de bases por vuelta es algo mayor que la forma B (11 respecto a 10.5). Estos cambios estructurales hacen que el surco mayor sea más profundo y estrecho, mientras que el surco menor es más superficial respecto a la forma B.⁵³ Por ello, la forma A y B tienen distintos patrones de unión con los cationes y las moléculas de agua, lo que afecta a la estabilidad de estas estructuras. Mientras que la forma B es estable en un amplio rango de condiciones, la forma A se observa en sistemas hidrofóbicos o donde se produce una deshidratación del ADN.⁵⁸ Aunque no se ha probado que el ADN-A tenga lugar *in vivo*, es conocido que el ARN y el híbrido ADN-ARN asume una hélice más próxima a la conformación A que a la B.⁵²

Por su parte, la forma Z es una hélice levógira más estrecha (18 Å). Esta forma tiene un par de bases más por giro y la distancia entre pares es de 3.8 Å, siendo además las bases desplazadas a la periferia de la hélice. La conformación del nucleótido depende del tipo de base: para las purinas es *anti* mientras para las piridiminas es *syn*, alternándose estas conformaciones dentro de la estructura; por esta razón la forma Z es favorecida para ADN con secuencias que alternan parejas G-C y A-T.^{52,58} Las interacciones electrostáticas también son cruciales para la formación de la forma Z ya que como algunos grupos fosfatos están muy cercas (provocando

repulsiones entre sí) las altas concentraciones de sales o la presencia de cationes polivalentes estabilizan la estructura. La tabla 1.2 resume algunas características de las tres estructuras.

Otras estructuras pueden estar presentes, dependiendo de las características de la secuencia y de los elementos de simetría. Algunos ejemplos de éstas son el C-ADN, los cruciformes, las triplete intramoleculares, el ADN cuádruplex, estructuras desemparejadas o las horquillas.^{53,58}

Tabla 1.2. Resumen de algunas propiedades de las formas A, B y Z del ADN.

	Forma A	Forma B	Forma Z
Sentido de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Diámetro	~ 26 Å	~ 20 Å	~ 18 Å
Pares de bases por vuelta de hélice	11	10.5	11.6
Distancia entre pares de bases	2.6 Å	3.4 Å	3.8 Å
Inclinación de las bases	20°	6°	7°
Conformación del enlace glucosídico	<i>Anti</i>	<i>Anti</i>	<i>Anti</i> → dA, dG <i>Syn</i> → dT, dC
Densidad de carga	0.77 e ⁻ / Å	0.59 e ⁻ / Å	0.54 e ⁻ / Å
Estable en	Medios deshidratados	Amplio rango Condiciones fisiológicas	Altas concentraciones de sales Cationes polivalentes

1.3. Interacción del ADN con nanopartículas de oro

1.3.1. Interacciones entre monómeros del ADN y nanopartículas de oro

El estudio de las interacciones entre los monómeros del ADN y las AuNPs es de gran importancia ya que la naturaleza y la fuerza de la adsorción del ADN en la superficie del oro depende de la secuencia.⁵⁹⁻⁶¹ Aunque existe una extensa bibliografía sobre la adsorción de bases, nucleósidos y nucleótidos en diferentes superficies de metales como oro⁶²⁻⁶⁶ o plata^{67,68}, en el

caso de nanopartículas los estudios son mucho más escasos. De hecho, diversos autores extrapolan los resultados de estos sistemas metálicos a las nanopartículas, considerando que la lámina del metal en cuestión es la superficie de una nanopartícula gigante (con un radio que tiende a infinito). Uno de los estudios más completos sobre cómo interaccionan las bases del ADN con las AuNPs es el realizado por el investigador Nak Han Jang.⁶⁹ Aunque este estudio sólo implica nucleósidos, trabajos posteriores han demostrado que también los monómeros del ADN interaccionan por la base.⁷⁰ La Figura 1.8 muestra la forma de interaccionar de las bases con AuNPs, figura propuesta por Jang y a la cual sólo se le ha realizado una leve modificación en la guanina.⁷⁰

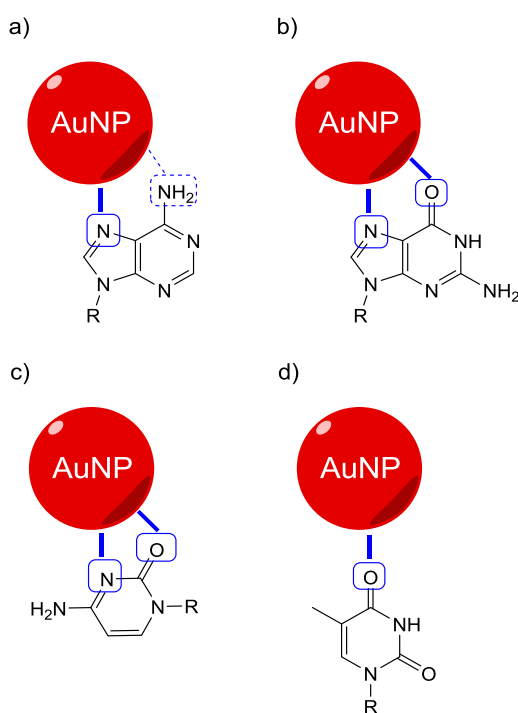


Figura 1.8. Estructuras propuestas para la interacción de las AuNP con: a) adenina, dA, dAMP;⁶⁹ b) guanina, dG, dGMP;⁷⁰ c) citosina, dC, dCMP;⁶⁹ d) timina, dT, dTMP.⁶⁹ Las líneas sólidas representan la interacción principal, mientras las líneas no continuas señalan una débil contribución.

El primer estudio sobre la afinidad de la interacción de monómeros con AuNPs fue realizado en 2002 por Robert L. Letsinger, Chad A. Mirkin y colaboradores, donde determinaron cualitativamente la afinidad de adsorción de los desoxinucleósidos del ADN en la superficie de las AuNPs, tomando como referencia la posición de la banda SPR al producirse la agregación de éstas inducidas por la presencia del monómero.⁶⁰ El orden obtenido fue: dC > dG > dA, donde para la dT no se produjo ningún cambio en la banda SPR a no ser que la concentración se aumentara 20 veces más respecto al resto de monómeros. Dicho orden también

se ha observado en la interacción de las nucleobases con AuNPs e incluso con AgNPs.^{71,72} Sin embargo, Jun Yang y colaboradores obtuvieron un orden diferente para los nucleótidos: dA > dG > dC > dT.⁴⁹ Si bien es cierto que tanto las condiciones experimentales como la metodología empleada han sido bastante diferentes, lo cual puede justificar estas diferencias. En lo que todos los autores coinciden es que la timina es la base con menor afinidad para interactuar con las AuNPs.

1.3.2. Interacciones entre oligonucleótidos y nanopartículas de oro

La mayoría de trabajos publicados sobre sistemas ADN-NPs hace alusión a oligonucleótidos. La preferencia por cadenas cortas de ADN (entre 10 y 100 monómeros por pares de base) es debida a su gran versatilidad como sonda de ADN, ARN, proteínas y otras biomoléculas de potencial utilidad.^{48,73} El interés aumentó considerablemente con la publicación de dos trabajos en un número de la revista Nature del año 1996, uno por el grupo de Letsinger y Mirkin y otro por el grupo de A. Paul Alivisatos,^{30,31} donde describían la funcionalización de AuNPs con oligonucleótidos tiolizados. La presencia de un grupo tiol en la terminación de un oligonucleótido permite su anclaje en la superficie de la AuNP a través de un enlace covalente. Las moléculas adsorbidas apenas presentan diferencias termodinámicas para el proceso de hibridación respecto a las que se encontrarían en disolución.⁷⁴ Dada la naturaleza covalente del enlace Au-S, se produce una clara preferencia por la formación de estos enlaces, por ello es más probable que las moléculas tiolizadas vayan a la superficie respecto a las no tiolizadas e incluso la pérdida de interacciones no específicas para permitir la creación de más enlaces S-Au.^{75,76} De gran importancia para el desarrollo de biosensores también fueron los estudios realizados por los investigadores Huixiang Li y Lewis J. Rothberg sobre la detección de oligos de ADN con AuNPs sin funcionalizar.^{77,78} Para ello tomaron como punto de partida la diferente capacidad que tiene una cadena de ADN simple para interactuar con AuNPs aniónicas en comparación con ADN de doble cadena. Muchos de los biosensores que se han desarrollado con AuNPs se inspiran en los trabajos desarrollados por Li y Rothberg.

1.3.2.1. Interacciones de ADN de cadena sencilla con nanopartículas de oro

La mayoría de estudios implican oligonucleótidos de cadena simple que son unidos a la nanopartícula vía tiol y estando disponibles para que el proceso de hibridación pueda tener lugar. Sin embargo, independientemente de si la moléculas se encuentran ancladas o no, las bases tienden a interactuar no covalentemente (interacciones no específicas) con la superficie del

oro,⁶⁰ y por lo tanto el complejo resultante es más estable a la agregación inducida por sal ya que se produce un aumento de la carga negativa neta.⁷⁷⁻⁷⁹

Diversos modelos se han sugerido para el mecanismo de la adsorción, aunque diferentes hechos experimentales hacen que no se haya podido establecer uno con certeza. Uno de los primeros se basaba en la formación de dipolos por parte de los grupos fosfatos de la cadena y de los citratos con sus respectivos contraiones,⁷⁸ por lo que la interacción entre ellos estabilizaría el sistema. Sin embargo este planteamiento cae de por sí ya que el ADN de doble cadena no se adsorbe a la superficie de las AuNPs a pesar de que también puede formar dipolos con los cationes que se encuentran a su alrededor, por lo que se propuso un modelo basado en la hidrofobicidad.⁸⁰ Un modelo más actual propone un mecanismo cuyo fundamento radica en la mera estabilización obtenida por las interacciones entre las nucleobases y la AuNP.⁷⁶ Según este modelo, el ADN necesita aproximarse a la partícula para desplazar moléculas de citrato de la superficie y así poder adsorberse. Una vez adsorbido, el ADN puede cambiar su conformación para maximizar sus puntos de contacto con la superficie. Entonces las moléculas de ADN crean una zona de exclusión donde otras moléculas del biopolímero no pueden acercarse. Este proceso tendrá lugar hasta que se produzca la saturación de la superficie.

Como se mencionó en la subsección 1.3.1, los monómeros que forman el oligonucleótido tienen diferentes afinidades para interactuar con la AuNP.^{49,60,71} Obviamente estas interacciones influirán tanto en la forma en que el ssADN se extenderá sobre la superficie así como en la intensidad de la adsorción, que dependerá de los puntos de contactos. Conforme el número de bases con alta afinidad por el oro crece, mayor tendencia a pegarse a la superficie presentará la cadena, mientras que si crece la proporción de bases con baja afinidad, la cadena tenderá a encontrarse separada de la superficie permitiendo un mayor número de moléculas por NP. Esto se observa en la poli-T, donde hay una gran densidad de oligonucleótidos por NP en comparación con la poli-A o poli-C.⁶⁰ Esta habilidad para adsorberse de diferentes formas al complejo AuNP-ssDNA le confiere una gran versatilidad, ya que el control tanto de las diferentes afinidades así como de sus posiciones en la cadena permite obtener diferentes conformaciones del ADN adsorbido (véase Figura 1.9).⁸¹ Es muy importante tener en cuenta esta situación para el diseño de los trabajos experimentales, ya que los resultados variarán según la forma en que esté adsorbida la cadena.⁸² La longitud del oligonucleótido también afecta a la interacción ya que el proceso de adsorción es más rápido conforme más corto es el oligonucleótido. Esto es debido a que cadenas cortas requieren la formación de menos puntos de contactos por molécula, aunque bien es cierto que más estable es la interacción cuanto más punto de contactos se producen.^{76,78,83}

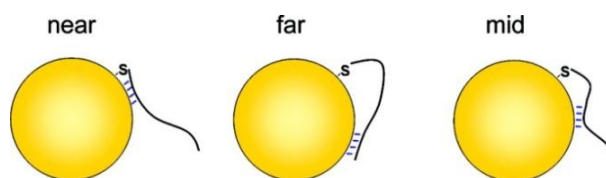


Figura 1.9. Conformaciones adquiridas por oligonucleótidos adsorbidos a la superficie de una AuNP según donde se encuentren los monómeros con alta afinidad de interacción. Reimpreso con permiso de K. A. Brown, S. Park, K. Hamad-Schifferly, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 7517-7521.⁸¹ Copyright 2008 American Chemical Society.

Obviamente, la *longitud de persistencia* (dependiente a su vez tanto de la composición de la cadena como de su longitud) también influye en la interacción. De por sí, la interacción del ADN con la NP ya provoca una curvatura en la estructura del biopolímero.⁸⁴ Esto significa que cuanto más flexible sea la cadena más fácil será que se adapte a la curvatura de la NP para aumentar el número de puntos de contactos (Figura 1.10). Es este efecto de la curvatura el que hace que la superficie de las AuNPs sea diferente a las superficies planas de oro, donde no existe curvatura alguna. La gran influencia de la curvatura queda totalmente patente cuando se comparan las interacciones de distintos oligonucleótidos homogéneos con AuNPs de 5 nm, donde la adsorción del poli-T es similar a la del poli-A y poli C y es mayor que la del poli-G,⁴⁹ tendencia totalmente opuesta a la observada en nanopartículas de mayor tamaño.⁶⁰ El hecho de que el poli-T sea más flexible que el poli-A podría justificar dicho orden de interacción. Además, gracias a la curvatura que presentan las AuNPs de 5 nm, el complejo que se forma es muy estable (por encima de los 110 °C) e inmune a la hibridación.⁸⁵

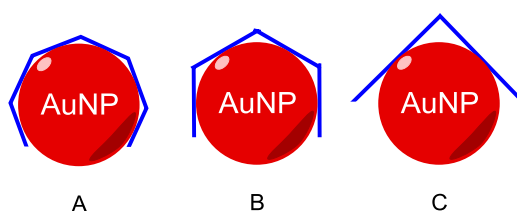


Figura 1.10. Interacción de oligonucleótidos de diferente rigidez con AuNPs. A) se corresponde con ADN muy flexible (baja *P*), B) sería una situación intermedia, mientras que C) sería una molécula muy rígida (con una alta *P*). La molécula más flexible es la que presenta mayor puntos de contacto y por lo tanto es la que forma el complejo más estable. Reimpreso con permiso de J. Yang, B. Pong, J. Y. Lee, H. Too, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 824-830.⁴⁹ Copyright 2008 Elsevier.

Es importante resaltar que la adsorción del ADN de una sola cadena es sensible a la fuerza iónica y al pH. El principal efecto de la adición de cualquier sal es el apantallamiento de las cargas negativas tanto de los citratos adsorbidos en la superficie de las AuNPs como de los

grupos fosfatos del ADN, que conlleva a una disminución de la longitud de persistencia.⁵⁶ Por lo tanto, puede debilitar las interacciones no específicas provocando la desorción, debido a que el ADN se compactaría haciendo a las bases menos accesibles para interactuar con el oro.⁷⁶ El pH por su parte afecta a las cargas de las moléculas de citrato y grupos fosfato. A pH bajo la agregación tiene lugar, pudiendo ser revertida aumentando el pH del medio, aunque conforme se aumenta el número de ciclos más se degrada el ADN.⁷⁹ Que sea reversible la agregación se debe a que la neutralización de los fosfatos permite que los complejos se aproximen entre sí, efecto que se pierde si la cadena fosfatada del ADN adquiere su carga, manteniendo a los complejos separados por repulsiones electrostáticas.

1.3.2.2. Interacciones de ADN de doble cadena con AuNPs

Debido a que el ADN de doble cadena presenta una mayor rigidez que las cadenas sencillas, es más difícil la interacción con la superficie de las nanopartículas. La tendencia del ADN de doble cadena con AuNPs aniónicas es la de repelerse. No obstante, las fuerzas de van der Waals también afectan debido a la presencia de regiones no polares en el ADN. Punto y seguido.

Obviamente, en el caso de AuNPs catiónicas, las fuerzas electrostáticas favorecen la aproximación de las moléculas.⁸⁶⁻⁸⁸ La presencia de nanopartículas catiónicas causa la desnaturalización parcial de la hélice de ADN, dando lugar a una serie de estructuras intermedias entre ss y ds-ADN.⁸⁸ La interacción electrostática provoca una curvatura en el ADN mientras que las interacciones hidrofóbicas con las bases en los surcos deforman la estructura del ADN.^{86,88} En el caso de nanopartículas aniónicas, la única forma de interacción previsible con dsADN sería a través de enlaces covalentes (S-Au) dadas las repulsiones electrostáticas, sin embargo algunos estudios han reportado débiles interacciones de AuNPs aniónicas con dsADN a través de los surcos.^{49,75} De hecho, en el caso de AuNPs aniónicas pequeñas (del orden de 5 nm) se produce la desnaturalización de la hélice formándose un complejo ADN-AuNP muy estable, ya mencionado en el apartado anterior.⁴⁹

En el caso de moléculas de ADN ancladas covalentemente en la superficie de la AuNP, tanto la cantidad de moléculas adsorbidas como el tamaño de las mismas afecta directamente a la conformación hasta el punto de provocar la desnaturalización de la hélice (véase Figura 1.11).⁸⁹ A bajas densidades el ADN tenderá a establecer interacciones no específicas dentro de sus posibilidades. La formación de enlaces S-Au es un proceso muy favorable en términos energéticos, lo que obliga a la NP a aceptar todas las moléculas tiolizadas hasta la saturación. Esto ocurre a altas densidades de ADN, donde las cargas negativas de las cadenas adsorbidas

previene la adsorción de más moléculas en la superficie. En esta situación, las cadenas dobles tenderán a abrirse para disminuir las repulsiones electrostáticas y así permitir la entrada de más moléculas tiorizadas. Obviamente, la estabilidad de la cadena compite con la creación de enlaces S-Au, de manera que si se desea obtener una nanopartícula con una alta densidad de dsADN (es decir, evitar la apertura del ADN) se deben usar oligonucleótidos con más de 50 pares de bases.⁸⁹ La optimización de este sistema no es fácil ya que las repulsiones electrostáticas entre hebras tiene una fuerte influencia. Se observa baja estabilidad térmica respecto a una deshibridación a altas densidades debido a la proximidad de cargas del mismo signo,⁹⁰ por lo que se requiere la adición gradual de una sal para disminuir las interacciones de repulsión y así aumentar la capacidad de anclaje.⁹¹ El tamaño del ión influye en los resultados: cationes pequeños permiten una mayor carga de moléculas de ADN por NP, ya que las hebras pueden estar más empaquetadas.⁹²

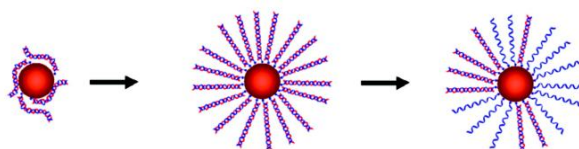


Figura 1.11. Mecanismo de desnaturalización de moléculas de ADN de doble cadena ancladas en la superficie de la AuNP, donde la tendencia a formar enlaces covalentes Au-S domina el proceso provocando incluso la apertura de la hélice. Reimpreso con permiso de D. Peled, R. Naaman, S. S. Daube, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 8581-8584.⁸⁹ Copyright 2010 American Chemical Society.

1.3.3. Interacciones entre ADN de larga cadena y nanopartículas de oro

Dada la relativa flexibilidad del ADN cuando supera una longitud de 500 Å,⁵² los estudios de funcionalización y de las interacciones entre ADN polimérico y AuNPs no han sido de interés. Con poca rigidez el biopolímero puede adoptar conformaciones aleatorias o más compactadas que lo inhabiliten para el fin de su diseño; de hecho, incluso en el caso de oligonucleótidos es necesario incluir espaciadores entre el polímero y la cabeza con el grupo tiol, o moléculas que impidan la interacción del ADN con la superficie manteniendo recta la hebra.⁹³ Sin embargo, por la capacidad de interactuar que presenta el ADN con NPs metálicas, ha habido una especial predilección por su uso como molde, fundamentalmente en la obtención de nanoalambres.⁹⁴ Ejemplo de ello es un reciente trabajo de Larisa I. Lopatina y colaboradores,⁹⁵ donde según la proporción de NaBH₄, HAuCl₄ y ADN (de esperma de salmón, con 300-500 pbs) se obtienen distintos tamaños y distribuciones de las AuNPs. A la concentración más alta de ADN y con un exceso de NaHB₄, se produce una disposición de nanoalambre, donde las

AuNPs se encontraban fusionadas y alineadas. Aunque es estas nanopartículas eran neutras, también se han conseguido desarrollar dichas estructuras con AuNPs aniónicas; a partir de NPs de oro cubiertas de tris (hidroximetil) fosfina y ADN de *calf thymus* (aproximadamente unos 10 kpbs).⁹⁶ Sorprendentemente, a pesar de las cargas de mismo signo, la interacción ocurre a través de la cadena fosfatada del ADN de doble cadena; la formación de puentes de hidrógenos entre los grupos hidroxilos de la tris (hidroximetil) fosfina y los grupos fosfatos son clave para dicho proceso.⁹⁶

1.4. Interés y aplicaciones de las interacciones entre los polinucleótidos y las nanopartículas de oro

Como se ha indicado en secciones anteriores, el uso de las AuNPs como biosensor es el más desarrollado y aplicado en la actualidad; los cambios en los espectros de absorción, reflejados por cambios colorímetros tan diferentes (de rojo a azul), y la rapidez con la que se producen han sido los causantes de dicha preferencia.⁹⁶ Gran repercusión tuvo también la funcionalización con ADN de las nanopartículas, hecho que tuvo como origen los trabajos de Letsinger y Mirkin,³⁰ y Alivisatos,³¹ el proceso de hibridación con hebras complementarias permite el ensamblaje selectivo de AuNPs (véase Figura 1.12), siendo un método eficaz y “sencillo” de detección de hebras complementarias. Estos sistemas se han extendido en distintas variantes: i) creación de sistemas de nanopartículas con varias disposiciones, desde complejos “satélites” (una nanopartícula grande rodeada de nanopartículas más pequeñas)⁹⁷ hasta colocar las AuNPs con posiciones propiamente cristalinas (véase Figura 1.13);⁹⁸ ii) detección de defectos en la secuencia de oligonucleótidos,⁹⁹ lográndose detectar diferencias de una base;¹⁰⁰ iii) funcionalización de AuNPs con moléculas tiolizadas (aunque también existen otros puntos de anclaje) con una reactividad selectiva frente a un analito concreto.^{40,101,102}

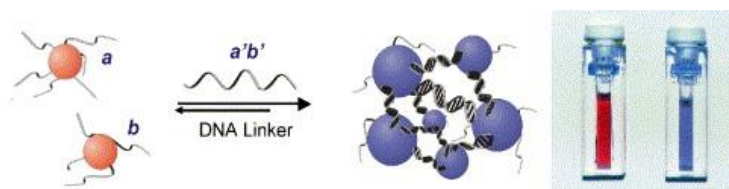


Figura 1.12. Esquema del uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN. Dos grupos de AuNPs funcionalizadas con diferentes hebras de ADN y no complementarias (a y b), tenderán a recobinarse al añadir una hebra complementaria a las dos adsorbida a la superficie (cadena a'b'). Este acercamiento se refleja en un cambio de color de azul a rojo. Reimpreso con permiso de C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou, C. A. Mirkin, *Clinica Chimica Acta*, 2006, **363**, 120-126.¹⁰³ Copyright 2006 Elsevier.

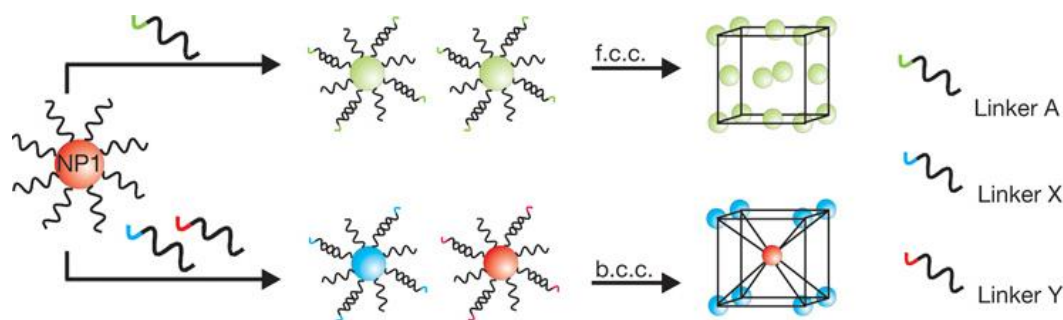


Figura 1.13. Programación de AuNPs funcionalizadas con hebras de ADN, cuyas terminaciones presentan diferentes combinaciones de bases, permitiendo la obtención de estructuras cristalinas de complejos de AuNPs. Reimpreso con permiso de S. Y. Park, A. K. R. Lytton-jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, A. Mirkin, *Nature*, 2008, **451**, 553-556.⁹⁸ Copyright 2008 Nature Publishing Group.

Por otra parte hay que reseñar que el método colorimétrico de detección de la hibridación de ADN desarrollado por Huixiang Li y Lewis J. Rothberg^{77,78} es la piedra angular del uso de AuNPs no funcionalizadas como biosensores. Dicho estudio se desarrollará más extendidamente en la sección 5.1, pero se podría simplificar indicando que, basándose en la diferencia de rigidez entre oligonucleótidos de cadena simple o doble y en la capacidad de interacción de estos con las AuNPs, el ADN de cadena simple protege al coloide de la agregación inducida por sal a diferencia del de doble hebra. La principal ventaja es el evitar la funcionalización de la nanopartícula, que conlleva el diseño de oligonucleótidos específicos encareciendo el coste del sensor. Con filosofías semejantes, donde la molécula a detectar protege a las AuNPs de la agregación, se han podido detectar diferentes tipos de moléculas y proteínas.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ En esta línea, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un método colorimétrico de detección de la enzima lisozima el cual ha sido patentado.^{107,108} Sin embargo la detección no se ha limitado exclusivamente a moléculas, sino a procesos como la hibridación de ADN o la formación de micelas.^{85,109,110} Gracias a la versatilidad de las nanopartículas y a sus sorprendentes propiedades ópticas, las aplicaciones de las AuNPs quedan abiertas a la imaginación e ingenio de los investigadores.

2. Deconvolución y análisis espectral de las bandas SPR

La obtención de la información que contiene la banda de plasmón superficial es fundamental para conocer y entender los procesos que experimentan las nanopartículas en disolución. Por ello, para estudiar los efectos de la polaridad del entorno y del tamaño de la nanopartícula en el espectro de absorción, se aplicó la teoría de Mie haciendo uso del programa gratuito MiePlot. Por otra parte el análisis de las diferentes bandas que componen el espectro de absorción se llevó a cabo a través de una deconvolución de los espectros experimentales, a través del programa Fityk. Por último señalar que en el caso de nanopartículas, el uso de la absorbancia en lugar de la longitud de onda conlleva la pérdida de información de la distribución de tamaños e incluso de la presencia de otras fracciones de coloide. Además, en el caso de agregados la distorsión de la banda experimental no permite establecer con claridad la longitud de onda máxima que caracteriza la disolución coloidal. La cuantificación del color permite parametrizar el espectro de absorción entero, incluyendo toda la información del sistema; con este fin se aplicó el espacio de color CIELab para, a través de la cuantificación del color de las muestras obtener información sobre el grado de agregación del coloide.

2.1. MiePlot: obtención de espectros de absorción a través de la teoría de Mie

MiePlot es un programa gratuito (<http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>) que permite calcular la dispersión de la luz por esferas homogéneas según la teoría de Mie, aunque también admite otros modelos. La interfaz del programa es sencilla (véase Figura 2.1) y los resultados se pueden expresar en función de diferentes magnitudes. Para la simulación de los espectros, sólo es necesario conocer las características de la nanopartícula (material, tamaño y grado de dispersidad) y el índice de refracción del entorno.

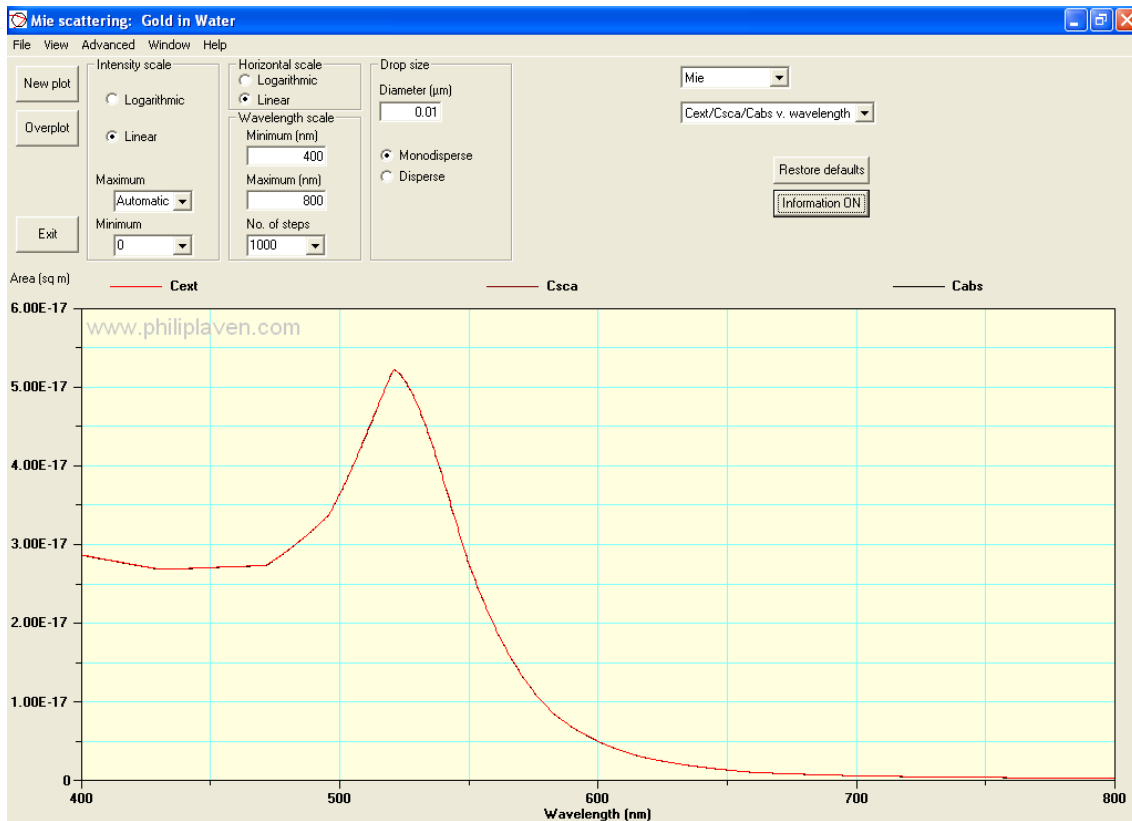


Figura 2.14. Captura de pantalla del programa MiePlot con la obtención de la sección eficaz de extinción, dispersión y absorción de AuNPs de 10 nm.

El programa cuenta con una base de datos de los índices de refracción de diferentes materiales (como oro o plata) y del agua y otros disolventes. La función dieléctrica se relaciona con el índice de refracción a partir de la relación de Maxwell:⁶

$$n + ik = \sqrt{\epsilon_1 + i\epsilon_2} \quad 2.3$$

donde n es la parte real y k la parte imaginaria del índice de refracción. Dichas componentes se pueden relacionar individualmente con la función dieléctrica:¹¹¹

$$n = \sqrt{\frac{[\epsilon_1 + \sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}]}{2}} \quad 2.4a$$

$$k = \sqrt{\frac{[-\epsilon_1 + \sqrt{\epsilon_1^2 + \epsilon_2^2}]}{2}} \quad 2.4b$$

Para los metales de acuñar, MiePlot toma los índices de refracción de los datos obtenidos por P. B. Johnson y R. W. Christy;¹¹² aun así, la página web <http://refractiveindex.info> ofrece una calculadora de índices de refracción para otro tipo de

materiales. Los datos concernientes al agua no son tan directos de obtener, ofreciendo el programa dos posibilidades: a) los datos de la Tesis Doctoral del doctor D. J. Segelstein: *The Complex Refractive Index of Water*, los cuales están comprendidos en un intervalo de longitud de onda de 10 nm a 10 m; b) usando ajustes a las ecuaciones del modelo de la Asociación Internacional para las Propiedades del Agua y Vapor (*International Association for the Properties of Water and Steam, IAPWS*).¹¹³

MiePlot no proporciona la relación de la absorbancia con la longitud de onda, sino que realmente se obtienen las diferentes secciones eficaces. La relación entre la sección eficaz de extinción y el coeficiente de extinción es:¹⁶

$$\sigma_{ext} = \frac{\ln 10}{10 N_A} \varepsilon \quad 2.5$$

donde N_A es el número de Avogadro y ε es el coeficiente de extinción molar. Es importante tener en cuenta que σ_{ext} se expresa en m^2 mientras que ε se está expresando en $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$.

2.2. Fityk: análisis de las bandas de los espectros de absorción a través de técnicas de deconvolución

Los espectros de absorción corresponden al sumatorio de varias bandas SPR procedentes de diferentes distribuciones de tamaños de nanopartículas. Así el número de bandas obtenidas para un espectro a través del análisis de deconvolución se ha ligado a los distintos grupos de AuNPs que componen el sistema.¹¹⁴

El estudio por deconvolución de las bandas se realizó con el programa gratuito Fityk (<http://fityk.nieto.pl/>);¹¹⁵ en caso contrario se especificó el *software* utilizado. Dicho programa permite obtener el sumatorio de las diversas bandas y adaptar sus parámetros para que la resultante sea lo más semejante posible al espectro experimental. Estas bandas pueden ser representadas en base a diferentes funciones. Dada la asimetría de las bandas SPR, diferente a la forma gaussiana, se utilizaron funciones Voigt (híbridas entre funciones gaussiana y lorenciana) para las bandas asociadas a grupos de nanopartículas:

$$y = \frac{a_0 \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(-t^2)}{a_3^2 + \left(\frac{x - a_1}{a_2} - t\right)^2} dt}{\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\exp(-t^2)}{a_3^2 + t^2} dt} \quad 2.6$$

donde a_0 es la altura, a_1 el centro, a_2 es proporcional a la anchura gaussiana y a_3 es proporcional al ratio de las anchuras lorenciana y gaussiana. La estimación de la anchura a media altura (FWHM) viene dada por:¹¹⁶

$$FWHM = 0.5346w_L + \sqrt{0.2169w_L^2 + w_G^2} \quad 2.7$$

donde w_L y w_G son las anchuras de la componente lorenciana y de la gaussiana, respectivamente.

2.3. Cuantificación del color a partir de medidas de transmitancia

El color que presenta una muestra es el reflejo directo del espectro de absorción en el rango visible de los componentes de ésta. Las disoluciones coloidales de oro se caracterizan por tener un color rojo, ya que la banda SPR se posiciona entre los 510-520 nm: se produce la absorción de la componente verde de la luz transmitiendo la componente roja (véase Figura 2.2). Sin embargo, cuando las AuNPs se agregan, la muestra se torna azul debido a que la banda de absorción se posiciona a longitudes de onda superiores a los 600 nm, siendo en este caso absorbida la componente roja de la luz y transmitiendo la azul (véase Figura 2.2). Debido a la principal aplicación de las AuNPs como sensores colorimétricos, es de gran utilidad el poder estudiar cuantitativamente las variaciones en el color; para ello, se aplicó un método desarrollado en la Tesis Doctoral de la doctora Aila Jiménez Ruiz *Reacciones Electroquimioluminiscentes y parámetros CIELab: Estudio de la Interacción de Especies Biomédicas en Dendrímeros y Nanopartículas*,¹¹⁷ el cual se basa en la transformación del espectro de absorción visible en tres parámetros (a^* , b^* y L^*) definidos por el sistema CIELab.



Figura 2.15. Espectro de radiación electromagnética en el rango visible. Imagen obtenida del repositorio Wikipedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum-es.svg bajo licencia de Dominio Público.

Un color concreto resulta subjetivo ya que depende del observador y de la iluminación. Claros ejemplos de este relativismo se dan en la vida ordinaria: fotografías de un mismo paisaje a distintas horas del día muestran diferentes colores, o dos personas pueden considerar el mismo color como uno diferente. Por ello se crearon los espacios de color, para poder definir

objetivamente cualquier color; un espacio de color es “aquel modelo matemático que permite identificar un color determinado, expresado en función de una serie de coordenadas matemáticas de forma unívoca y como un estímulo percibido por el ojo humano modelo en condiciones específicas”.¹¹⁷ La Comisión Internacional de la Iluminación (*Commission Internationales de l'eclairage*, CIE) desarrolló en 1976 el espacio CIELab, procedente de espacios anteriores (CIE XYZ)¹¹⁸ y de teorías del color propuestas por diferentes físicos, entre ellos Erwin Schrödinger.¹¹⁹ Dicho sistema se cimienta en la teoría de que el color se compone de dos parejas de colores primarios, extremos de un mismo eje y por lo tanto imperceptibles simultáneamente, y de un tercer componente que regula el brillo. El eje a* lo compone los colores rojo (valores positivos) y verde (valores negativos) mientras el eje b* está formado por el amarillo (valores positivos) y el azul (valores negativos); el tercer eje (L*) varía el brillo. La Figura 2.3 muestra los tres ejes con los colores de sus componentes.

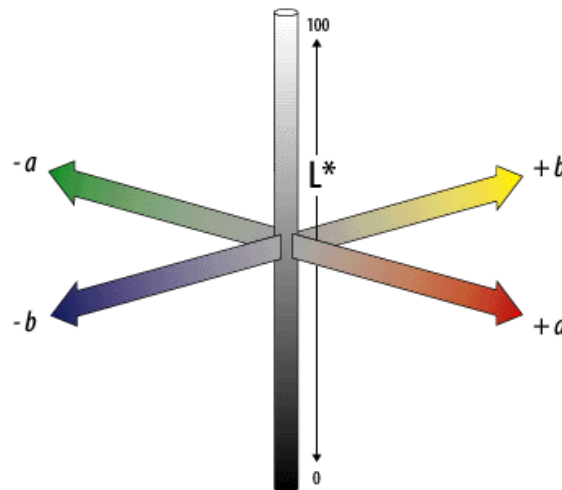


Figura 2.16. Sistemas de ejes según el espacio de color CIELab.

La expresión matemática que define cada componente viene dada por las ecuaciones 2.8, 2.9 y 2.10:¹¹⁸

$$a^* = 500 [f(X/X_n) - f(Y/Y_n)] \quad 2.8a$$

$$b^* = 200 [f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n)] \quad 2.8b$$

$$L^* = 116 [f(Y/Y_n)] - 16 \quad 2.8c$$

donde:

$$f(X/X_n) = (841/108)(X/X_n) + 4/29 \quad \text{para } (X/X_n) < (6/29)^3 \quad 2.9a$$

$$f(Y/Y_n) = (841/108)(Y/Y_n) + 4/29 \quad \text{para } (Y/Y_n) < (6/29)^3 \quad 2.9b$$

$$f(Z/Z_n) = (841/108)(Z/Z_n) + 4/29 \quad \text{para } (Z/Z_n) < (6/29)^3 \quad 2.9c$$

$$f(X/X_n) = (X/X_n)^{\frac{1}{3}} \quad \text{para } (X/X_n) > (6/29)^3 \quad 2.10a$$

$$f(Y/Y_n) = (Y/Y_n)^{\frac{1}{3}} \quad \text{para } (Y/Y_n) > (6/29)^3 \quad 2.10b$$

$$f(Z/Z_n) = (Z/Z_n)^{\frac{1}{3}} \quad \text{para } (Z/Z_n) > (6/29)^3 \quad 2.10c$$

Los parámetros X_n , Y_n y Z_n son los valores correspondientes al *punto blanco* del sistema, que son los valores de X , Y y Z que codifican el color blanco en una condiciones concretas. Así para una iluminación de un mediodía en Europa occidental (iluminante D65), los valores de estos parámetros son:¹²⁰

$$\begin{aligned} X_n &= 94.825 \\ Y_n &= 100 \\ Z_n &= 107.381 \end{aligned} \quad 2.11$$

Sin embargo estas ecuaciones están basadas en los parámetros X , Y y Z del espacio CIE XYZ, y se relacionan directamente con medidas de trnasmitancia:¹²⁰

$$X = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{X}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad 2.12a$$

$$Y = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad 2.12b$$

$$Z = K \sum_{(\lambda)} T_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Z}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad 2.12c$$

$$K = 100 / \sum_{(\lambda)} S_{(\lambda)} \bar{Y}_{10(\lambda)} \Delta_{(\lambda)} \quad 2.12d$$

donde X_{10} , Y_{10} y Z_{10} son las funciones del observador, S es una función que depende del iluminante (estas cuatro funciones se encuentran tabuladas, véase la referencia 120), T es la transmitancia de la muestra y Δ es el intervalo de medida. A partir de estas ecuaciones, la doctora Jiménez Ruiz desarrolló un archivo de *excel* que permitía la conversión de espectros de absorción a parámetros a^* , b^* y L^* , y que simulaban el color de la muestra (véase Figura

2.4).¹¹⁷ Este software basado en CIELab nos ha permitido realizar análisis colorimétricos muy detallados de disoluciones coloidales de oro en la presente Tesis Doctoral.

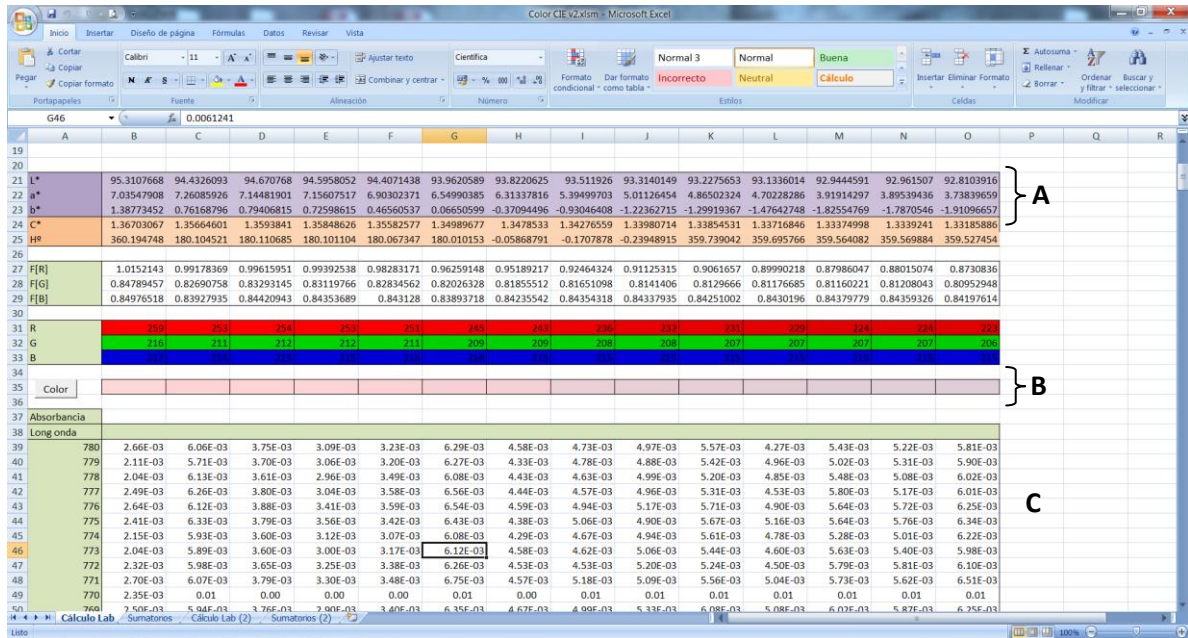


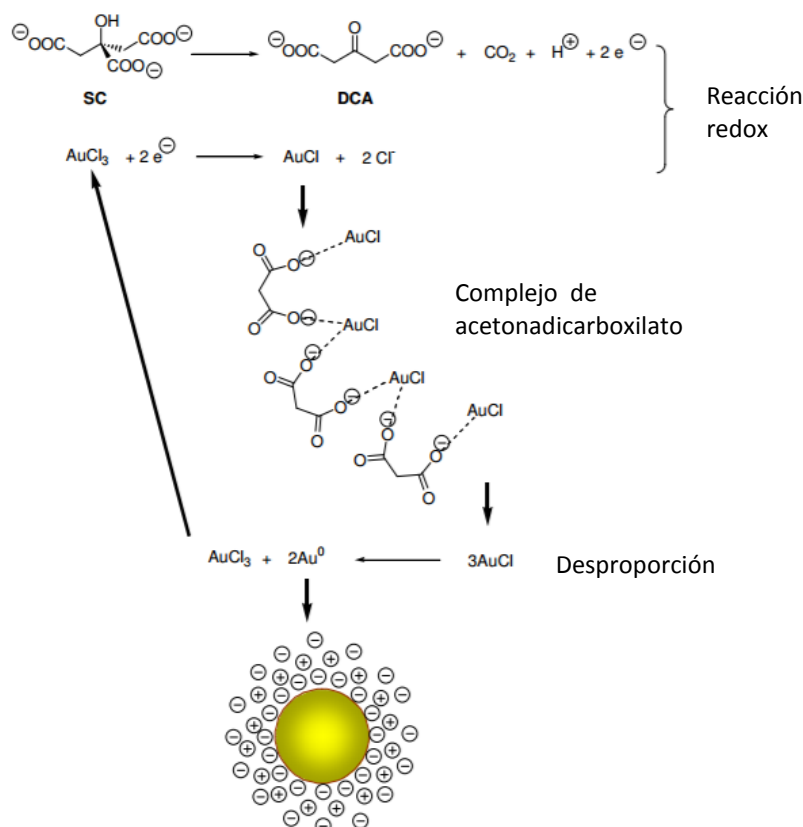
Figura 2.17. Captura de pantalla del archivo de *Excel* para la aplicación del sistema CIELab a espectros de absorción. A) Valores obtenidos de a*, b* y L* para cada espectro de absorción; B) colores simulados de cada espectro de absorción; C) valores de absorbancia según la longitud de onda para cada espectro.

3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro. Fenómenos de agregación. Efecto del disolvente en la banda SPR.

3.1. Motivación, antecedentes y objetivos

En cualquier estudio que implique nanopartículas, la síntesis es una etapa clave. El método utilizado influye notablemente en las propiedades del coloide obtenido: forma, estabilidad e incluso la polidispersidad.²⁷ La preparación de NPs se puede realizar a partir de dos formas: *top down*, cuando las nanoestructuras son hechas a partir del material macroscópico, y *bottom up*, si la síntesis se lleva a cabo a partir de átomos y/o moléculas.⁴ Entre estos dos caminos, el último es el que se está imponiendo debido a que permite un mejor control del tamaño y de la forma.²⁷

El procedimiento más sencillo para la obtención de AuNPs es por reducción de una sal de oro, normalmente tetracloroaurato (III) de hidrógeno (HAuCl₄), donde después se añade un agente estabilizante, que en muchos casos también es el que funcionaliza la NP.⁷ Dentro de este tipo de síntesis la más utilizada es la desarrollada por John Turkevich y colaboradores,¹²¹ donde una disolución de HAuCl₄ es calentada hasta ebullición para añadirle a continuación citrato trisódico y agitar vigorosamente unos minutos. En dicho procedimiento, el citrato ejerce tanto de reductor como de agente protector de la NP a través del siguiente mecanismo (véase Esquema 3.1):¹²² I) el citrato reduce el Au (III) a Au (I), formándose el ión acetoadicarbóxilato (DCA). Aunque también se forman otras especies oxidadas del citrato en la reacción,¹²³ es el DCA el que participa en la formación de la AuNP,^{121,122} ya que forma un quelato con el Au (I) haciendo muy favorable la formación de dicha especie. II) El Au (I) se dismuta para formar Au (III) y oro metálico, siendo este último el que crea la nanopartícula ya sea formando el núcleo o provocando el crecimiento de un núcleo.



Esquema 3.1. Mecanismo de formación de nanopartículas de oro protegidas por aniones citrato. Reimpreso con permiso de I. Ojea-Jimenez, N. G. Bastus, V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, 115, 15752-15757.¹²² Copyright 2011 American Chemical Society.

Dada la sencillez del método de Turkevich, se han llevado a cabo múltiples variaciones del mismo que controlan las características finales de las AuNPs.²⁷ Sin embargo, la síntesis requiere sumo cuidado ya que cualquier diferencia en las condiciones provoca cambios en la solución coloidal obtenida.^{122,124}

La caracterización de las nanopartículas se puede realizar por diversas técnicas instrumentales. Normalmente, para describir a la AuNP, se emplea el diámetro y la posición del máximo de la banda SPR. Para la determinación del tamaño, la técnica más utilizada es la Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) que permite obtener fotografías de los núcleos de las AuNPs. Aunque debido al protocolo de preparación de la muestra (en la que se debe secar, pudiéndose dar fenómenos de agregación) otros investigadores se decantan por otras técnicas, como la medida de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), donde se mide la señal de respuesta de una muestra en disolución. La espectroscopía electrónica de absorción permite determinar el máximo de la banda SPR.

La agregación de las AuNPs es un proceso fundamental cuando el coloide es empleado como sensor, ya que los cambios colorimétricos según el estado de la nanopartícula permiten discernir la presencia del analito.²² Uno de los métodos más comunes es el uso de una sal inorgánica (comúnmente NaCl), la cual provoca la agregación de las AuNPs en ausencia del analito mientras que si este último se halla en disolución, la agregación no tiene lugar. El proceso inverso como camino de detección es mucho menos empleado. A pesar de su importancia, escasos esfuerzos se han realizado en la optimización de las cantidades de sal a añadir centrándose fundamentalmente la atención en estudios cinéticos y teóricos, cuyos resultados son ajustados a la teoría DVLO.^{125,126} Incluso en el caso de las AgNPs, muy estudiadas en relación al oro debido a su bajo coste, la bibliografía se centra en estudios cinéticos de agregación con diferentes sales y diferentes moléculas adsorbidas en la superficie de la partícula.^{127,128} Sin embargo, es sabido que tanto la disposición de las partículas dentro del agregado como el tamaño del mismo afectan a las interacciones de la nube electrónica, caracterizando al espectro de absorción del coloide.¹²⁹ Por ello, la optimización de la cantidad de sal necesaria para inducir la agregación es importante a la hora de controlar los cambios en la banda SPR e incluso la aparición de nuevas bandas.

En referencia a los efectos del disolvente sobre la banda de SPR de las AuNPs los estudios son aún más escasos, de hecho casi inexistentes. Aunque es cierto que a partir de la teoría de Mie se podría predecir las alteraciones en la banda SPR, es necesario recordar que dicha teoría también presenta severas limitaciones. Uno de los pocos estudios sobre este punto es el realizado por Sylvia Underwood y Paul Mulvaney,¹⁷ en el que comparan la posición de la banda SPR de AuNPs transferidas a diferentes medios orgánicos con la teoría de Mie y en el que observaron desplazamientos al rojo conforme mayor era el índice de refracción del medio. Estudios similares han sido realizados por diferentes grupos científicos,^{130,131} aunque las nanopartículas utilizadas estaban funcionalizadas con estabilizantes poliméricos para prevenir la agregación. Por todo ello resulta de gran interés conocer el comportamiento de las AuNPs en medios diferentes al agua para poder extrapolar su empleo como biosensor en medios más hidrofóbicos que el agua como pueden ser los fluidos biológicos.

Considerando todo lo expuesto, el principal objetivo del presente capítulo es la síntesis y caracterización de AuNPs de diferentes tamaños, así como un estudio exhaustivo del proceso de agregación en presencia de electrolito inerte y del efecto del disolvente provocado por disoluciones de distinto carácter hidrofóbico.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

Todos los reactivos utilizados son de calidad analítica o superior. El tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y el citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich. El metanol, etanol, 2-propanol, *tert*-butanol y el cloruro sódico (NaCl) de Merck. Las disoluciones se prepararon en agua desionizada, siendo su conductividad menor a $10^{-6} \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$.

3.2.2. Espectros de absorción en el UV-vis

3.2.2.1. Espectros de absorción para el estudio de la agregación inducida por sal

Los espectros de cada muestra fueron registrados cada cinco minutos después de la adición de NaCl. A los 30 minutos los espectros eran prácticamente invariables, tomándose este tiempo como límite máximo de la medida. Las experiencias se realizaron con AuNPs de 14.8 nm, a concentración fija $[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$, en presencia de distintas concentraciones de sal. 200 μl de la solución coloidal sintetizada fueron añadidos en una cubeta de cuarzo para posteriormente diluirlos con 1600 μl de agua. La adición de 200 μl de NaCl de diferente concentración se tomó como tiempo cero. Para otros tamaños de coloide, las concentraciones fueron: $[\text{AuNPs} (27 \text{ nm})] = 4.7 \times 10^{-11} \text{ M}$; $[\text{AuNPs} (4.5 \text{ nm})] = 8.9 \times 10^{-9} \text{ M}$.

3.2.2.2. Espectros de absorción en presencia de alcoholes tetraédricos

Los espectros de cada muestra fueron tomados a los 8 minutos después de añadir el alcohol. Las nanopartículas en diferentes mezclas agua/codisolvente resultaron ser estables más de 20 minutos. Las experiencias se llevaron a cabo con AuNPs cuyo tamaño medio fue de $15.4 \pm 1.5 \text{ nm}$, a una concentración fija de $[\text{AuNPs}] = 2.9 \times 10^{-10} \text{ M}$, en diferentes fracciones molares de distintas mezclas agua/alcohol. 200 μl de la solución coloidal se añadieron en una cubeta de cuarzo. Se tomó como tiempo cero la adición de 1800 μl de distintas disoluciones de alcohol de diferente concentración.

3.2.3. Medidas de potencial zeta

Las medidas de potencial zeta fueron realizadas con el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments Ltd (UK). Se empleó como cubeta una celda de DTS 1060 de

policarbonato. Las medidas se llevaron a cabo medidas en presencia de diferentes fracciones molares de *terc*-butanol. $[AuNPS] = 2.9 \times 10^{-10}$ M en cada caso.

3.2.4. Medidas de TEM

Para la obtención de imágenes de TEM, una simple gota (~10 μ l) de la disolución a analizar fue colocada en una rendija de cobre cubierta por una película de carbono y dejada secar durante varias horas a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron en un microscopio electrónico Philips CM trabajando a 200 kV y el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa *ImageJ*.

3.2.5. Medidas de índice de refracción

Las medidas de los índices de refracción de las disoluciones de AuNPs (2.9×10^{-10} M) en presencia de diferentes mezclas agua/alcohol (a la mayor fracción molar de cada codisolvente) se realizaron con ayuda de un refractómetro digital Abbe “WYA-1S”. Basado en la calibración con disoluciones de índice de refracción conocido, el error absoluto en los índices de refracción estimado fue de ± 0.0004 .

3.2.6. Medidas de Dispersión Dinámica de Luz

El tamaño y la distribución de AuNPs (2.9×10^{-10} M) a la mayor fracción molar de alcohol en diferentes mezclas agua/alcohol fueron determinados por medio de la técnica de DLS usando un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments LTd (UK). La muestra fue iluminada con un láser con una disposición de 173° respecto al centro de la celda, y la intensidad de fluctuación en la luz dispersada fue analizada. Se llevaron a cabo al menos tres medidas de tamaño por cada muestra, siendo el error relativo para el diámetro hidrodinámico menor al 5%.

3.2.7. Análisis de las bandas de absorción por deconvolución

La deconvolución de los espectros experimentales se realizó con el programa *SigmaPlot 10.0*. En todos los casos los espectros fueron ajustados a funciones gaussianas:

$$f(x) = A \cdot \exp\left(-\frac{(x - \lambda_{max})^2}{2C^2}\right) \quad 3.1$$

donde A es la absorbancia, λ_{max} es la posición del máximo y C es un parámetro relacionado con la anchura a la mitad del máximo ($FWHM$) de la banda acorde a:

$$FWHM = \sqrt{2 \cdot \ln 2} C \approx 1.1774 \cdot C \quad 3.2$$

La principal suposición de este modelo es que cada banda corresponde a una distribución de tamaño de AuNPs, lo cual se ha demostrado experimentalmente que se ajusta bastante bien a la realidad.¹¹⁴ Además se fijó una banda a 400 nm para corregir el efecto de dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.¹³² En todos los casos el error de análisis entre el espectro simulado y el experimental resultó ser menor del 5%.

3.3. Síntesis y caracterización de las AuNPs empleadas en el estudio

En la presente Tesis Doctoral se han sintetizado AuNPs con tres tamaños (aproximados) diferentes: 5, 15 y 30 nm. En la bibliografía, las comprendidas entre 10 y 20 nm son las más asiduas y de hecho, han sido las de 15 nm las más empleadas en la presente investigación.

3.3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 15 nm

La obtención de AuNPs con un tamaño medio próximo a los 15 nm se ha llevado a cabo por reducción de un complejo de Au (HAuCl_4) en fase líquida, optimizando por nuestra parte una variante del método de Turkevich¹³³ para obtener disoluciones coloidales lo más estable posible en el tiempo.

3.3.1.1. Síntesis de AuNPs de 15 nm

El material de síntesis se limpió con agua regia (mezcla 1:3 de HNO_3 y HCl) para eliminar todo residuo metálico que pueda interferir en dicho proceso;¹³⁴ posteriormente se aclaró con abundante agua destilada con un enjuague final de agua desionizada.

Se preparó una disolución 0.01 % de HAuCl_4 , y 97 ml de ésta se calentaron en un vaso de precipitado con agitación. Cuando alcanzó los 90 °C se añadieron 3 ml de una disolución de citrato trisódico (38.8 mM) y se mantuvo la reacción a temperatura constante (90°C). Con el tiempo, la mezcla adquirió un tono grisáceo que evolucionó a rojo. Una vez adquirido el color rojo característico, se dejó a esta temperatura unos 10 minutos más. Transcurrido dicho tiempo, se dejó la disolución coloidal en agitación 24 horas a temperatura ambiente.

3.3.1.2. Caracterización de las AuNPs

Como se ha indicado anteriormente, dos parámetros son los que caracterizan a las AuNPs: su banda SPR, más exactamente su posición, y el tamaño promedio, del cual se puede obtener la concentración de la disolución coloidal. La Figura 3.1. muestra la banda SPR para una dilución 1:10 de la síntesis obtenida, donde la posición del máximo se encuentra a 520 nm permitiendo estimar el diámetro en torno a los 15 nm.¹³

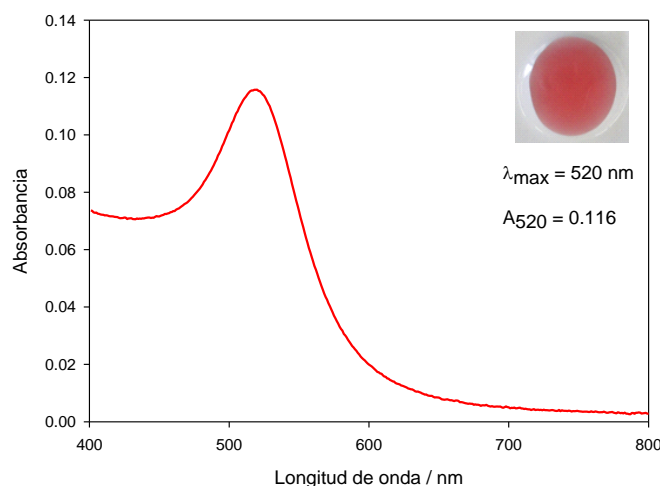


Figura 3.18. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 15 nm. El máximo se posiciona en torno a 520 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.

Dada la sensibilidad que presenta la síntesis a pequeños cambios en su ruta, se ha repetido la obtención de nanopartículas hasta conseguir disoluciones coloidales que presentasen el mismo espectro. Una vez conseguida la reproducibilidad en la síntesis se procedió a la determinación del tamaño, que se realizó midiendo el diámetro de más de 200 partículas observadas por TEM (véase Figura 3.2), obteniéndose un tamaño promedio de $14.8 \pm 1.8 \text{ nm}$.

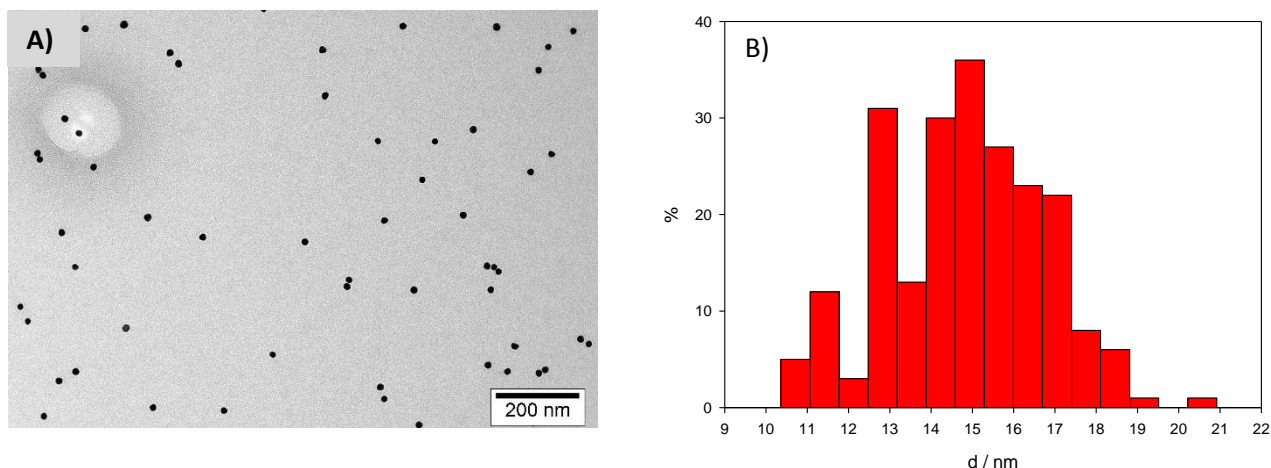


Figura 3.19. A) Ejemplo de imagen de TEM utilizada para la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 15 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 220 nanopartículas.

A partir del tamaño promedio estimamos la concentración de AuNPs en la disolución coloidal sintetizada siguiendo tres procedimientos:

- A partir del volumen molar del oro macroscópico.

Para nanopartículas esféricas, la relación que existe entre el volumen molar y el número de átomos de oro que componen a dicha partícula (n) viene dada por:¹³⁵

$$n = \frac{0.5 \cdot \pi \cdot N_A \cdot d_m^3}{3 \cdot V_m} \quad (3.3)$$

donde N_A es el número de Avogadro, d_m es el diámetro medio de las AuNPs (expresado en cm) y V_m es el volumen molar del oro macroscópico ($10.215 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$).¹³⁵ Para una AuNP con un tamaño de 14.8 nm se obtuvo que está compuesta por 100082 átomos de oro. Partiendo de la premisa de que todo el HAuCl_4 se ha reducido y sabiendo que el volumen final de la disolución es 100 ml, se calculó que la concentración de Au^0 es $2.84 \times 10^{-4} \text{ M}$. Haciendo uso de la concentración de Au^0 y del número de átomos que forman una NP, se pudo obtener la concentración de la disolución coloidal: $2.8 \times 10^{-9} \text{ M}$.

- A partir del volumen atómico del oro.

El volumen de una nanoesfera rígida se expresa como:

$$V_{NP} = \frac{4}{3} \pi \cdot r_{NP}^3 \quad (3.4)$$

siendo r_{NP} el radio de las nanopartículas. Para AuNPs cuyo tamaño es 14.8 nm, se obtuvo que $V_{NP} = 1.7 \times 10^6 \text{ \AA}^3$. Como el volumen del oro atómico es 17.81 \AA^3 ,¹³⁵ se calculó el número de átomos que componen una NP a partir del volumen de la misma:

$$n = \frac{V_{NP}}{V_{Au}} \quad (3.5)$$

siendo 95306 átomos de Au por NP. Al relacionar este dato con la concentración de oro metálico en disolución (2.84×10^{-4} M) se halló la concentración de AuNPs dispersas en agua: 3.0×10^{-9} M.

- A partir del coeficiente de extinción molar en el máximo.

El coeficiente de extinción (ϵ) se obtuvo del diámetro de las nanopartículas según la siguiente ecuación experimental:¹⁴

$$\ln \epsilon = 3.32 \cdot \ln d_m + 10.8 \quad (3.6)$$

Como el tamaño medio de las AuNPs del presente trabajo es 14.8 nm, $\epsilon = 3.76 \times 10^8$ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. De manera que a partir del valor de absorbancia en el máximo ($A_{\text{max}} = 0.116$, para una dilución 1:10), por la ley de Lambert-Beer se obtuvo la concentración: 3.1×10^{-9} M.

Como los tres procedimientos para el cálculo de concentración son válidos, se ha considerado como concentración la media de todos ellos: 3.0×10^{-9} M.

3.3.2. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 30 nm

A pesar de la existencia de estudios con las proporciones de HAuCl_4 y de citrato trisódico a añadir para obtener el tamaño deseado,^{13,136} no ha sido posible reproducir los resultados reportados en los mismos; por ello ha sido necesario probar diferentes proporciones de reactivos hasta obtener la síntesis con las características deseadas. El procedimiento fue análogo al realizado para la síntesis de AuNPs de 15 nm, pero con la diferencia de que se añadió la mitad de citrato sódico (1.5 ml). En este caso la disolución adquirió un color rojizo levemente rosáceo (véase la fotografía insertada en la Figura 3.3). El espectro de absorción revela que la posición de la banda SPR se encuentra a 525 nm (Figura 3.3), lo cual coincide con la bibliografía.¹³

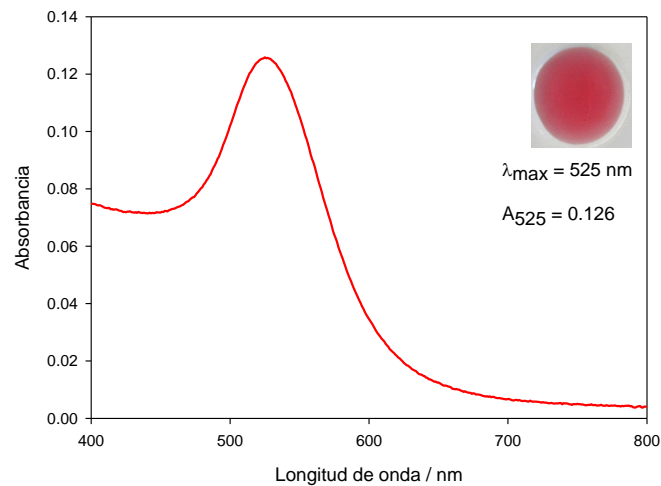


Figura 3.20. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 30 nm. El máximo se encuentra a los 525 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.

El tamaño también se obtuvo por imágenes de TEM a través del promedio de los diámetros medidos de 200 partículas (véase Figura 3.4), obteniéndose 27 ± 6 nm. Para el cálculo de la concentración se hizo la media de los valores obtenidos al aplicar los mismos procedimientos desarrollados en la subsección anterior, obteniéndose 4.7×10^{-10} M.

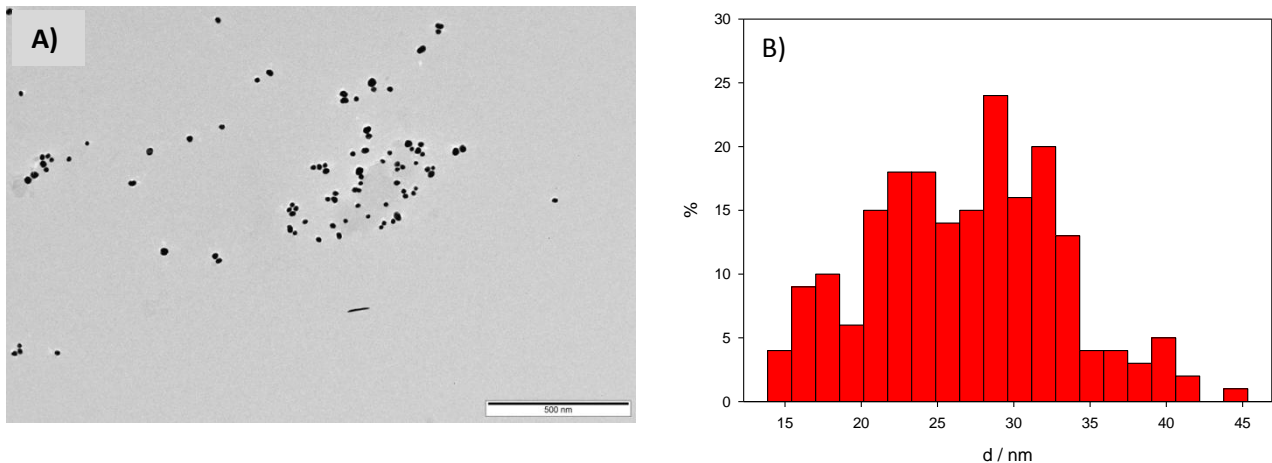


Figura 3.21. Ejemplo de imagen de TEM utilizada para la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 30 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 200 nanopartículas.

3.3.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro de 5 nm

El método de Turkevich y sus variantes están limitados para la síntesis de nanopartículas con tamaños comprendidos entre los 15 y 150 nm.²⁷ Sin embargo, la síntesis de AuNPs de 5 nm se puede llevar a cabo por un procedimiento bastante similar al de Turkevich, con la salvedad de que es necesaria la adición de NaBH₄. La síntesis es parecida a la que se aplica a las semillas de oro (con un tamaño aproximado de 5 nm) para su uso en la creación de nanopartículas con formas no esféricas:¹³⁷ se prepararon 80 ml de una disolución mixta de HAuCl₄ y citrato sódico, cuya concentración fue 2.5×10^{-4} M (de cada reactivo) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. A parte se preparó una disolución 0.1 M de NaBH₄ con agua fría para evitar un sobrecalentamiento cuando se produjera la reacción. Se vertieron rápidamente 2.4 ml de la disolución de NaBH₄ sobre la disolución mixta. La mezcla adquirió un color marrón anaranjado, enrojeciéndose ligeramente con el paso del tiempo debido al crecimiento de las nanopartículas. Por último se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente.

El color de la disolución coloidal obtenida fue rojo anaranjado y el máximo de la banda SPR se situó en 510 nm (véase Figura 3.5).

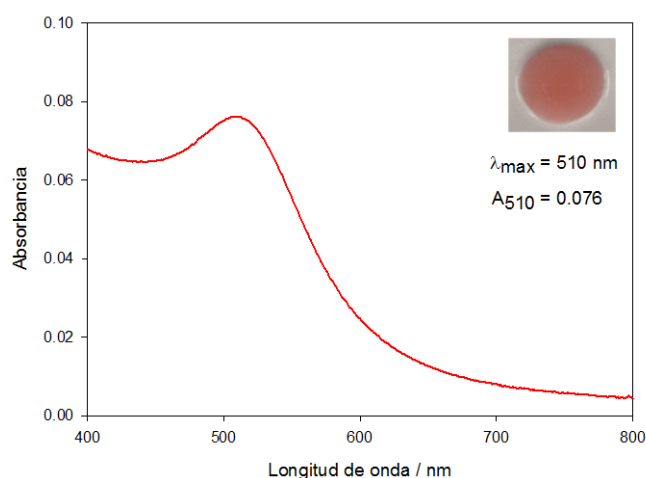


Figura 3.22. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 5 nm. La posición del máximo está en torno a los 510 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.

A través de la medida de más de 200 nanopartículas en las imágenes obtenidas por TEM se obtuvo un tamaño medio de: 4.5 ± 0.9 nm (véase Figura 3.6). Al igual que en los casos anteriores, la concentración se estimó del promedio de los valores obtenidos por los tres métodos: 8.9×10^{-8} M.

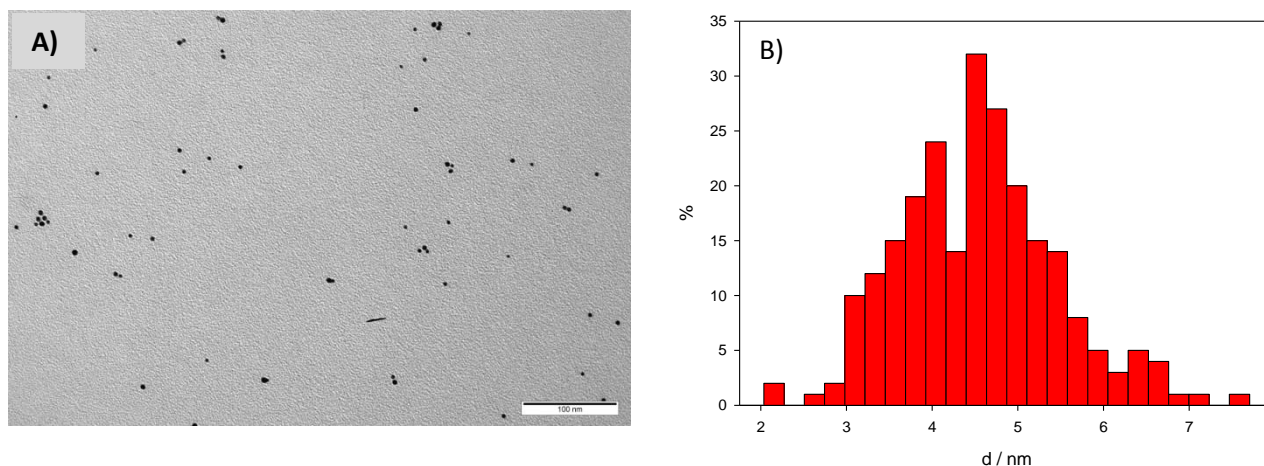


Figura 3.23. Ejemplo de imagen de TEM utilizada en la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 5 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 230 nanopartículas.

3.3.4. Estudio del efecto del tamaño de la nanopartícula en la banda SPR a través de la teoría de Mie

Las tres soluciones coloidales obtenidas presentan propiedades muy distintas: la banda SPR se posiciona a diferentes longitudes de onda y tanto los coeficientes de extinción así como las concentraciones son de órdenes de magnitud diferentes. La diferencia en entre las concentraciones radica en el procedimiento de síntesis: las concentraciones de las disoluciones de HAuCl_4 que se han utilizado para la obtención del coloide han sido muy parecidas (aproximadamente 2.5×10^{-4} M); así las nanopartículas de mayor tamaño al necesitar más átomos de oro para su formación, presentan concentraciones más bajas.

Respecto a la posición de la SPR, como se comentó en el capítulo 1, conforme mayor es la partícula, a mayor longitud de onda se encuentra. La Figura 3.7 muestra como varía la posición de la SPR según la teoría de Mie. Según estos datos, para NPs cuyo diámetro esté comprendido entre los 5 y 15 nm no hay cambio alguno en la posición de la banda ($\lambda = 521.8$ nm) lo cual dista de los resultados experimentales. Esta discrepancia se debe a que la teoría de Mie fracasa en la simulación de espectros de nanopartículas pequeñas. Sin embargo, el resultado obtenido para las nanopartículas de 27 nm sí coincide bien con el predicho por la teoría de Mie (véase Tabla 3.1).

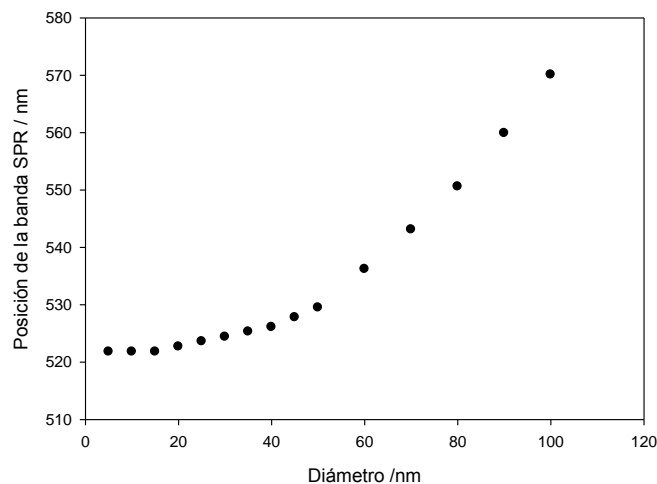


Figura 3.24. Longitudes de onda teóricas de la banda SPR según el tamaño de la AuNP. Las longitudes de ondas fueron calculadas con el programa informático *MiePlot*, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹²

Por otra parte, el coeficiente de extinción aumenta conforme lo hace el tamaño del nanoclúster. Debido a las concentraciones de las soluciones coloidales, no se puede apreciar diferencias en la intensidad ya que la baja concentración de las nanopartículas de mayor tamaño queda compensada con el alto coeficiente de extinción. Estas diferencias de magnitudes entre variaciones relativamente pequeñas de tamaños se deben a que el coeficiente efectivo de extinción depende cúbicamente del tamaño (véase ecuación 1.3) si el medio es el mismo. La variación del coeficiente con el tamaño de la AuNP se puede ver en la Figura 3.8. La Tabla 3.1 muestra los valores que se obtendrían a través de la ley de Lambert-Beer de los espectros experimentales: en el caso de las nanopartículas de 4.5 nm el valor teórico dista mucho del real (41%); en el caso de las AuNPs de 14.8 nm la diferencia es menos acusada (13%); para las de 27 nm la predicción es similar al coeficiente obtenido experimentalmente (una diferencia del 4%). Estas diferencias tan notables en los sistemas con coloides pequeños se deben a que dicho tamaño se encuentra fuera de las suposiciones que Mie realizó para la resolución de las ecuaciones de Maxwell (véase el apartado 1.1.2.2).

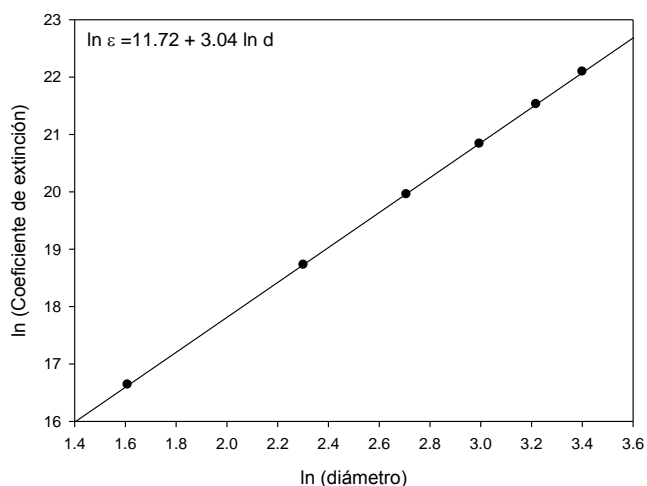


Figura 3.25. Relación logarítmica de los coeficientes de extinción teóricos de AuNPs con el tamaño. Los coeficientes de extinción fueron calculados con el programa informático *MiePlot*, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹²

Tabla 3.3. Comparativa de la posición de la banda SPR y del coeficiente de extinción experimental con el obtenido por la teoría de Mie para las tres soluciones coloidales obtenidas.

Diámetro / nm	$\lambda_{\text{exp}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{teor}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\text{exp}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{teor}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
4.5	510	521.8	8.5×10^6	1.2×10^7
14.8	520	521.8	3.9×10^8	4.4×10^8
27	525	524.0	2.7×10^9	2.8×10^9

3.4. Agregación inducida por cloruro sódico

Según la teoría DVLO,³² la estabilización de la disolución coloidal es fruto de la supremacía de las repulsiones electrostáticas de la doble capa frente a las fuerzas de van der Waals. Las primeras dependen fundamentalmente de la fuerza iónica del medio mientras que las segundas están influenciadas por el tamaño de las propias NPs. La Figura 3.9 muestra la agregación de AuNPs de 14.8 nm conforme aumenta la cantidad de NaCl presente en el medio. Se ha tomado la proporción A_{700}/A_{520} como indicativo del grado de agregación del sistema, ya que la absorbancia a 700 nm sólo puede provenir de NPs aglomeradas mientras que 520 nm representa el máximo de la banda SPR para las AuNPs de 14.8 nm dispersas (véase Figura 3.1). En dicho gráfico, se observa una primera zona donde la agregación es mínima ($[\text{NaCl}] = 0 - 0.04 \text{ M}$) ya que no se ha conseguido apantallar la cantidad suficiente de carga en la superficie de

las AuNPs. Sin embargo, en la zona intermedia se observan variaciones muy grandes en el grado de agregación con la cantidad de sal ($[\text{NaCl}] = 0.04 - 0.1 \text{ M}$): se ha neutralizado la suficiente densidad de carga para que las fuerzas de atracción entre las AuNPs superen a las fuerzas estabilizadoras. Por último, al superar dicha región la agregación es independiente de la cantidad de sal que se añada debido a que se han neutralizado todas las cargas que se encuentran en la superficie de la NP, prevaleciendo igualmente las fuerzas atractivas ante la ausencia de repulsiones electrostáticas.

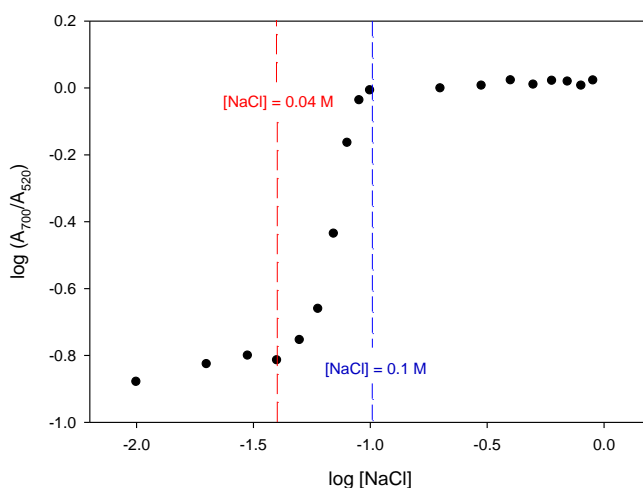


Figura 3.26. Evolución del grado de agregación conforme aumenta la cantidad de NaCl para una cantidad fija de AuNPs de 14.8 nm, $[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$. La línea roja discontinua corresponde al punto donde el proceso de agregación es muy sensible a la fuerza iónica; la línea azul discontinua marca el punto a partir del cual la cantidad de sal no afecta a la agregación. Los datos de absorbancia fueron tomados a los 10 minutos de mezclar las AuNPs con el electrolito inerte.

La Figura 3.10 muestra por su parte el grado de agregación al variar la concentración de AuNPs para una concentración fija de sal (0.07 M). En una primera región (entre 3.0×10^{-10} a $1.24 \times 10^{-9} \text{ M}$) la formación de agregados crece linealmente conforme aumenta la concentración de coloide, donde el proceso viene determinado por dos factores: las cargas a neutralizar y la cantidad de NP para formar los *clusters*. En los primeros puntos la agregación es baja no porque sea insuficiente la cantidad de sal para provocar la agregación, sino porque se forman agregados pequeños al haber pocas partículas; por ello, conforme se aumenta la cantidad de AuNPs la agregación aumenta significativamente. Tras este aumento se produce un descenso de la agregación para estabilizarse, ya que la cantidad de sal presente en el medio es insuficiente para neutralizar todas las cargas necesarias para inducir la agregación de todas las AuNPs presentes en el medio. El máximo que se observa es el punto donde los cationes Na^+ presentes en la disolución pueden neutralizar la máxima cantidad de cargas negativas.

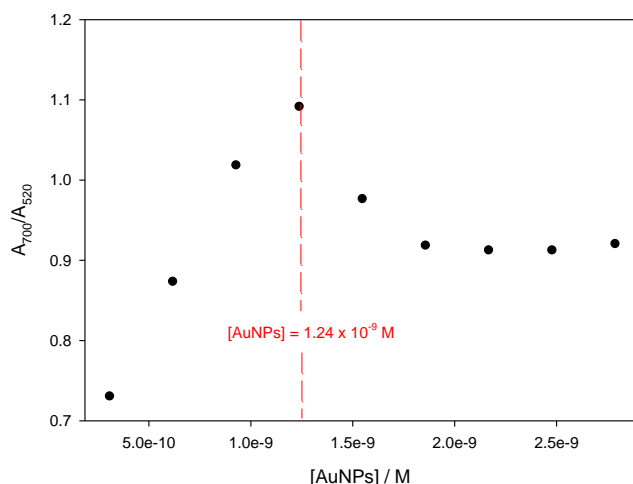


Figura 3.27. Evolución del grado de agregación conforme aumenta la concentración de AuNPs (14.8 nm) a una fuerza iónica constante de 0.07 M. La línea roja discontinua indica la concentración de AuNPs a la que se produce la disminución de la agregación. Los datos de absorbancia fueron tomados a los 10 minutos de mezclar los reactivos.

A la vista de los resultados queda demostrada la necesidad de optimizar las concentraciones de NaCl si el objetivo es la detección colorimétrica, ya que no se trata de maximizar la agregación sino de conseguir una agregación cuya banda esté en el rango visible, siendo lo suficientemente estrecha y evitando en todo momento su desplazamiento al infrarrojo o su desaparición debido a un fenómeno de coagulación. Para la optimización de la concentración de sal se decidió trabajar con una concentración de AuNPs de 3.0×10^{-10} M. Aunque al observar la Figura 3.10 se podría pensar que otras concentraciones serían más idóneas, por ejemplo $[AuNPs] = 1.2 \times 10^{-9}$ M (punto del máximo), la concentración fijada para el presente trabajo tiene la ventaja de implicar, desde un punto de vista experimental, la adición de una alícuota pequeña de la solución coloidal madre (200 μ l) a la cubeta, permitiendo una mayor flexibilidad en los estudios con múltiples componentes.

Considerando la Figura 3.9, la concentración óptima de sal para AuNPs de 14.8 nm debe estar entre 0.05 M y 0.1 M. Se decidió por ello estudiar la evolución con el tiempo de la banda SPR a las concentraciones de sal mencionadas y a una intermedia (0.075 M). Para la concentración más baja de NaCl (Figura 3.11A) se produce una leve agregación que a partir de los 20 minutos (línea azul) apenas cambia. Para $[NaCl] = 0.075$ M (Figura 3.11B), a partir del minuto 5 (línea roja) el espectro presenta dos bandas cuyos máximos están localizados (para el minuto 5: $\lambda_1 = 535$ nm, $\lambda_2 = 660$ nm) y que se desplazan hacia el IR como consecuencia del aumento de tamaño del aglomerado con el tiempo. Por último, a la concentración más alta considerada (Figura 3.11C) se aprecia una floculación parcial del agregado (reflejado en los valores bajos de absorbancia que presenta respecto a las Figuras 3.11A y B) así como la banda

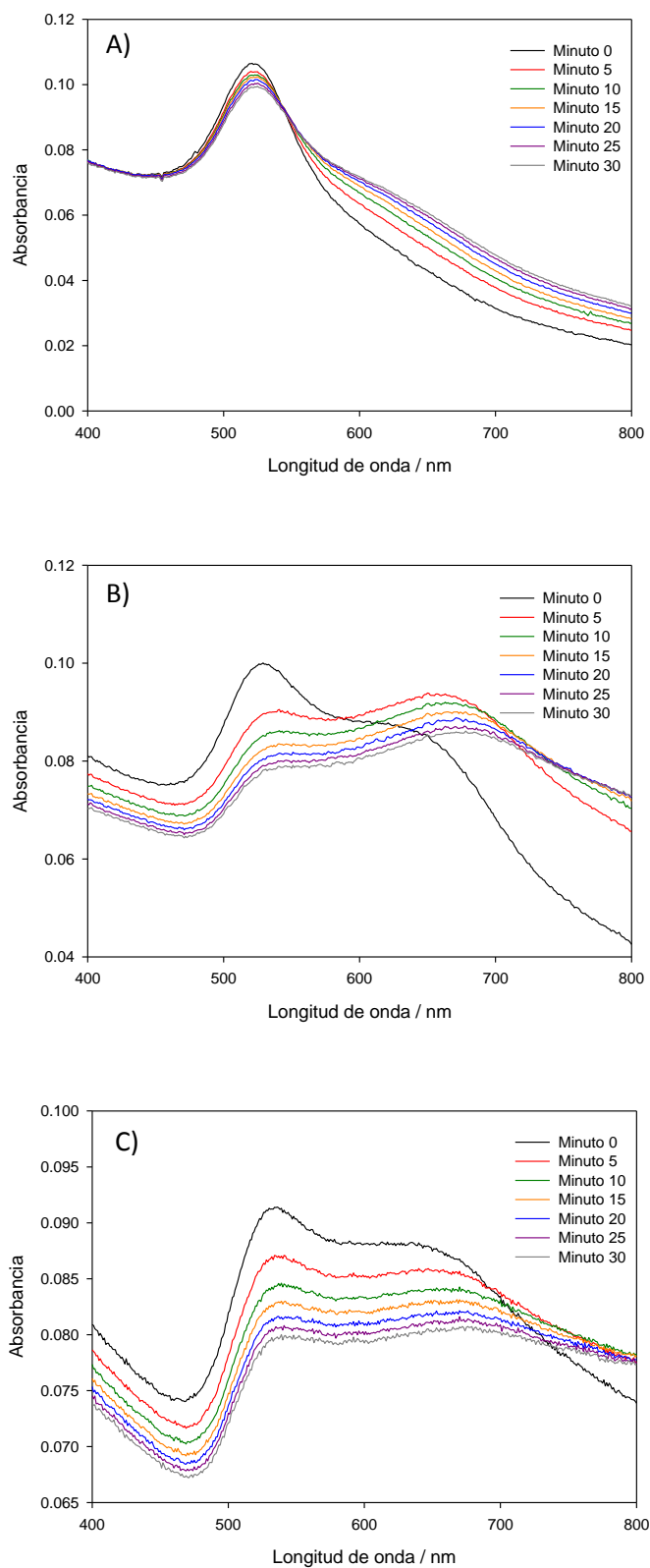


Figura 3.28. Evolución de los espectros de absorción de AuNPs (14.8 nm) con el tiempo a diferentes concentraciones de NaCl: A) 0.05 M; B) 0.075 M; C) 0.1 M.

correspondiente a las AuNPs agregadas es bastante ancha perdiendo casi su condición de máximo. Dado que el interés de la agregación es emplear las AuNPs como sensor colorimétrico tomando como referencia el color azul, la concentración óptima de sal resultó ser de 0.075 M. Los cambios de colores rojo-azul se pueden apreciar a simple vista y además se puede obtener una banda de absorción mejor definida que a $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$. Por otra parte, se observa también que a partir del minuto 20 tras la mezcla, la agregación es tan lenta que se pueden considerar los espectros invariables en el intervalo de tiempo entre los 20 y 30 minutos, estableciéndose éste como el intervalo de tiempo de trabajo.

Se comprobó también si esta concentración óptima es válida para las AuNPs de 27 y 4.5 nm. Los espectros de absorción de estos dos sistemas coloidales con NaCl se muestran en la Figura 3.12, donde se puede observar que para las nanopartículas de 27 nm es posible seguir utilizando dicha concentración a pesar de que la banda se posiciona cerca del IR; para las de 4.5 nm hubo que aumentar la concentración de sal debido a la alta estabilidad que presentan, utilizándose una concentración 0.25 M. Nanopartículas más grandes son menos estables debido a que las fuerzas atractivas de van der Waals son mayores y viceversa.

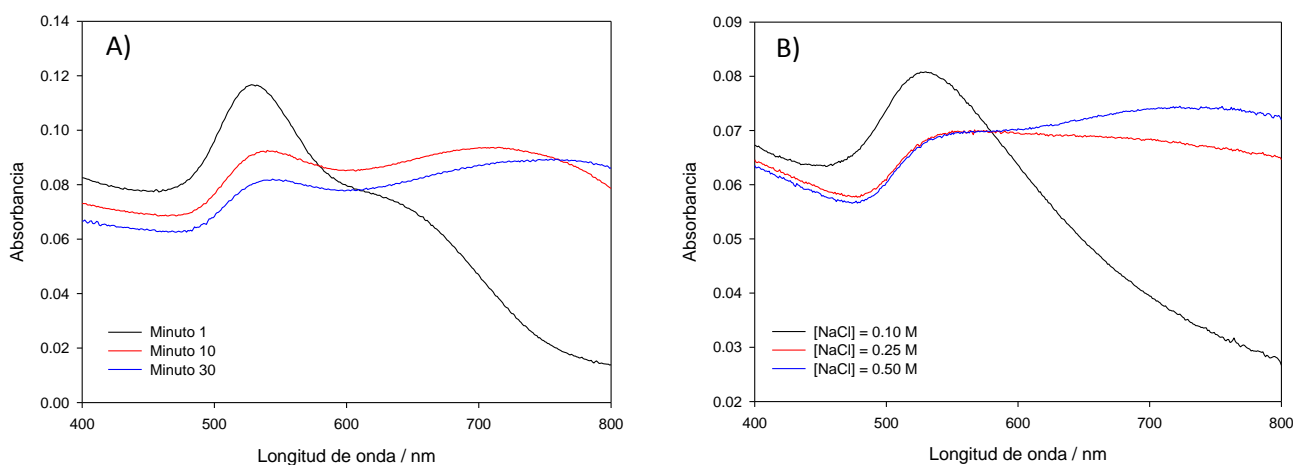


Figura 3.29. A) Espectros de absorción de AuNPs (27 nm) en presencia de NaCl a diferentes tiempos. $[\text{AuNPs}] = 4.7 \times 10^{-11} \text{ M}$, $[\text{NaCl}] = 0.075 \text{ M}$. B) Espectros de absorción de AuNPs (4.5 nm) a los 30 minutos de adicionar diferentes concentraciones. $[\text{AuNPs}] = 8.9 \times 10^{-9} \text{ M}$.

3.5. Efecto del disolvente en la banda de plasmón. Aplicación de la teoría de Mie

A pesar de los pocos estudios existentes, es importante conocer la influencia del disolvente en la intensidad y forma de la banda de plasmón. Debido a que por sí mismo el disolvente puede provocar modificaciones en la banda SPR¹⁷ se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de alcoholes tetraédricos (véase Figura 3.13) como el metanol, etanol, 2-propanol y el

tert-butanol con diferente grado de hidrofobicidad en la banda de plasmones de las nanopartículas de oro.

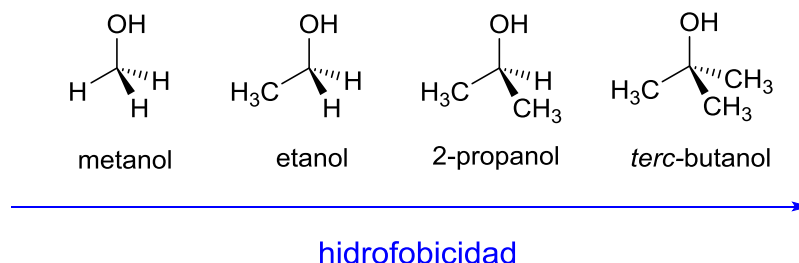


Figura 3.30. Estructura de los alcoholes tetraédricos utilizados en el presente estudio. Conforme se sustituyen hidrógenos por grupos metilos aumenta la hidrofobicidad del alcohol.

3.5.1. Efecto de alcoholes tetraédricos en la banda SPR de AuNPs

La Figura 3.14 muestra los efectos en la banda SPR provocados por la adición de diferentes cantidades de metanol y de etanol en la disolución. En el caso del alcohol más sencillo donde ningún hidrógeno ha sido sustituido por ningún grupo metilo (Figura 3.14A) no se observa ningún cambio en el color del coloide ni se aprecia movimiento del máximo del plasmón a ninguna proporción de metanol añadida. El color de las AuNPs permaneció rojo y las disoluciones fueron estables durante varios días. Un comportamiento similar se observó en las mezclas etanol-agua con la salvedad de que la banda SPR se desplazó ligeramente ($\Delta\lambda = 2$ nm), incluso a bajas cantidades del alcohol (véase Figura 3.14B).

El comportamiento es completamente diferente para el sistema 2-propanol/agua donde se observaron cambios en el espectro de absorción. Conforme aumenta la cantidad de 2-propanol, la posición del máximo de la SPR se desplaza a longitudes de ondas mayores y se genera un hombro a 620 nm (véase Figura 3.15A). Este cambio es incluso más pronunciado en las mezclas *tert*-butanol/agua, donde en lugar de un hombro se obtuvo una banda a 655 nm (véase Figura 3.15B)

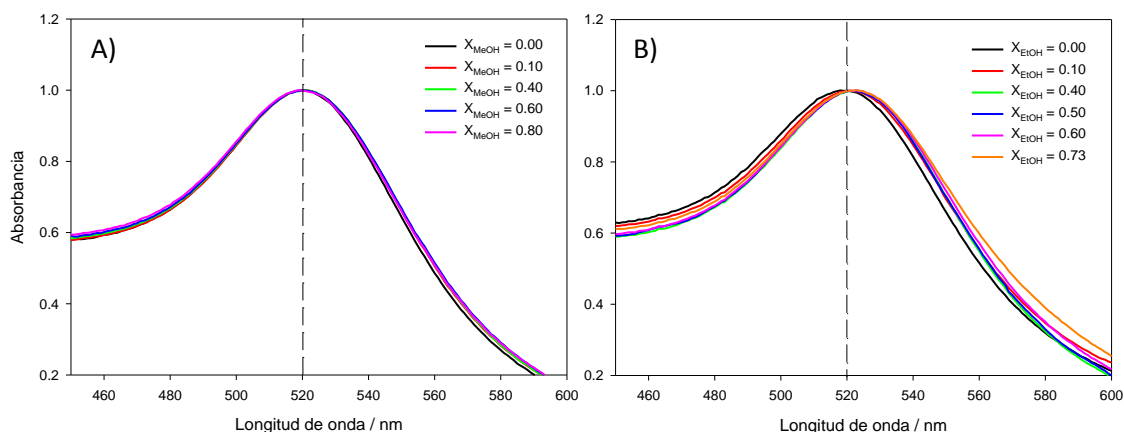


Figura 3.31. Espectros normalizados de AuNPs (15.4 nm) a diferentes proporciones de codisolvente: A) metanol; B) etanol. La línea discontinua marca la posición original de la banda SPR ($X_s = 0.00$), que corresponde con $\lambda = 520$ nm. $[\text{AuNPs}] = 2.9 \times 10^{-10}$ M.

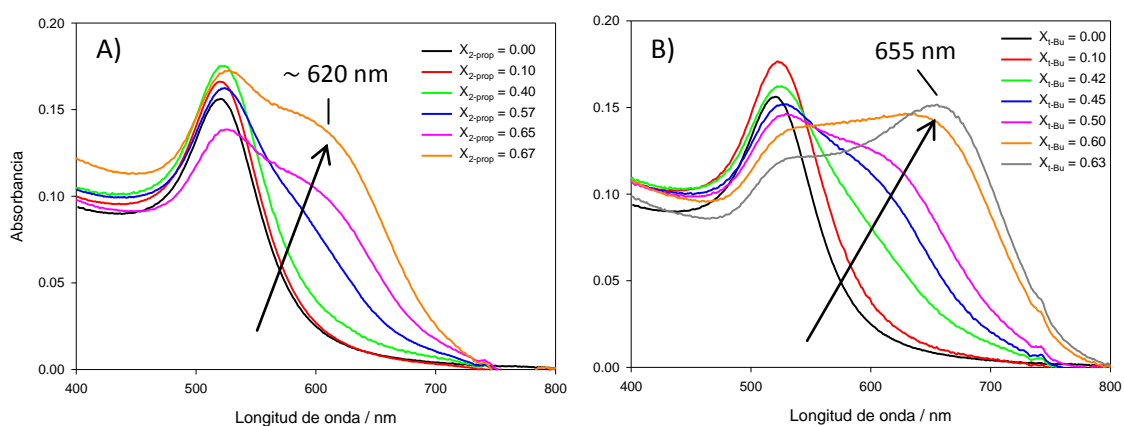


Figura 3.32. Espectros de absorción de AuNPs (15.4 nm) en presencia de diferentes fracciones molares de: A) 2-propanol, B) *tert*-butanol. $[\text{AuNPs}] = 2.9 \times 10^{-10}$ M.

La Figura 3.16 muestra la tendencia del grado de agregación (A_{631}/A_{520}) respecto a la concentración de 2-propanol y *tert*-butanol. Se puede observar que la pendiente para el *tert*-butanol ($\Delta A/\Delta X_{t\text{-BuOH}} = 3.32$) es mayor que la del 2-propanol ($\Delta A/\Delta X_{2\text{-prop}} = 2.88$). Además se observa como la aparición de la segunda banda en el *tert*-butanol tiene lugar a una fracción molar menor ($X_{t\text{-Bu}} = 0.42$) que el hombro en el caso del 2-propanol ($X_{2\text{-prop}} = 0.57$). Como se ha indicado antes, estos cambios colorimétricos no se observaron en los alcoholes más hidrofílicos (metanol y etanol). La Figura 3.17 muestra los colores de las muestras con los diferentes codisolventes a distintas fracciones molares. Resulta evidente que el aumento del

número de metilos provoca que los desplazamientos a longitudes de ondas mayores de la banda SPR sean más pronunciados.

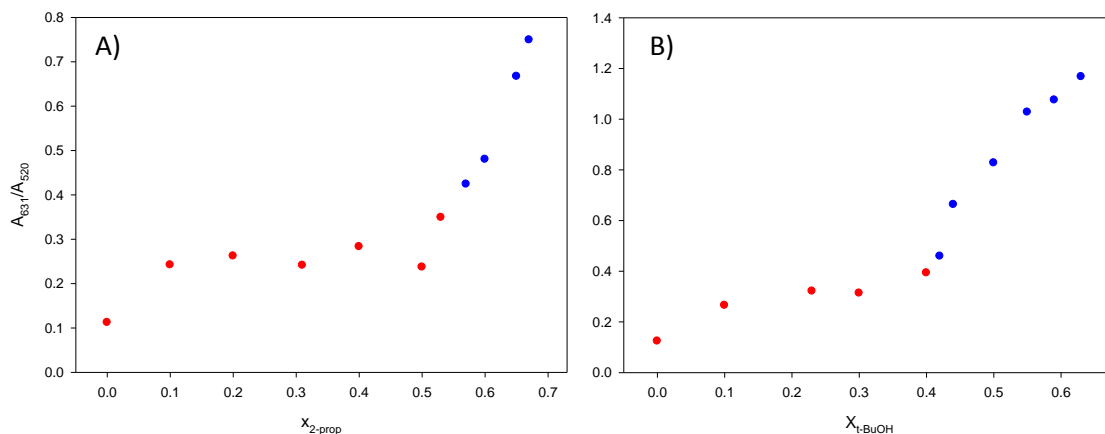


Figura 3.33. A_{631}/A_{520} de las AuNPs (15.4 nm) en función de la concentración de alcohol: A) 2-propanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.20, 0.32, 0.40, 0.50, 0.53, 0.57, 0.60, 0.65 y 0.67; B) *tert*-butanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.23, 0.30, 0.40, 0.42, 0.44, 0.50, 0.55, 0.60 y 0.63. El color rojo corresponde a los espectros donde no se observaron hombro o segunda banda, mientras que el color azul corresponde a los espectros que presentaron hombro o bandas adicionales.



Figura 3.34. Fotografía con muestras de AuNPs preparadas en diferentes mezclas alcohol-agua. La primera fila corresponde a *tert*-butanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.42, 0.50, 0.60 y 0.63. La siguiente corresponde al 2-propanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.40, 0.57, 0.65 y 0.67. La tercera fila corresponde al etanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 0.73. La última corresponde al metanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 0.80.

3.5.2. Análisis del efecto del disolvente a través de la teoría de Mie

Las variaciones en los espectros de absorción causadas por los alcoholes pueden deberse a un descenso de la constante dieléctrica del medio envolvente de las NPs. Cuando las partículas están lo suficientemente apartadas unas de otras como para considerar que no interactúan, la constante dieléctrica del medio presenta una gran influencia en la posición e intensidad de la banda SPR.^{17,130,131} Esta dependencia queda patente en la ecuación de Mie (Ecuación 1.2 ó 1.3). Por ello, con el fin de determinar la dependencia de la longitud de onda de la banda SPR con la polaridad del medio, se determinó la posición del máximo de la banda a diferentes índices de refracción (Figura 3.18) correspondientes a las mezclas alcohol-agua estudiadas. Concretamente se midieron los índices de refracción de las diferentes mezclas alcohol-agua a su máxima fracción molar (véase Tabla 3.2). Tomando dichos valores, se calcularon los espectros teóricos de acuerdo a la teoría de Mie (Figura 3.19). Como se puede observar, en el caso del metanol el espectro es idéntico al de las AuNPs en agua, mientras que en el caso del etanol se produce un leve ensanchamiento de la banda haciendo que el centro ésta quede desplazado unos 2 nm: estos datos coinciden con los obtenidos experimentalmente. Sin embargo los espectros obtenidos por la teoría de Mie para el 2-propanol y el *tert*-butanol distan considerablemente de los experimentales: no se observa hombro ni formación de una banda adicional y el desplazamiento batocrómico es mucho menor que el real ($\Delta\lambda_{\text{teor}} \sim 3\text{-}4$ nm).

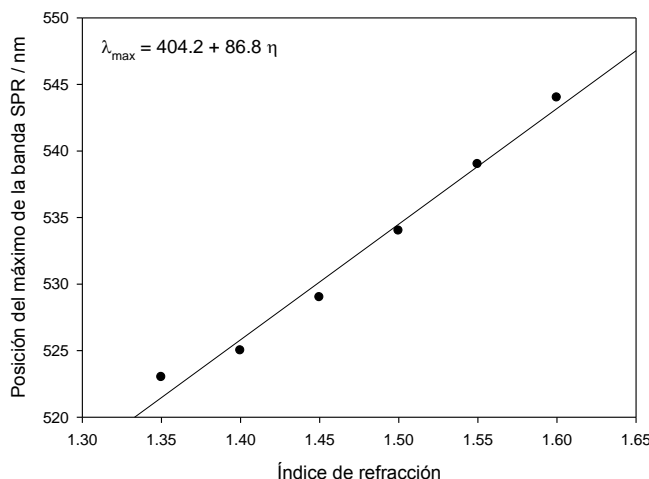


Figura 3.35. Variación de la longitud de onda de la banda SPR con el índice de refracción. Las longitudes de ondas fueron calculadas con el programa informático *MiePlot*, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹²

Tabla 3.4. Índices de refracción de soluciones coloidales de oro (15.4 nm) a la máxima fracción molar de los diferentes codisolventes estudiados. $[AuNPs] = 2.9 \times 10^{-10} M$

Codisolvente	X_s	n
Agua	1.00	1.3299
Metanol	0.80	1.3228
Etanol	0.73	1.3622
2-Propanol	0.67	1.3701
Terc-butanol	0.63	1.3803

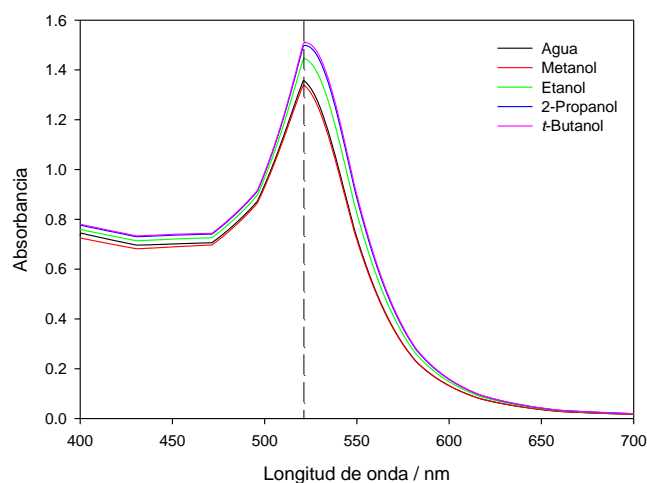


Figura 3.36. Espectros teóricos de AuNPs de 15.4 nm a la máxima fracción molar de cada codisolvente. Los espectros fueron calculados con el programa informático *MiePlot*, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹²

Con los datos de la Figura 3.18, a partir de los índices de refracción se obtuvo la posición teórica de la banda para la máxima fracción molar de cada alcohol y se contrastó con la obtenida experimentalmente (Tabla 3.3). Al comparar los valores teóricos con los experimentales, resulta evidente que los cambios colorimétricos en la solución coloidal para el 2-propanol y *terc*-butanol no son debidos a modificaciones en la constante dieléctrica del medio dispersante, o por lo menos no exclusivamente.

Tabla 3.5. Comparación de los desplazamientos de la banda SPR según la teoría de Mie con los obtenidos experimentalmente (en el caso de hombro o segunda banda, se considera el desplazamiento de la primera banda como referencia).

Codisolvente	X_s	$\Delta\lambda_{\text{teor}} / \text{nm}$	$\Delta\lambda_{\text{exp}} / \text{nm}$
Metanol	0.80	0	0
Etanol	0.73	2	2
2-Propanol	0.67	3	~ 10
Terc-butanol	0.63	4	~ 25

3.5.3. Interacción de los alcoholes con la superficie de las nanopartículas de oro

Como se indicó en el capítulo 1, la teoría de Mie no es aplicable si tienen lugar fenómenos de agregación ya que dicha teoría desprecia las interacciones entre los campos electromagnéticos de las NPs vecinas.²⁰ Por ello la única explicación plausible a estos espectros es que tenga lugar una cierta agregación de las nanopartículas a altas concentraciones de 2-propanol o *terc*-butanol. La Figura 3.20 muestra las imágenes de TEM para las disoluciones coloidales a la más alta fracción molar de cada disolvente, las cuales confirman la premisa de que los cambios en los espectros experimentales se deben mayormente a procesos de agregación. En el caso del metanol, las nanopartículas están dispersas (Figura 3.20A₁) con un tamaño lógico dentro de la distribución de tamaño de la solución coloidal original (Figura 3.20A₂). La misma situación se puede observar para el etanol (Figura 3.20B). Sin embargo, en las muestras con 2-propanol las imágenes TEM muestran agregación, con unas estructuras que superan los 60 nm (Figura 3.20C₂). La agregación es incluso mayor en el caso del *terc*-butanol (Figura 2.20D). Ciertamente Ning Gu y colaboradores han observado que NPs de 10 nm se agregan en forma de “racimos de uva” en vez de agregados lineales cuando éstas son dispersadas en etanol.¹³⁸ Sin embargo estos autores retiran el exceso de moléculas de citrato de disolución para transferir las NPs al disolvente orgánico. Es importante resaltar que han demostrado también que las AuNPs no se agregan cuando la concentración es menor de 3.3×10^{-6} M, situación que coincide con nuestro estudio donde la concentración es 2.9×10^{-10} M.

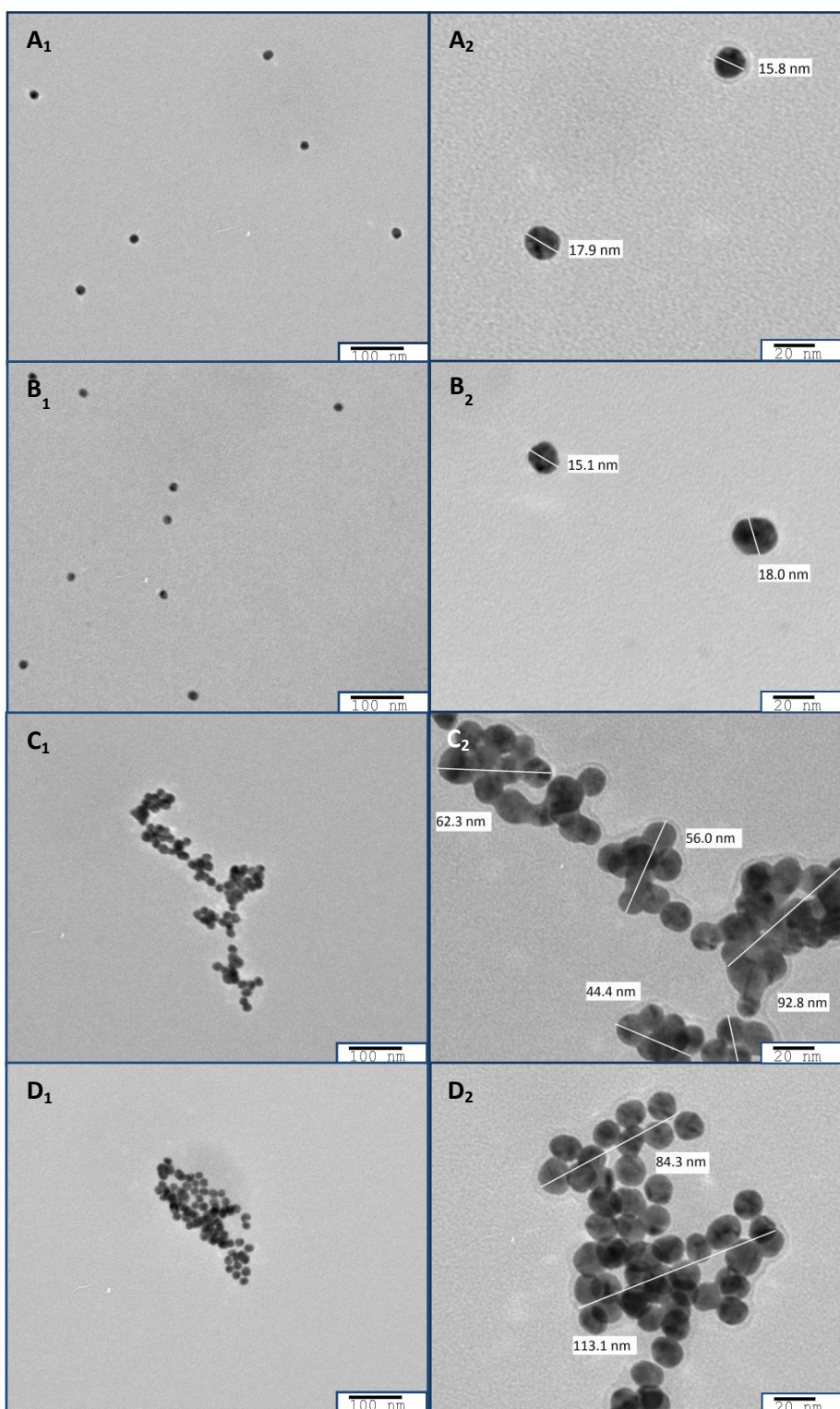


Figura 3.37. Imágenes TEM de AuNPs (15.4 nm) en mezclas agua-alcohol. A) AuNPs en presencia de metanol ($X_{\text{MeOH}} = 0.80$), B) AuNPs en presencia de etanol ($X_{\text{EtOH}} = 0.73$), C) AuNPs en presencia de 2-propanol ($X_{2\text{-prop}} = 0.67$), D) AuNPs en presencia de *tert*-butanol ($X_{t\text{-BuOH}} = 0.63$). $[\text{AuNPs}] = 2.9 \times 10^{-10}$ M.

Para comprobar que los agregados observados en las imágenes de TEM no son generados durante el proceso de preparación de muestras, donde tal y como se indica en el apartado experimental 10 microlitros de la disolución coloidal se dejan secar al aire sobre una rejilla de cobre, se midieron los tamaños en disolución por DLS. La Figura 3.21 muestra la distribución de diámetros hidrodinámicos (D_h) para AuNPs en agua y a las fracciones molares más altas de 2-propanol y *terc*-butanol. Los resultados concuerdan con los obtenidos por TEM, mostrando que el tamaño de las nanoestructuras es mayor que el de las nanopartículas libres dispersas en agua así como que el tamaño de los agregados es mayor en el *terc*-butanol. Las medidas por TEM y DLS confirman que el cambio de color conforme aumenta la hidrofobicidad del disolvente viene gobernado por un fenómeno de agregación de las AuNPs, más que por un cambio en la polaridad del disolvente empleado para dispersarlas.

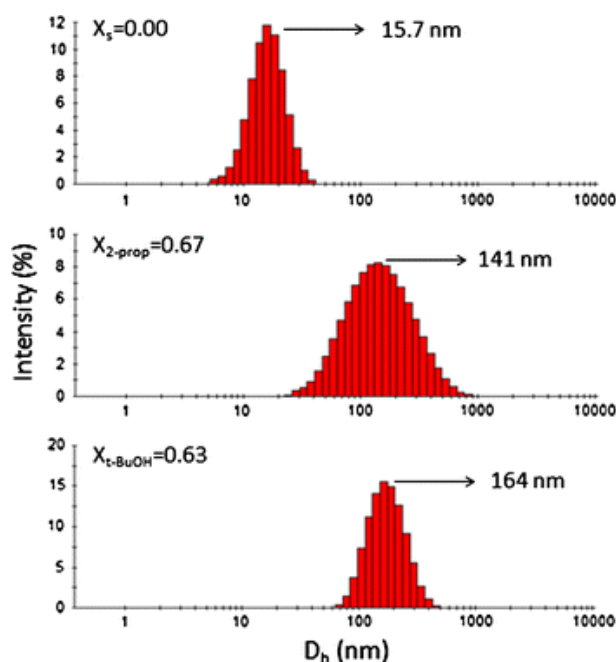
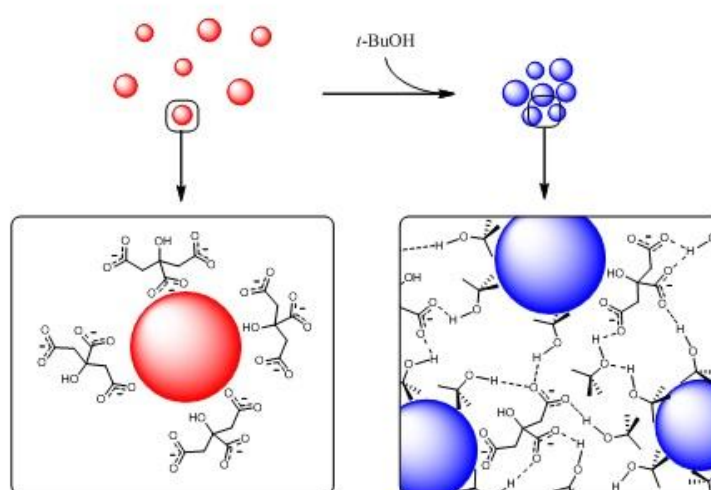


Figura 3.38. Medidas de intensidad de DLS de AuNPs (15.4 nm) en agua y en presencia de 2-propanol o *terc*-butanol. En todos los casos, el contenido de alcohol corresponde a la concentración más alta. [AuNPs] = 2.9×10^{-10} M.

Postulamos que la agregación se debe a una acumulación de moléculas de alcohol en las cercanías de la superficie de las AuNPs, como se muestra en el Esquema 3.2. Dichas moléculas de alcohol promoverían la agregación del sistema por la formación de puentes de hidrógenos no sólo entre las moléculas de alcohol, sino también entre moléculas de citrato y alcohol. Medidas de potencial ζ a varias concentraciones de *terc*-butanol (Tabla 3.4) muestran como éste disminuye conforme aumenta la cantidad de *terc*-butanol. Los iones citratos son desplazados parcialmente de la superficie de las AuNPs lo cual implica considerar una componente

electrostática además del mayor o menor carácter hidrofóbico de los alcoholes como responsables de los fenómenos de agregación observados. No obstante ni siquiera es necesario considerar la sustitución de los iones citrato por las moléculas de alcohol para justificar los cambios observados en la banda SPR: los valores de pK_a de los ácidos orgánicos (como el ácido cítrico) dependen de la constante dieléctrica del entorno, de manera que un aumento de la hidrofobicidad del medio conduciría a un aumento de los valores de pK_a ,¹³⁹ disminuyendo el grado de ionización de las moléculas de citrato, facilitando la agregación de las nanopartículas.



Esquema 3.2. Disposición estructural propuesta para la agregación de nanopartículas de oro en presencia de *tert*-butanol.

Tabla 3.6. Valores de potencial zeta (ζ / mV) de AuNPs de 15.4 nm en agua a diferentes fracciones molares de *tert*-butanol. [AuNPs] = 2.9×10^{-10} M.

$X_{t\text{-BuOH}}$	ζ / mV
0.00	-23.1 ± 1.5
0.23	1.44 ± 0.24
0.41	-3.40 ± 0.14
0.63	-9.90 ± 1.41

3.5.4. Estudio de la agregación por deconvolución de las bandas experimentales

Para analizar en profundidad los cambios observados en los espectros de absorción de las AuNPs, se procedió a la deconvolución de las bandas SPR con el objetivo de analizar de manera individual la contribución de cada banda al espectro global. Las figuras 3.22 y 3.23 muestran algunos ejemplos de los espectros deconvolucionados, donde la banda a menor longitud de onda (línea discontinua roja) se ha asociado a las nanopartículas libres mientras las bandas a longitudes de ondas mayores (líneas discontinuas verde y azul) se han asociado a las agregadas.

Los resultados de la deconvolución (Tabla 3.5) muestran una pequeña contribución (inferior al 10 %) de una segunda banda ($\lambda_2 = 565$ nm) en las nanopartículas dispersas en agua debido a los efectos de distribución de tamaño durante la síntesis del coloide. Mientras la FWHM es constante para la banda individual que representa a las nanopartículas libres, ésta aumenta para la segunda banda al aumentar la cantidad de alcohol, independientemente de que sea el 2-propanol o el *terc*-butanol. Los pequeños desplazamientos que se producen para la primera banda (λ_1) pueden ser explicados considerando los cambios de la constante dieléctrica del medio, los cuales coinciden con los obtenidos por Mie: $\Delta\lambda_1 = 3$ nm para el 2-propanol y $\Delta\lambda_1 = 4$ nm para el *terc*-butanol (véase Tabla 3.3).

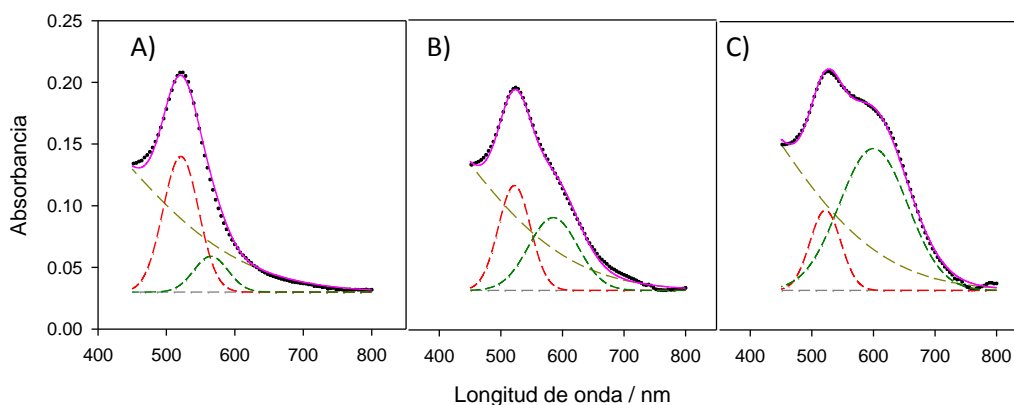


Figura 3.39. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (15.4 nm) para tres muestras diferentes del sistema agua/2-propanol: a) $X_{2\text{-prop}} = 0.10$; b) $X_{2\text{-prop}} = 0.57$; c) $X_{2\text{-prop}} = 0.67$. Los puntos representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que la línea discontinua verde corresponde a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla corresponde a la absorción de fondo debida mayormente a la dispersión de luz.

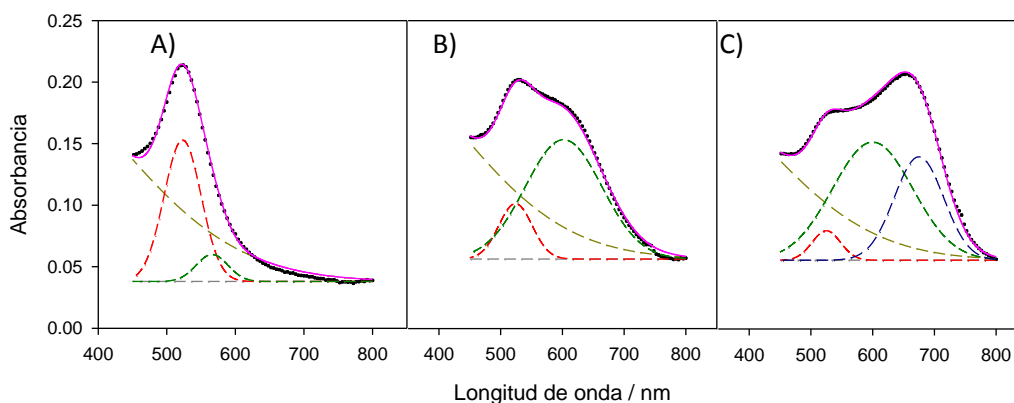


Figura 3.40. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (15.4 nm) para tres muestras diferentes del sistema agua/*tert*-butanol: a) $X_{t\text{-BuOH}} = 0.10$; b) $X_{t\text{-BuOH}} = 0.50$; c) $X_{t\text{-BuOH}} = 0.63$. Los puntos representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde y azul corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla corresponde a la absorción de fondo debida mayormente a la dispersión de luz.

Tabla 3.7. Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales de las diferentes muestras AuNPs en presencia de alcohol. El subíndice 1 se refiere a la banda correspondiente a las nanopartículas libres en disolución mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a las bandas de AuNPs que interaccionan con el alcohol.

2-propanol									
X_S	λ_1/nm	A_1	C_1/nm	λ_2/nm	A_2	C_2/nm	λ_3/nm	A_3	C_3/nm
0.00	521	0.104	25	565	0.010	20	-	-	-
0.10	521	0.110	26	565	0.029	25	-	-	-
0.31	521	0.090	25	565	0.028	25	-	-	-
0.40	522	0.110	25	567	0.028	25	-	-	-
0.50	522	0.100	25	572	0.024	30	-	-	-
0.57	522	0.085	26	585	0.059	40	-	-	-
0.60	522	0.070	27	588	0.060	45	-	-	-
0.65	522	0.060	27	598	0.081	50	-	-	-
0.67	522	0.065	25	600	0.115	56	-	-	-

<i>terc</i> -Butanol									
X_s	λ_1/nm	A_1	C_1/nm	λ_2/nm	A_2	C_2/nm	λ_3/nm	A_3	C_3/nm
0.00	521	0.104	25	565	0.010	20	-	-	-
0.10	523	0.115	27	566	0.022	23	-	-	-
0.30	523	0.111	26	571	0.023	23	-	-	-
0.42	524	0.077	27	583	0.057	50	-	-	-
0.50	524	0.045	27	602	0.097	62	-	-	-
0.55	525	0.027	24	602	0.109	68	662	0.030	33
0.63	525	0.024	23	600	0.096	65	675	0.084	40

La Figura 3.24 muestra los valores relativos de absorbancia en el máximo obtenidos por deconvolución. La línea continua roja corresponde a los valores relativos de absorbancia de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde y azul corresponden a las absorbancias relativas de las nanopartículas que interactúan entre ellas debido a los fenómenos de agregación inducidos por el alcohol. Como se puede observar, a bajas concentraciones de alcohol ($X_{2\text{prop}} = 0.00 - 0.50$ y $X_{t\text{-BuOH}} = 0.00 - 0.30$) la tendencia de las AuNPs a interactuar con el codisolvente es baja. Cuando el contenido de alcohol aumenta, se produce un aumento de absorbancia debido a la interacción mientras que decrece la de las AuNPs libres. El análisis de deconvolución confirma que la interacción es más efectiva en el *terc*-butanol que para el 2-propanol, ya que en el primero se producen más bandas propias de agregados de mayor tamaño y la agregación tiene lugar a concentraciones menores de codisolvente añadido respecto al segundo.

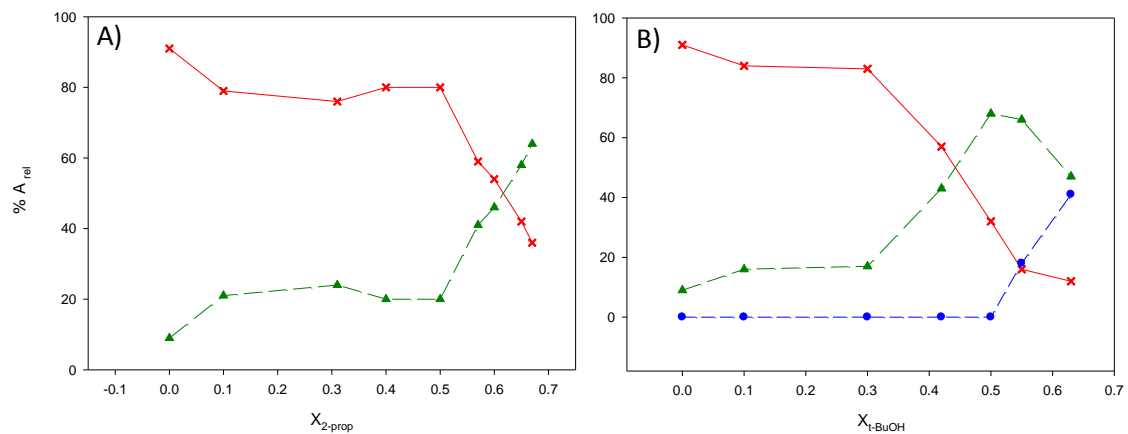


Figura 3.41. Evolución de los valores de absorbancia obtenidos por deconvolución con la concentración de: A) 2-propanol; B) *tert*-butanol. La línea roja corresponde a los valores provenientes de la primera banda, asociada a las AuNPs libres. Las líneas discontinuas verde y azul corresponden a los valores provenientes de la segunda y tercera banda obtenida, asociadas a la interacción de las AuNPs con las moléculas de alcohol.

4. Interacción de monómeros del ADN con nanopartículas de oro

4.1. Motivación, antecedentes y objetivos

La optimización de la adsorción del ADN en la superficie de las AuNPs ha generado un gran interés por doble motivo. Por una parte, la propia secuencia de un oligonucleótido afecta al grado de adsorción del mismo,^{60,81} el cual puede llegar a anular la capacidad de hibridación de las moléculas de ADN ancladas en AuNPs.⁸² Por otro lado, el diseño adecuado de la secuencia del oligonucleótido permite la adsorción de la molécula sin necesidad de enlaces covalentes. Así por ejemplo se ha demostrado que el uso de bloques de poliA genera un anclaje no covalente de los oligonucleótidos, siendo posible el control tanto de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la hibridación como de la densidad de superficie según la longitud de los bloques poliA.¹⁴⁰

Con el fin de explorar la capacidad de adsorción de oligonucleótidos anclados en la superficie de la AuNP (vía enlace S-Au), el grupo de Letsinger y Mirkin estudió la agregación producida por nucleósidos en el oro coloidal para establecer un orden de afinidad que extrapolar a ADN de cadena corta.⁶⁰ Para una concentración fija de AuNPs, observaron que la desoxicitidina (dC) presentaba la banda de agregación a 693 nm mientras que la desoxitimidina (dT) no provocaba agregación alguna ($\lambda_{\max} = 520$ nm). Entre estas dos situaciones extremas, la desoxiguanosina (dG) y la desoxiadenosina (dA) presentaban la banda a 667 nm y a 650 nm, respectivamente. De manera que establecieron el siguiente orden de afinidad: dC > dG > dA >> dT. Por otra parte, el mismo orden de afinidad fue obtenido para las nucleobases por calorimetría de titulación isotérmica (CTI),⁷¹ lo cual es lógico si se considera que la interacción del monómero con las AuNPs tiene lugar por la base.^{69,70}

En el caso de los nucleótidos, la adsorción de éstos produce un aumento en la estabilidad del coloide ya que se produce un aumento de la carga negativa en la superficie de la NP.¹⁴¹ Basándose en este hecho, Jun Yang y colaboradores estudiaron la protección ejercida por ellos al proceso de agregación de las AuNPs causado por el propio tampón del sistema (tampón

fosfato salino, PBS).⁴⁹ El orden de afinidad obtenido fue diferente al de los estudios anteriores: dAMP > dGMP > dCMP > dTMP. La diferencia en estos resultados puede ser justificada si se considera que las condiciones experimentales fueron diferentes en cada estudio: lo primero y más importante, se utilizaron nanopartículas de diferentes tamaños; el uso de diferentes tampones y trabajar a distinta fuerza iónica tiene una gran influencia en el monómero (véase capítulo 1), pudiendo alterar su interacción con las AuNPs;⁴⁸ las concentraciones empleadas, la proporción ligando/NP e incluso el tamaño de las alícuotas y muestras fueron diferentes. Los detalles de estas condiciones quedan recogidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.8. Condiciones experimentales de los estudios cualitativos de la interacción entre AuNPs y monómeros del ADN

Ganesh y Sastry⁷¹		Letsinger y Mirkin⁶⁰		Yang⁴⁹	
Tamaño de las AuNPs 6.5 nm		Tamaño de las AuNPs 16.2 nm		Tamaño de las AuNPs 5 nm	
[AuNPs]	[Base]	[AuNPs]	[Nucleósido]	[AuNPs]	[Nucleótido]
86.4 μ M	0.42 mM	6.4 nM	5 μ M	0.21 μ M	20.6 μ M
Orden de adición		Orden de adición		Orden de adición	
300 μ l B \rightarrow 1.47 ml AuNPs		1 μ l N \rightarrow 1 ml AuNPs		130 μ l N \rightarrow 500 μ l AuNPs	
Proporción		Proporción		Proporción	
5:1		781:1		100:1	

A pesar de la utilidad que presenta el conocer la interacción monómero-AuNPs, escasos estudios se han centrado en cuantificar dicha interacción así como en profundizar las diferencias entre las bases, nucleósidos y nucleótidos como acaba de describirse. Excluyendo un par de trabajos sobre la desorción de moléculas en películas finas de oro,^{142,143} en la bibliografía sólo se registra el trabajo antes mencionado por el equipo de Ganesh y Sartry.⁷¹ En éste, confirmaron por CTI que la interacción era exotérmica y dependiente del complejo formado; el rango de valores de energía comprendía desde -250 a -732 cal·mol⁻¹, y el orden de interacción seguía la tendencia: C > G > A > T. Los valores resultaron bajos comparados a los obtenidos con películas de oro,^{142,143} según los autores consecuencia de la necesidad de remover las moléculas que se encuentran en la superficie de las nanopartículas.⁴²

A raíz de lo expuesto queda patente que la necesidad de profundizar en el estudio de las interacciones monómeros-AuNPs, siendo el principal objetivo del presente capítulo el establecimiento de los órdenes de afinidad de forma cuantitativa. Además, ante la ausencia de trabajos donde se estudie la influencia de la complejidad del monómero en la interacción, se pretende determinar cuantitativamente la interacción de un nucleósido y de un nucleótido

monofosfato con el fin de compararlo con su respectiva base. Un último objetivo adicional del presente capítulo es el estudio de la influencia del pH en la interacción monómero-AuNPs.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

La adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T), adenosina (Ad), adenosina monofosfato (AMP) y el NaCl fueron adquiridos de la casa comercial Merck. Todos los reactivos se utilizaron sin ninguna purificación previa. Las disoluciones se prepararon en agua desionizada, siendo su conductividad menor a $10^{-6} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$. Las nanopartículas de $14.8 \pm 1.8 \text{ nm}$ fueron sintetizadas y caracterizadas como se describió en el Capítulo 3.

4.2.2. Espectros de absorción en el UV-vis

4.2.2.1. Espectros de absorción para la titulación de monómeros con AuNPs

Los espectros de cada muestra fueron registrados una hora después de añadir el monómero a estudiar (base o nucleósido), tiempo en el que los espectros eran prácticamente invariables, tomándose éste como límite máximo de la medida. Las experiencias se realizaron con AuNPs de 14.8 nm, a concentración fija $[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$, en presencia de distintas cantidades de monómero en el intervalo en el que se producía el cambio de color de las muestras. 200 μl de la solución coloidal sintetizada fueron añadidos en una cubeta de cuarzo para posteriormente añadirles 1800 μl de una alícuota con concentración variable del ligando, para posteriormente reservarla en un termobloque (a 298 K) hasta la determinación del espectro.

Las titulaciones se realizaron un mínimo de tres veces para comprobar la reproducibilidad del sistema. Se comprobó el valor de pH y la posible variación a diferentes concentraciones de monómero, siendo ésta: $\text{pH} = 6.2 \pm 0.2$.

En el caso de las experiencias a diferente pH, en la cubeta se añadió 100 μl de HCl ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$) o de NaOH ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$) según el pH del sistema. Posteriormente se añadió 1700 μl de una alícuota con concentración variable de adenina. Por último se añadieron 200 μl de la solución coloidal para posteriormente reservarla en un termobloque (a 298 K) hasta la determinación del espectro.

4.2.2.2. Espectros de absorción para el estudio de protección a la agregación del AMP

Los espectros de cada muestra fueron registrados 30 minutos después de la adición de NaCl. A los 30 minutos los espectros eran prácticamente invariables, tomándose este tiempo como límite máximo de la medida. Las experiencias se realizaron con AuNPs de 14.8 nm, a concentración fija $[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M y $[NaCl] = 0.075$ M y a distintas cantidades de AMP. 200 μ l de la solución coloidal sintetizada fueron añadidos en una cubeta de cuarzo para posteriormente añadirles 1600 μ l de una alícuota con concentración variable de AMP. Finalmente la adición de 200 μ l de NaCl (0.75 M) se tomó como tiempo cero, y la muestra se reservó en un termobloque (a 298 K) hasta el registro del espectro.

Los espectros se repitieron un mínimo de tres veces con diferentes muestras para comprobar la reproducibilidad del sistema. Se comprobó si la adición de AMP a diferentes concentraciones provocaba variaciones del pH, obteniéndose: $pH = 6.2 \pm 0.1$.

4.2.2.3. Espectros de absorción para el estudio cinético de las interacciones de las bases con las AuNPs

La reacción se siguió a través de los cambios de los valores de absorbancia a 520 nm (posición de la banda asociada a las nanopartículas dispersas) y a una longitud de onda asociada al agregado de mayor tamaño ($\lambda = 671$ nm para la adenina, $\lambda = 635$ nm para la timina y $\lambda = 684$ nm para la citosina) para el proceso de agregación de las AuNPs. La temperatura se mantuvo constante a 298 K. La concentración de oro se mantuvo constante: $[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M.

4.2.3. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones

Los espectros de cada muestra fueron registrados una hora después de añadir la base a estudiar, siendo la concentración de éstas 10^{-3} M. La temperatura de medición (a no ser que se indique lo contrario) fue 278 K. La muestra de oro coloidal en ausencia de las bases era de una concentración 2.7×10^{-9} M (y por lo tanto 10^{-3} M de citrato); la concentración de nanopartículas en las muestras que contenían adenina o timina fue 9.1×10^{-10} M (y de citrato 3.5×10^{-4} M).

Para los espectros que requirieron una señal de referencia, se añadieron a las muestras el ácido 3-(trimetilsilil)-2,2,3,3-tetradeuteradopropánico (TMSP) como molécula referente. Todas las muestras en ausencia de TMSP se prepararon con 540 μ l de disolución acuosa protonada y 60 μ l de agua deuterada. Las muestras que necesitaron referente se prepararon con 540 μ l de disolución acuosa protonada, 50 μ l de agua deuterada y 6 μ l de TMSP.

La secuencia de pulsos para los experimentos de *excitation sculpting water suppression* fue: $zgesgp; p90^\circ (12.7 \text{ W}) = 8.45 \mu\text{s}$ (con forma SMSQ10.100). Se utilizaron gradientes en el eje Z de 1 ms de duración y amplitudes del 31% y 11% respectivamente para el módulo de *excitation sculpting*. El ancho espectral fue de 16 ppm (para los espectros de la adenina) y de 25 ppm (para los espectros de la timina) centrado en la señal del agua. La señal del agua se invirtió selectivamente mediante un pulso con forma (Sinc1.1000) de 2.4 ms. Y se registraron 16 *scans*. El espectro se procesó con un factor de ensanchamiento ($\Delta\nu$) de 3 Hz con una función ventana exponencial.

En el caso de los experimentos WaterLOGSY, la señal del agua se invirtió mediante un pulso gaussiano de 180° (Gaus1_180i.1000). El tiempo de mezcla waterLOGSY fue de 1.5 s durante el cual se aplicó un gradiente rectangular de baja intensidad (0.2%). La intensidad de la señal del agua se suprimió mediante una secuencia de *excitation sculpting*. El ancho espectral fue de 16 ppm en el caso de la adenina o de 25 ppm en el caso de la timina, y se registraron 32 *scans*. El espectro se procesó con un factor de ensanchamiento ($\Delta\nu$) de 3 Hz con una función ventana exponencial.

4.2.4. Medidas de índice de refracción

Las medidas de los índices de refracción de las disoluciones a diferentes cantidades de base se realizaron con ayuda de un refractómetro digital Abbe “WYA-1S”. Basado en la calibración con disoluciones de índice de refracción conocido, el error absoluto estimado fue ± 0.0004 .

4.2.5. Obtención de los parámetros CIELab

La conversión de las medidas de transmitancia a los parámetros del sistema cromático CIELab se llevó a cabo por el uso de ecuaciones estándares CIE para convertir medidas experimentales de transmitancia a valores cromáticos XYZ, y entonces a $L^*a^*b^*$.

4.2.6. Análisis de deconvolución

La deconvolución de los espectros experimentales se realizó con la ayuda del programa *Fityk*.¹¹⁵ En todos los casos las bandas asociadas a la Resonancia del Plasmón Superficial de las nanopartículas fueron ajustadas a funciones Voigt. El modelo de deconvolución considera que la banda de las AuNPs dispersas es la centrada alrededor de 522 nm, mientras que las bandas

con mayores longitudes de onda se asocian a diferentes estructuras de aglomerados. Además se fijó una banda (función gaussiana) a 400 nm para corregir el efecto de dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.¹³² En todos los casos el error de análisis entre el espectro simulado y el experimental resultó ser menor del 5%.

4.3. Interacción de las nucleobases con nanopartículas de oro

4.3.1. Adenina

La gran capacidad del oro coloidal como biosensor queda reflejada en la Figura 4.1, que muestra la evolución de la banda SPR y los cambios colorimétricos de AuNPs (14.8 nm) en presencia de diferentes concentraciones de adenina. A bajas concentraciones (1.00×10^{-7} a 3.50×10^{-7} M) se detectó un leve ensanchamiento de la banda, sin causar cambio colorimétrico alguno en las muestras (celdas 1-4 en la Figura 4.1). Sin embargo, cuando se generó el hombro (línea discontinua roja, [adenina] = 3.75×10^{-7} M) se observó que las muestras adquirieron un tono morado que se torna azul conforme la definición de la banda de agregación mejoraba.

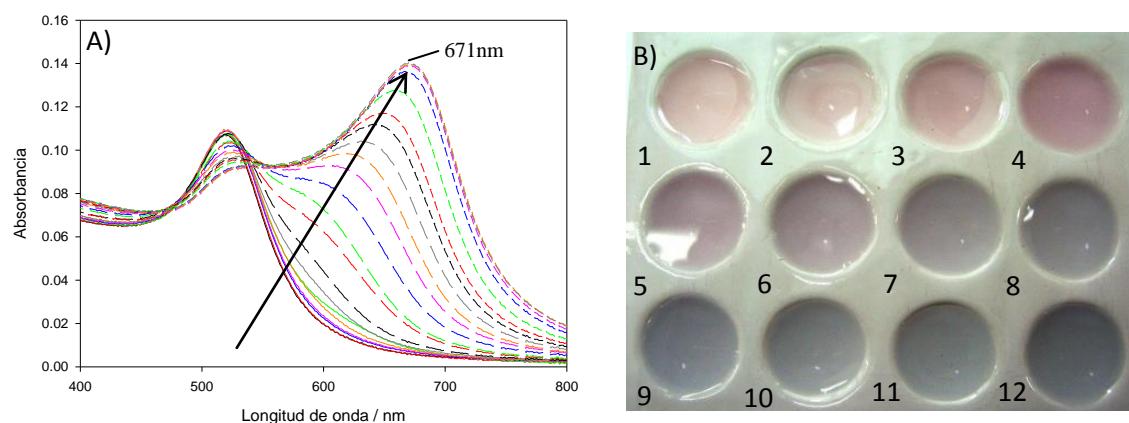


Figura 4.42. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir la base y corresponden a un intervalo de [adenina] = 1.00×10^{-7} a 1.00×10^{-6} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la adenina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenina: 1) 0.00 M; 2) 3.00×10^{-7} M; 3) 3.25×10^{-7} M; 4) 3.5×10^{-7} M; 5) 3.75×10^{-7} M; 6) 4.00×10^{-7} M; 7) 4.25×10^{-7} M; 8) 4.50×10^{-7} M; 9) 4.75×10^{-7} M; 10) 5.00×10^{-7} M; 11) 5.25×10^{-7} M; 12) 1.00×10^{-6} M.

La Figura 4.2 muestra la evolución del grado de agregación (A_{671}/A_{520} : proporción de la absorbancia a 671 nm, donde se posiciona la banda asociada a las AuNPs agregadas con la absorbancia de las AuNPs libres, cuya banda se encuentra a 520 nm) a distintas cantidades de adenina. La tendencia obtenida fue sigmoïdal: a altas concentraciones se produce la saturación

de las AuNPs. Sin embargo se puede observar un ligero descenso en los últimos puntos. Al medir los espectros de las AuNPs a concentraciones más altas de adenina ($[A] > 10^{-6}$ M) se observó que se producía un retroceso en la agregación de 9 nm en la posición de la banda (Figura 4.3). Este fenómeno puede deberse a la formación de dímeros de adenina,¹⁴⁴ que conllevaría a que la concentración de adenina en disolución no fuese la real que interacciona con las nanopartículas.

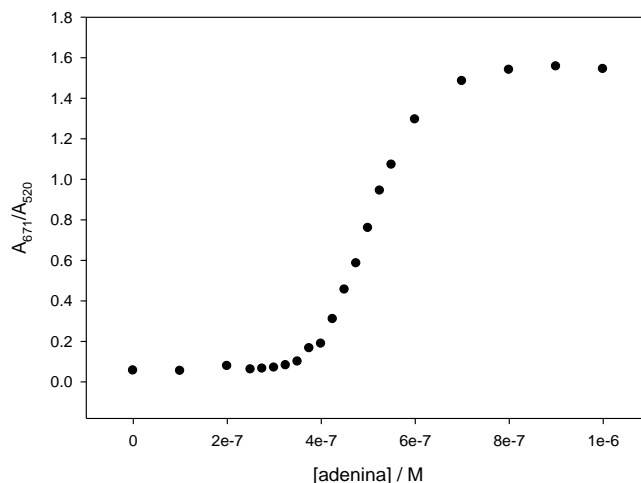


Figura 4.43. Evolución del grado de agregación (A_{671}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de adenina.

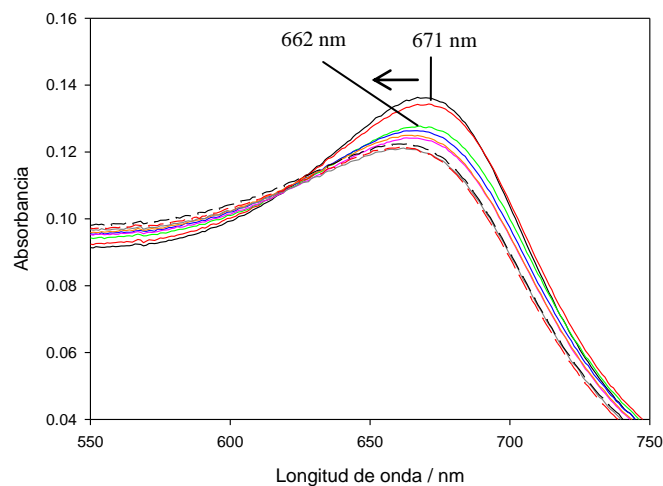


Figura 4.44. Espectros de UV-visible de AuNPs en el rango de concentración de adenina donde se produce la reversión en la agregación (1.00×10^{-6} a 9.00×10^{-6} M). Las marcas indican la posición de la banda de agregación antes y después de la reversión.

La variación de absorbancia a 671 nm por cada nanopartícula ($\Delta\text{Abs}/[\text{AuNPs}]$) con la proporción ligando/receptor ($[\text{adenina}]/[\text{AuNPs}]$) mostró dos partes lineales (Figura 4.4), de cuya intersección se obtuvo el número de moléculas de adenina por NP implicadas en el proceso.¹⁴⁵ Por el mismo procedimiento, con tres valoraciones diferentes de adenina con AuNPs, se obtuvo un valor medio de 1900 ± 100 moléculas de adenina por NP. Aunque sería posible obtener dicho valor a partir del punto de saturación (véase Figura 4.2), este procedimiento requiere establecer dicho punto con mucha precisión ya que de lo contrario se obtendrían valores distantes al mencionado (véase Anexo 1 para una discusión en mayor profundidad).

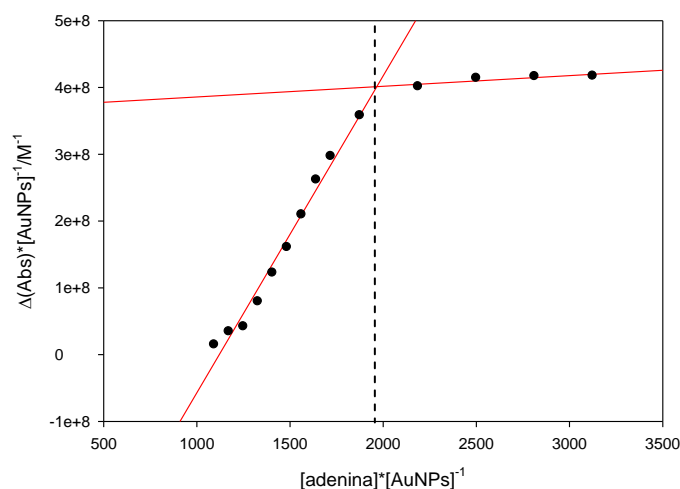


Figura 4.45. Determinación del número de moléculas de adenina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 671 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M.

La Figura 4.5 muestra la cinética del proceso de agregación para tres concentraciones diferentes de adenina, donde se puede observar que la velocidad de dicha agregación aumenta conforme lo hace la concentración de adenina. De hecho a la concentración más alta (10^{-6} M) se observa que la agregación se ha completado sobre los 10 minutos al considerar los valores de absorbancia a 671 nm (Figura 4.5B); sin embargo cuando se contrasta con la misma serie de datos pero a 520 nm se observa que la cantidad de AuNPs libres sigue disminuyendo. Esto es debido a que la agregación no sólo afecta a la intensidad de la banda, sino a la anchura de la misma como se pudo observar en la Figura 3.11B y 3.11C; de manera que realmente se siguen formando agregados, aumentando la distribución del tamaño aunque la posición de la banda se mantenga. Por ello para una concentración 4×10^{-7} M se sigue observando un consumo de reactivo (AuNPs libres) aunque la producción de agregados es casi despreciable, ya que se están formando estructuras de un tamaño inferior a las que le corresponden una banda SPR asociada a los 671 nm.

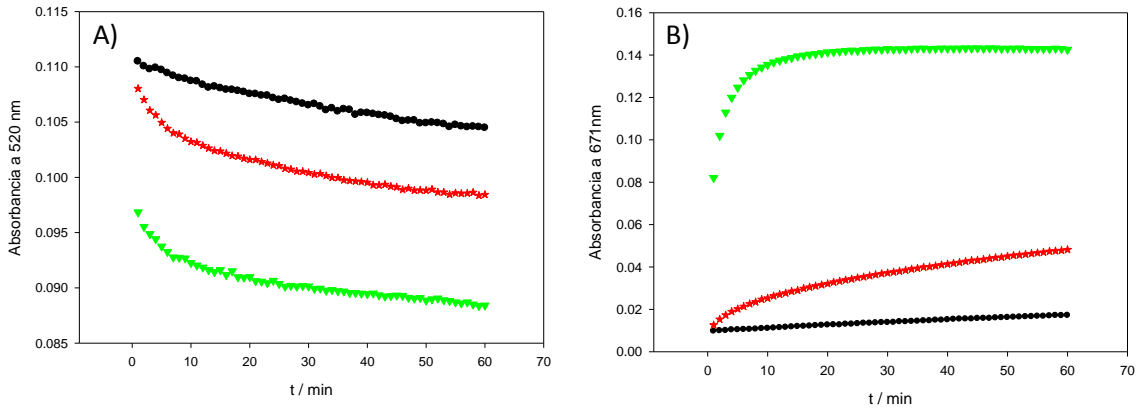
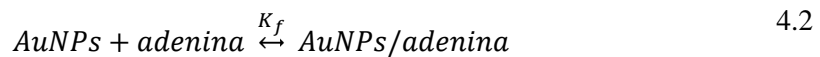


Figura 4.46. Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ($[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$) en presencia de diferentes concentraciones de adenina. Las concentraciones de adenina son: $4.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ (círculos negros), $5.00 \times 10^{-7} \text{ M}$ (estrellas rojas) y $1.00 \times 10^{-6} \text{ M}$ (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponde a las nanopartículas libres; B) 671 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas.

Para la cuantificación de la interacción entre la adenina y las AuNPs se utilizó la ecuación de Benesi-Hildebrand como método de ajuste:¹⁴⁶

$$\frac{[AuNPs]_0}{P} = \frac{1}{K_f \cdot \epsilon \cdot [S]_0} + \frac{1}{\epsilon} \quad 4.1$$

donde K_f es la constante de formación del complejo, P es la propiedad medida, ϵ es un coeficiente que depende de P , y S hace alusión a la biomolécula que actúa como sustrato, en este caso adenina. Para un uso correcto de dicha ecuación es necesario que exista una correlación de primer orden entre la propiedad P y la concentración del complejo; de hecho, la ecuación original se aplica para la absorbancia, siendo P ésta y ϵ el coeficiente de absorción molar a la longitud de onda a la que se tomó la absorbancia. Si se considera que el sistema a estudiar viene descrito por la siguiente expresión:



a partir de los datos de la banda SPR correspondiente a las AuNPs agregadas se puede obtener la constante de unión y por extensión la energía libre del proceso (ΔG^0) para el complejo AuNPs/adenina, ya que las diferentes bandas SPR están directamente asociadas a la concentración del complejo (a través de la ley de Lambert-Beer).

La Figura 4.6 muestra el ajuste de las relaciones de absorbancia a 671 y 520 nm (A_{671}/A_{520}) para el intervalo de $[adenina] = 3.25 \times 10^{-7} - 5.25 \times 10^{-7} \text{ M}$, rango en el que se produce la linealidad. Del ajuste se obtuvo un valor medio de $K_f = (2.0 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, que corresponde a una energía libre de unión $\Delta G^0 = -35.9 \pm 0.2 \text{ kJmol}^{-1}$. Se utilizó el grado de

agregación en lugar de las absorbancias de forma individual para corregir errores. Los valores calculados de la constante de unión a partir de las absorbancias a diferentes longitudes de onda se muestran en la Tabla 4.2. En dicha tabla los valores procedentes de las AuNPs libres (A_{520}) son muy diferentes a los obtenidos con A_{671} y A_{671}/A_{520} , debido a que la variación de absorbancia a dicha longitud de onda es tan pequeña que conlleva errores importantes.

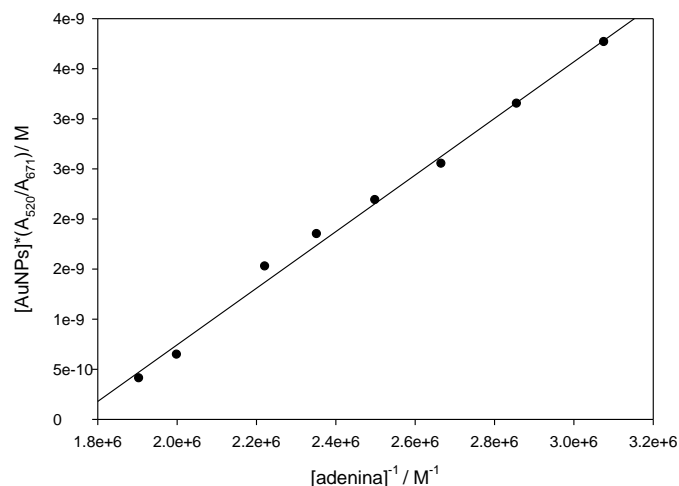


Figura 4.47. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{671}/A_{520} en el intervalo $[adenina] = 3.25 \times 10^{-7}$ a 5.25×10^{-7} M.

Tabla 4.9. Constantes de unión obtenidas para cada tanda de titulación con adenina usando los valores de absorbancia a 520 y 671 nm, así como la proporción entre estos (A_{671}/A_{520}).

	$\lambda=520$ nm	$\lambda=671$ nm	A_{671}/A_{520}
$K_f/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$	9.07×10^6	2.03×10^6	2.08×10^6
	1.10×10^7	1.99×10^6	2.05×10^6
	2.31×10^7	1.71×10^6	1.74×10^6
$\bar{K}_f/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$	$(1.4 \pm 0.8) \cdot 10^7$	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^6$

El uso de la ecuación de Benesi-Hildebrand con valores de absorbancia presenta un gran inconveniente en este sistema: no tiene en consideración el ensanchamiento de las bandas. Una forma de solventar esta desventaja es el uso de parámetros que tengan en cuenta la forma y cambio de la banda, como son los relacionados con los colores de las muestras o las áreas de las bandas.

Para comparar los valores calculados por absorbancia, los espectros se convirtieron en parámetros colorimétricos siguiendo la teoría CIELab (véase Capítulo 2). La Figura 4.7 muestra la variación de a^* y b^* a diferentes concentraciones de adenina; el valor asociado al

brillo de la muestra (L^*) osciló entre 92 - 94. En el rango de concentraciones $1.00 \times 10^{-7} - 3.25 \times 10^{-7} \text{ M}$ la componente roja ($a^* > 0$) predominó respecto a la componente amarilla ($b^* > 0$), mostrando en ese rango las muestras mostraban en el color rojo característico de las AuNPs dispersas. Sin embargo, en el estrecho rango de $3.25 \times 10^{-7} \text{ M} - 4.25 \times 10^{-7} \text{ M}$, el valor de a^* descendió y comenzó a despuntar la componente azul ($b^* < 0$), lo que originó un color morado. A partir de $4.25 \times 10^{-7} \text{ M}$ la componente b^* superó a la a^* , y el color de la muestra pasó a ser el azul.

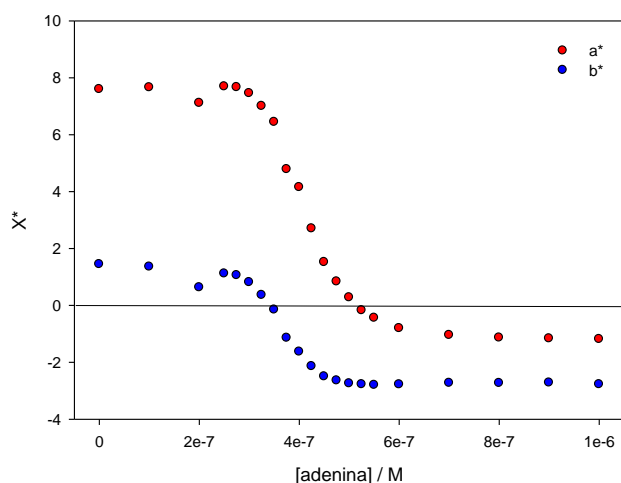


Figura 4.48. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de adenina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 93 \pm 1$.

Cuando dichos parámetros se representaron gráficamente según el método de Benesi-Hildebrand, se obtuvo una tendencia asintótica tanto para a^* como para b^* (Figura 4.8): transiciones de valores positivos a negativos de los parámetros colorimétricos provoca la aparición de una asíntota al aplicar la ecuación 4.1. Esto genera una deformación de la tendencia lineal si dicha transición se produce en la zona de cambio, provocando una reducción del número de puntos que componen la recta. En el caso de la adenina, un ajuste lineal en un intervalo pequeño de concentraciones (véase las ampliaciones de los gráficos en la Figura 4.8) proporcionó valores muy próximos a los hallados a partir de las absorbancias [para a^* la $K_f = (2.3 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$; para b^* la $K_f = (2.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$].

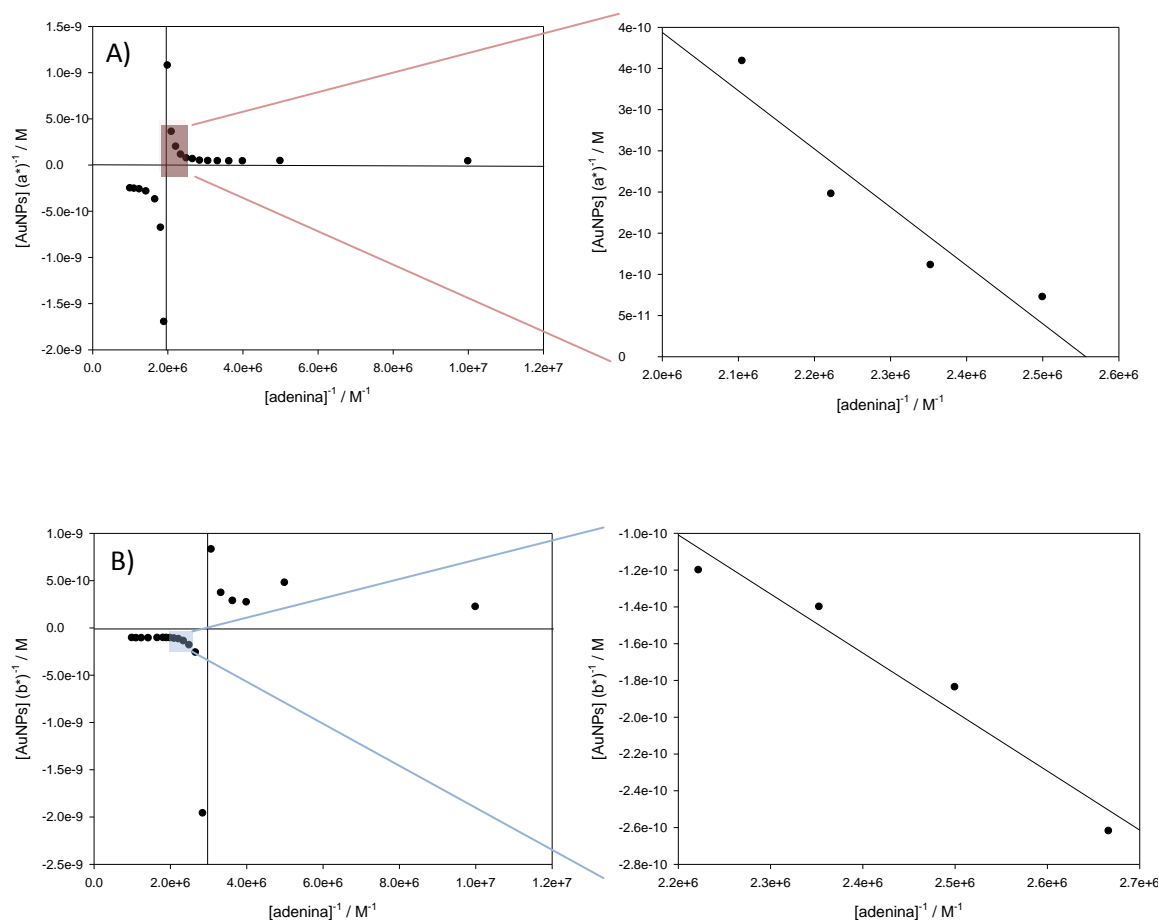


Figura 4.49. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab. A) Ajuste del parámetro a^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo $[\text{adenina}] = 4.00 \times 10^{-7} - 4.75 \times 10^{-7} \text{ M}$. B) Ajuste del parámetro b^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo $[\text{adenina}] = 3.75 \times 10^{-7} - 4.50 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Otro parámetro utilizado para la determinación de la constante de unión fueron las áreas de las bandas asociadas a las AuNPs agregadas. Para cada espectro experimental de absorbancia se obtuvieron las bandas individuales halladas por deconvolución asociadas a las AuNPs libres y las AuNPs agregadas (véase Figura 4.9). Los espectros muestran que se originan diversas bandas para las nanopartículas agregadas, que se atribuyen a la formación de diferentes estructuras de agregados. En la tabla 4.3 se muestran los parámetros (λ y área) de las distintas bandas obtenidas para cada concentración de adenina en el análisis de deconvolución. En esta tabla también se presenta la proporción de área de las AuNPs libres (A_{libre}) y de las AuNPs agregadas (A_{agreg}). El ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand de los valores de áreas asociados a las AuNPs agregadas obtenidos por deconvolución proporcionó un valor de $K_f = (1.6 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (véase Figura 4.10), lo que es igual a $\Delta G^0 = -35.3 \pm 0.6 \text{ kJmol}^{-1}$, muy cercano al obtenido por los métodos anteriormente descritos.

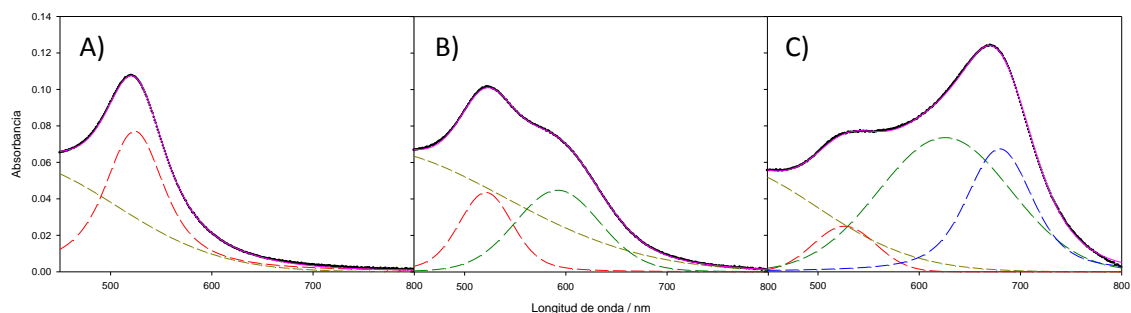


Figura 4.50. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos para tres concentraciones diferentes de adenina: A) 2.50×10^{-7} M; B) 4.00×10^{-7} M; C) 1.00×10^{-6} M. Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que la línea discontinua verde corresponde a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.

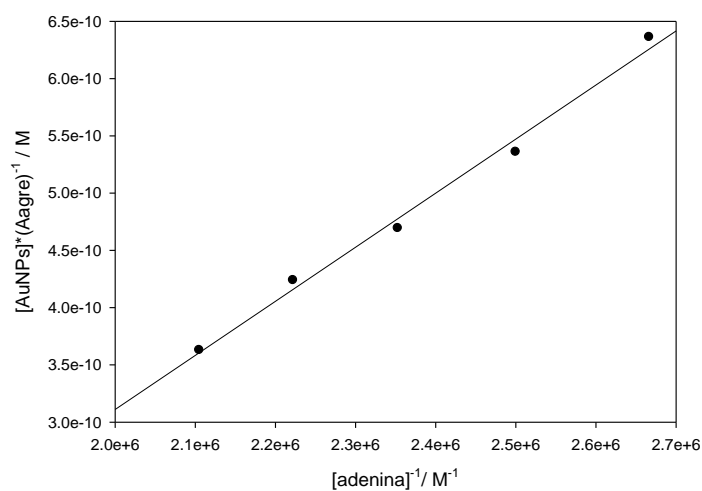


Figura 4.51. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo $[\text{adenina}] = 3.75 \times 10^{-7}$ M a 4.75×10^{-7} M.

Tabla 4.10. Parámetros obtenidos por deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de adenina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.

[Adenina]/ M	λ_1/nm	Área ₁	λ_2/nm	Área ₂	λ_3/nm	Área ₃	A _{libre}	A _{agre}
0.00	522	7.366	-	-	-	-	1.000	0.000
1.00 x10⁻⁷	522	9.967	-	-	-	-	1.000	0.000
2.00 x10⁻⁷	525	6.796	-	-	-	-	1.000	0.000
2.50 x10⁻⁷	524	7.974	-	-	-	-	1.000	0.000
2.75 x10⁻⁷	524	7.552	-	-	-	-	1.000	0.000
3.00 x10⁻⁷	524	6.967	581	0.795	-	-	0.898	0.102
3.25 x10⁻⁷	523	7.161	583	2.523	-	-	0.739	0.261
3.50 x10⁻⁷	523	5.144	584	2.430	-	-	0.679	0.321
3.75 x10⁻⁷	522	7.639	592	7.733	-	-	0.497	0.503
4.00 x10⁻⁷	521	3.297	591	4.888	-	-	0.403	0.597
4.25 x10⁻⁷	522	2.786	605	5.974	-	-	0.318	0.682
4.50 x10⁻⁷	526	3.009	576	1.190	623	8.085	0.245	0.755
4.75 x10⁻⁷	519	1.733	597	7.960	644	5.005	0.118	0.882
5.00 x10⁻⁷	521	2.145	610	9.265	654	4.403	0.136	0.864
5.25 x10⁻⁷	524	3.636	618	9.997	661	5.204	0.193	0.807
5.50 x10⁻⁷	525	3.047	593	4.490	660	10.772	0.166	0.834
6.00 x10⁻⁷	523	2.049	622	12.094	671	5.412	0.105	0.895
7.00 x10⁻⁷	526	2.589	600	8.008	674	11.03	0.120	0.880
8.00 x10⁻⁷	528	3.158	604	6.382	677	12.266	0.145	0.855
9.00 x10⁻⁷	524	1.697	607	7.840	679	11.40	0.081	0.919
1.00 x10⁻⁶	526	1.936	625	12.033	679	6.701	0.094	0.906

4.3.2. Timina

De forma análoga al procedimiento realizado con la adenina, se estudió la variación de la banda SPR de AuNPs (de 14.8 nm) a distintas concentraciones de timina. Como muestra la Figura 4.11, la posición de la banda de las AuNPs agregadas se encuentra a una longitud de onda menor (635 nm) que en el caso de la adenina (671 nm). Por ello el cambio colorimétrico de rojo a azul de la serie tuvo lugar a concentraciones mayores de base (compárese la Figura 4.11B con la Figura 4.1B). Aunque estos resultados encajen con los estudios bibliográficos previos donde la interacción de la timina con la superficie del oro era menor que la de la adenina, se produce una divergencia ya que se observa agregación (proceso que no se apreciaba en el estudio de Mirkin y Letsinger).⁶⁰

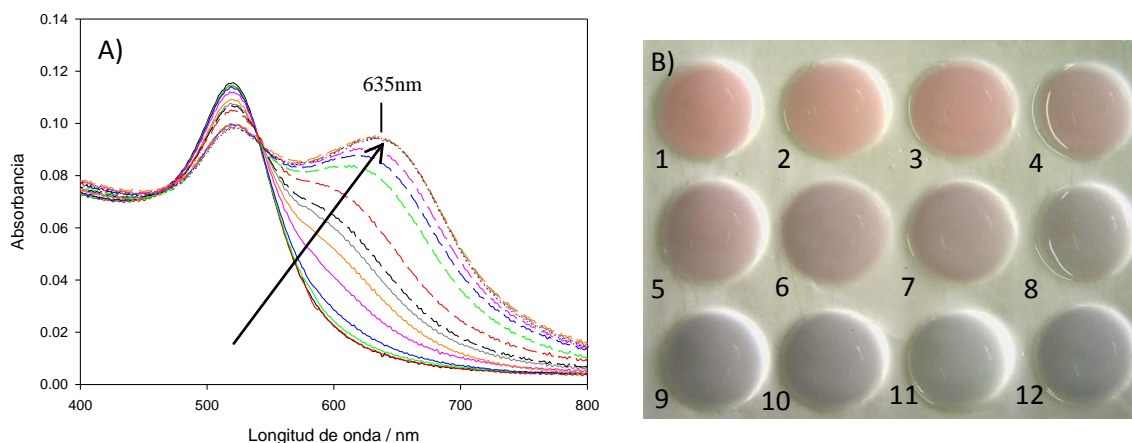


Figura 4.52. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con timina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir la base y corresponden a un intervalo de [timina] = 1.0×10^{-6} a 1.5×10^{-5} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la timina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de timina: 1) 0.0 M; 2) 2.0×10^{-6} M; 3) 3.0×10^{-6} M; 4) 4.0×10^{-6} M; 5) 5.0×10^{-6} M; 6) 6.0×10^{-6} M; 7) 7.0×10^{-6} M; 8) 8.0×10^{-6} M; 9) 9.0×10^{-6} M; 10) 1.0×10^{-5} M; 11) 1.2×10^{-5} M; 12) 1.5×10^{-5} M.

El grado de agregación (A_{635}/A_{520}) mostró una tendencia sigmodial respecto a la concentración de timina (Figura 4.12A), donde la saturación de la nanopartícula se produjo a 1.2×10^{-5} M. A diferencia del caso anterior, no se observó ninguna tendencia a la reversión de la agregación. Por otra parte, se calculó el número de moléculas de timina que participan en el proceso de agregación a partir de las variaciones de absorbancia a 635 nm por nanopartícula ($\Delta A / [\text{AuNPs}]$), obteniéndose un valor de $n = 30700 \pm 5400$ moléculas de timina por AuNP (figura 4.12B).

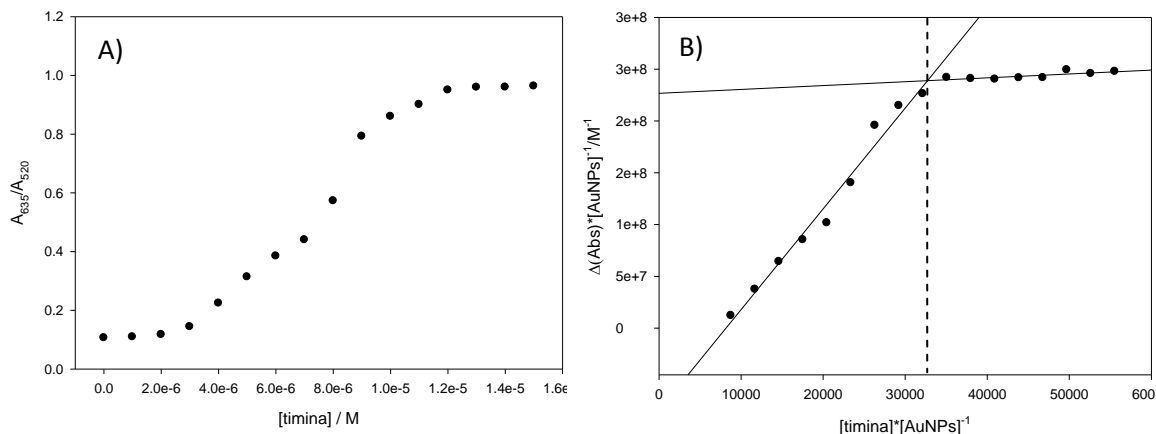


Figura 4.53. A) Evolución del grado de agregación (A_{635}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de timina. B) Determinación del número de moléculas de timina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 635 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M.

La Figura 4.13 muestra la cinética del proceso de agregación para tres concentraciones diferentes de timina, de las cuales una es muy superior a las utilizadas en la titulación (10^{-4} M). A esta concentración se observa que la reacción no terminó en el intervalo de tiempo estudiado, lo que significa que el proceso de agregación por la timina es más lento que en el caso de la adenina.

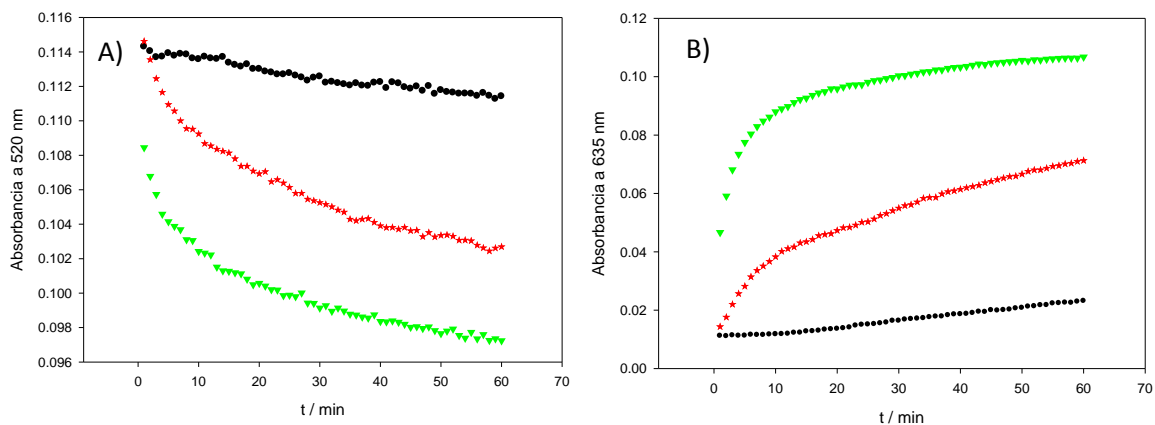


Figura 4.54. Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ($[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M) en presencia de diferentes concentraciones de timina. Las concentraciones de timina son: 3.0×10^{-6} M (círculos negros), 1.0×10^{-5} M (estrellas rojas) y 1.0×10^{-4} M (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponden a las nanopartículas libres; B) 635 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas.

A partir del ajuste de las proporciones de absorbancia a 635 nm y 520 nm (A_{635}/A_{520}) con la ecuación de Benesi-Hildebrand para el intervalo de $[timina] = 3.0 \times 10^{-6}$ a 9.0×10^{-6} M (véase Figura 4.14), se obtuvo un valor medio de $K_f = (4.0 \pm 1.8) \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, que corresponde a una energía libre de unión $\Delta G^0 = -26.1 \pm 1.1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Al igual que en la adenina, se observaron errores muy grandes para los valores que se obtendrían si se ajustasen los datos de absorbancia a 520 nm, mientras que los datos de las nanopartículas agregadas (A_{635}) se ajustaron proporcionando el mismo valor $[(4 \pm 2) \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}]$ que se obtuvo con el grado de agregación.

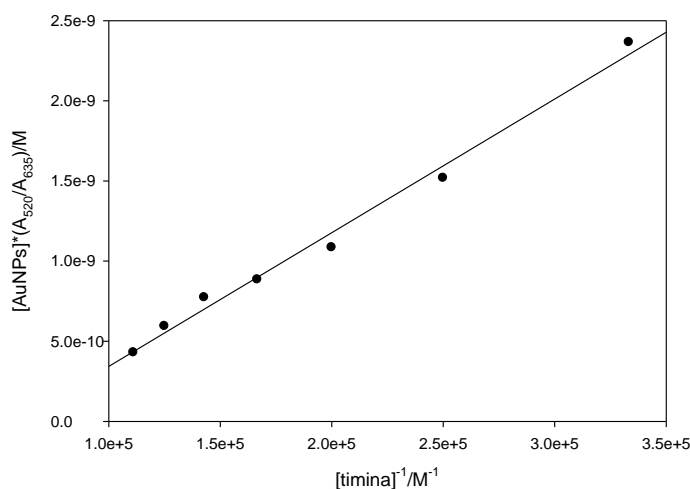


Figura 4.55. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{635}/A_{519} en el intervalo $[timina] = 3.0 \times 10^{-6}$ M a 9.0×10^{-6} M.

La evolución de los parámetros colorimétricos (a^* y b^*) con la concentración de timina se muestran en la Figura 4.15. A diferencia del caso anterior, la componente roja ($a^* > 0$) se mantiene positiva en todo el rango de estudio, lo que significa que las muestras en el caso de la timina son más rojas (o menos verdes) que las que contiene adenina. La aparición del color morado coincide con el punto en que comienza a disminuir a^* (4.0×10^{-6} M) mientras que el predominio de la componente azul se produjo a partir de 1.0×10^{-5} M, donde las muestras son totalmente azules. El parámetro L^* osciló entre 92 y 94 de nuevo.

La Figura 4.16 muestra los ajustes de a^* y b^* según la ecuación de Benesi-Hildebrand. Aunque en el parámetro a^* no se producen variaciones de signo, debido a la dispersión de sus puntos (observada en las diferentes muestras), se obtuvieron valores de la constante de unión mayores a los calculados por absorbancia [$K_f = (1.6 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$]. Sin embargo, en el caso de b^* , a pesar de producirse la asíntota mencionada en la subsección anterior, los valores de la constante de formación fueron próximos a los esperados: $K_f = (5.7 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

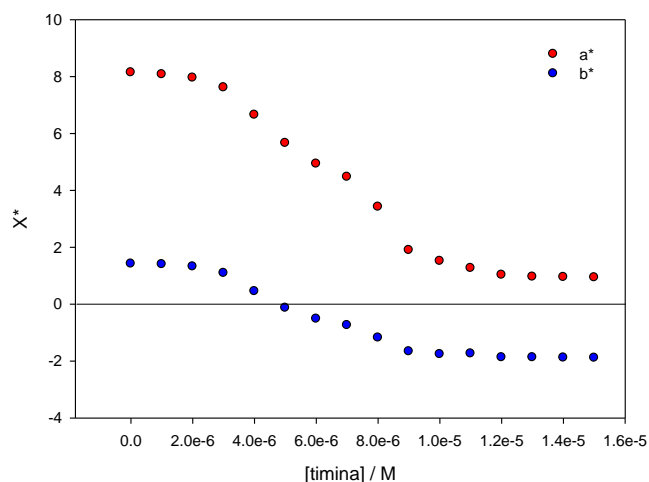


Figura 4.56. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de timina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 93 \pm 1$.

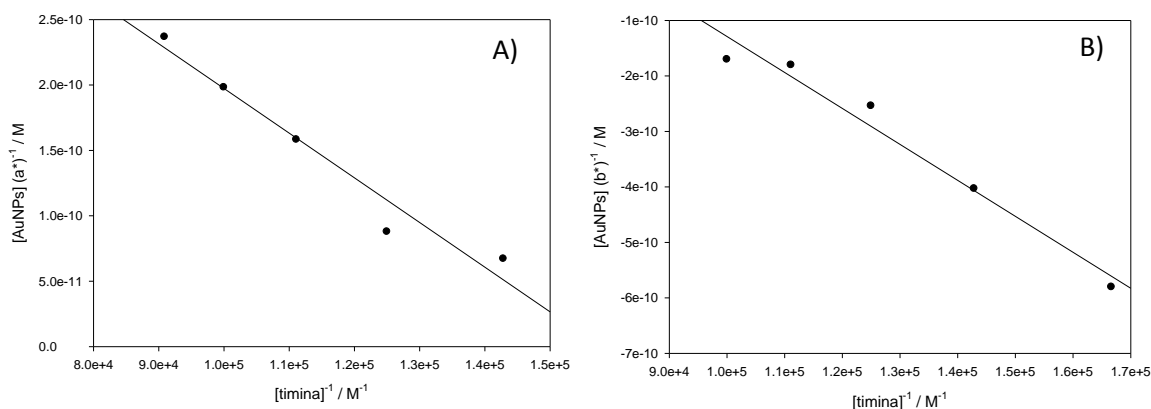


Figura 4.57. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab a la ecuación de Benesi-Hildebrand. A) Ajuste lineal del parámetro a^* en el intervalo $[timina] = 6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$ M. B) Ajuste lineal del parámetro b^* en el intervalo $[timina] = 6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$ M.

Al igual que para la adenina, se obtuvo también el valor de la constante de unión con las áreas de las bandas asociadas a las AuNPs agregadas tras el análisis de deconvolución. La Tabla 4.4 muestra la posición de las diferentes bandas obtenidas y sus correspondientes áreas, así como la proporción de áreas de las AuNPs libres y las agregadas. La K_f obtenida por la ecuación de Benesi-Hildebrand fue de $(3.2 \pm 1.7) \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (véase Figura 4.17), lo que es igual a $\Delta G^0 = -25.5 \pm 1.4 \text{ kJmol}^{-1}$.

Tabla 4.11. Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de timina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.

[Timina]/ M	λ_1/nm	Área ₁	λ_2/nm	Área ₂	λ_3/nm	Área ₃	A _{libre}	A _{agre}
0	523	11.842	-	-	-	-	1.000	0.000
1.0 x10⁻⁶	523	11.683	-	-	-	-	1.000	0.000
2.0 x10⁻⁶	523	6.686	-	-	-	-	1.000	0.000
3.0 x10⁻⁶	522	5.293	592	1.617	-	-	0.766	0.234
4.0 x10⁻⁶	522	4.408	598	4.649	-	-	0.487	0.513
5.0 x10⁻⁶	521	3.538	597	3.353	-	-	0.513	0.487
6.0 x10⁻⁶	520	3.189	598	4.654	-	-	0.407	0.593
7.0 x10⁻⁶	520	2.443	605	5.663	-	-	0.301	0.699
8.0 x10⁻⁶	521	2.263	572	0.194	624	10.262	0.178	0.822
9.0 x10⁻⁶	522	2.383	576	0.47	631	10.820	0.174	0.826
1.0 x10⁻⁵	522	2.386	575	1.159	636	11.556	0.158	0.842
1.1 x10⁻⁵	522	2.040	573	0.734	641	8.879	0.175	0.825
1.2 x10⁻⁵	520	1.725	618	7.857	654	4.522	0.122	0.878
1.3 x10⁻⁵	522	2.236	584	3.663	647	10.862	0.133	0.867
1.4 x10⁻⁵	520	3.916	595	5.118	653	9.751	0.208	0.792
1.5 x10⁻⁵	525	2.321	608	7.342	660	6.448	0.144	0.856

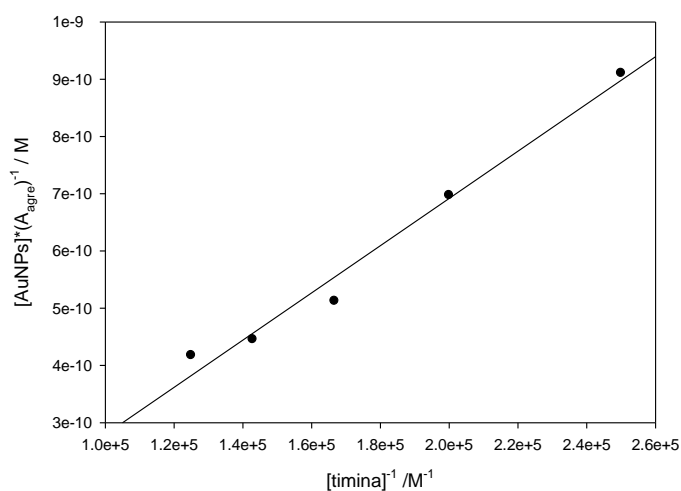


Figura 4.58. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo [timina] = 4.0 x10⁻⁶ a 8.0 x10⁻⁶ M.

4.3.3. Citosina

La desoxicitidina es el nucleótido que provoca desplazamientos a mayores longitudes de onda de la banda SPR de AuNPs de 16.2 nm.⁶⁰ Por otro lado la citosina presenta la mayor energía de interacción (determinada por calorimetría de titulación isotérmica) para nanopartículas de oro con un tamaño de 6.5 nm.⁷¹ La Figura 4.18 muestra los espectros de absorción de AuNPs de 14.8 nm a diferentes concentraciones de citosina y los cambios colorimétricos de las muestras. A concentraciones superiores a 4×10^{-7} M se observó una reversión de 6 nm de la posición de la banda SPR (véase Figura 4.19), la cual responde también a la tendencia a formar dímeros que presenta la adenina.¹⁴⁴ A concentraciones superiores a 5.0×10^{-7} M dicha reversión se estabiliza, posicionándose la banda a 684 nm.

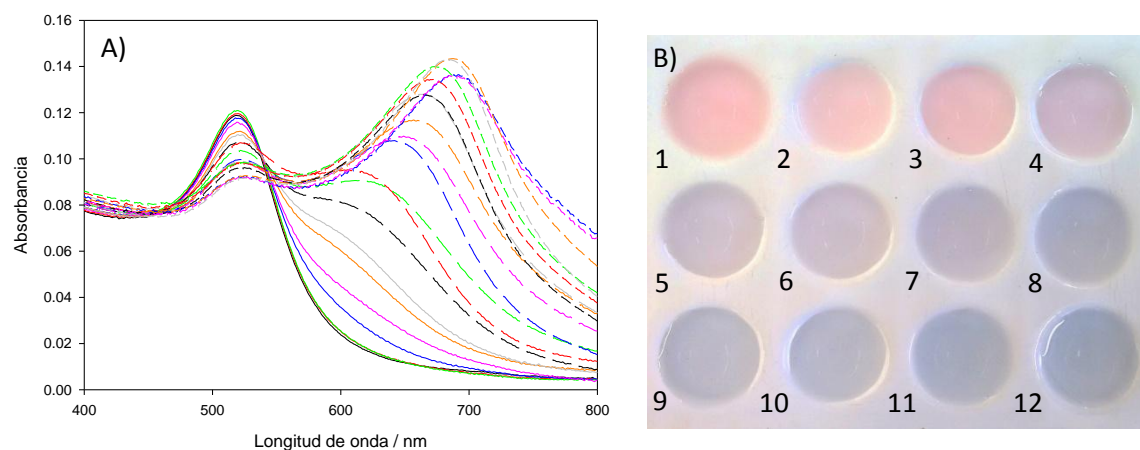


Figura 4.59. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con citosina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir la base y corresponden a un intervalo de $[citosina] = 1.0 \times 10^{-7}$ a 5.0×10^{-7} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la citosina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de citosina: 1) 0.0 M; 2) 1.0×10^{-7} M; 3) 2.0×10^{-7} M; 4) 2.4×10^{-7} M; 5) 2.6×10^{-7} M; 6) 2.8×10^{-4} M; 7) 3.0×10^{-7} M; 8) 3.2×10^{-7} M; 9) 3.4×10^{-7} M; 10) 3.6×10^{-7} M; 11) 4.0×10^{-7} M; 12) 5.0×10^{-7} M.

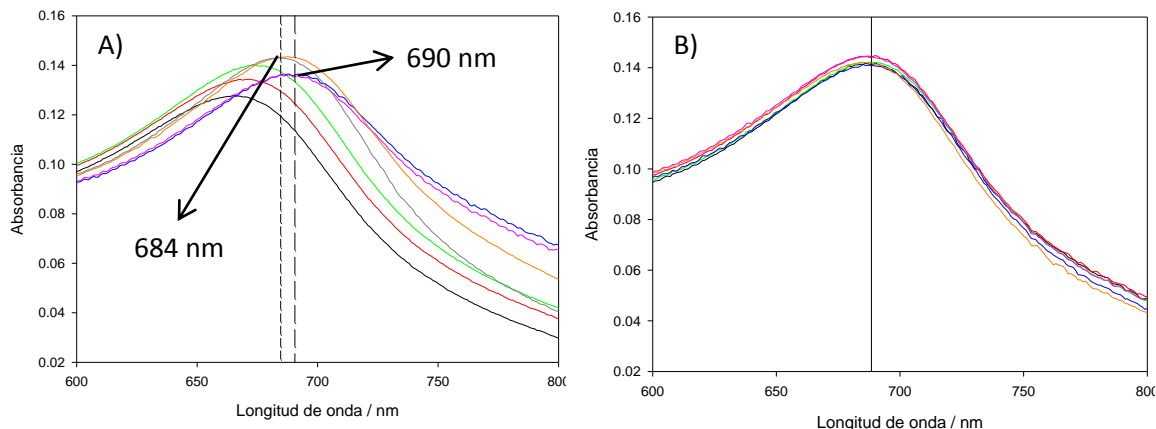


Figura 4.60. A) Espectros de UV-visible de AuNPs en el rango de concentración de citosina donde se produce la reversión en la agregación (3.2×10^{-7} a 5.0×10^{-7} M). Las marcas indican la posición de la banda de agregación antes y después del proceso de reversión. B) Espectros de UV-visible de AuNPs a concentraciones de citosina superiores a 5.0×10^{-7} M.

Como en los casos anteriores, el grado de agregación (A_{684}/A_{520}) mostró una tendencia sigmodial respecto a la concentración de nucleobase (Figura 4.20A). El cálculo del número de moléculas de citosina que participan en el proceso de agregación se realizó a partir de las variaciones de absorbancia a 684 nm por AuNP ($\Delta A / [\text{AuNPs}]$), obteniéndose un valor de $n = 1050 \pm 65$ moléculas de citosina por NP (figura 4.20B).

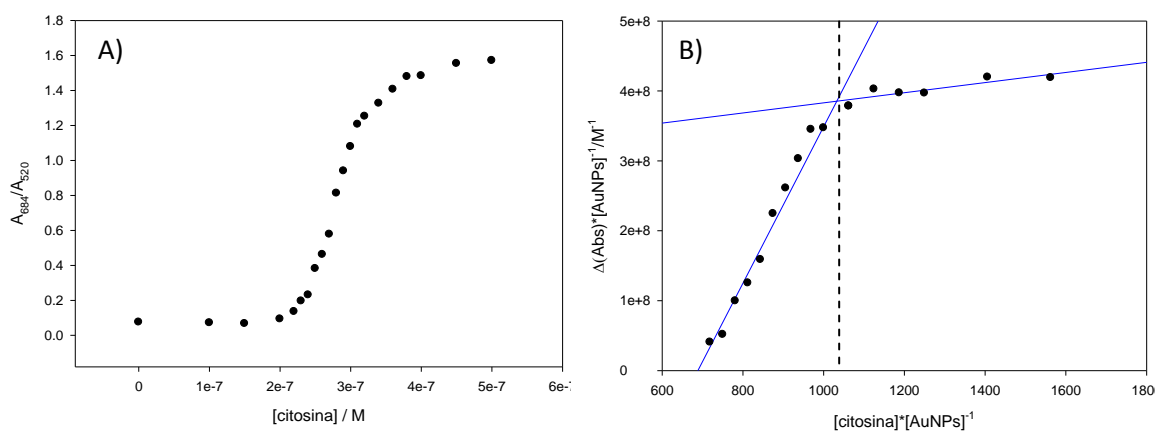


Figura 4.61. A) Evolución del grado de agregación (A_{684}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de citosina. B) Determinación del número de moléculas de citosina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 684 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M.

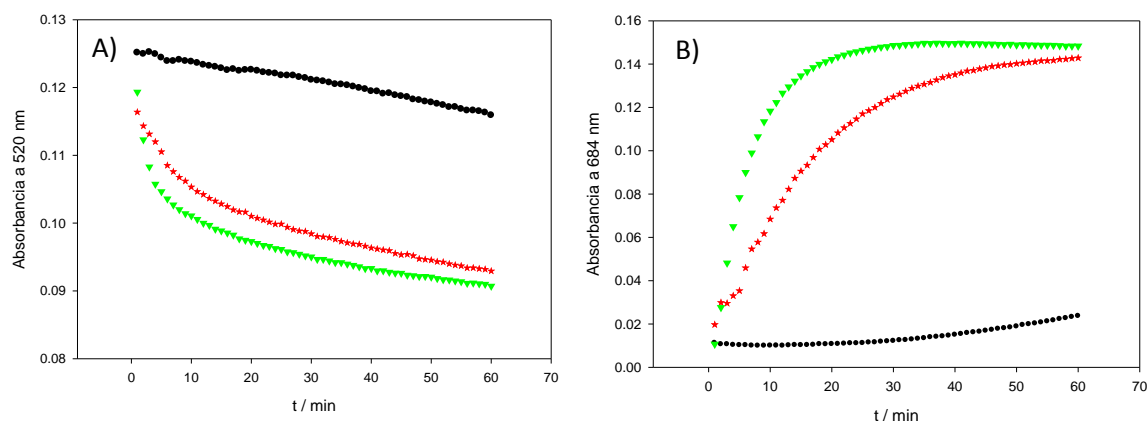


Figura 4.62. Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ($[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$) en presencia de diferentes concentraciones de citosina. Las concentraciones de citosina son: $2.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ (círculos negros), $3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ (estrellas rojas) y $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponden a las nanopartículas libres; B) 684 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas.

La Figura 4.21 muestra cómo evoluciona la absorbancia a dos longitudes de onda con el tiempo: a 520 nm para seguir la cinética de las AuNPs no agregadas y a 684 nm para seguir la formación de agregados. Conforme aumenta la concentración de citosina el proceso de agregación es más rápido (compárese las pendientes de las tres curvas). A la concentración más alta (10^{-6} M), la agregación continúa ya que no se produce estabilización de la absorbancia a 520 nm, debido al ensanchamiento de la banda por la formación de agregados de mayor tamaño.

La Figura 4.22 muestra el ajuste obtenido por la ecuación de Benesi-Hidelbrand de los valores de A_{684}/A_{520} según la concentración de citosina en el intervalo de 2.0×10^{-7} a $2.8 \times 10^{-7} \text{ M}$. La constante obtenida presentó un valor de $K_f = (3.2 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, que corresponde a $\Delta G^0 = -37.2 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Al igual que en los casos anteriores, el uso de la absorbancia a 520 nm para obtener las constantes proporcionó valores muy dispares mientras que en el caso de la absorbancia a 684 nm se obtuvieron valores coherentes $[(3.1 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}]$.

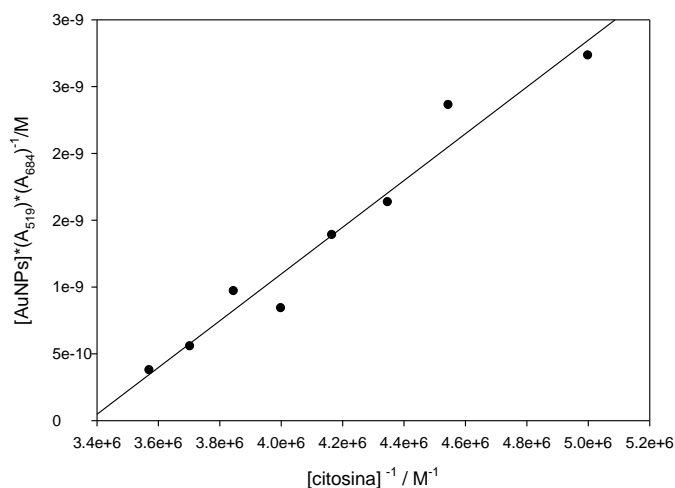


Figura 4.63. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{684}/A_{520} en el intervalo $[\text{citosa}] = 2.0 \times 10^{-7}$ a 2.8×10^{-7} M.

Al igual que en el caso de la adenina, los parámetros colorimétricos presentaron un cambio de signo (Figura 4.23): a partir de 2.2×10^{-7} M el parámetro b^* pasa a ser negativo, mientras que la transición a valores negativos para a^* se produce en 2.8×10^{-7} M. Hasta 2.5×10^{-7} M la componente del color rojo predomina, aunque se observan colores morados en las muestras debido a la influencia de b^* ; a partir de ese punto la componente azul sobrepasa al parámetro a^* tomando las muestras colores violáceos y azules. El parámetro L^* osciló entre 91.5 y 92. Como consecuencia de ello, la tendencia de dichos parámetros al ajustarlos a la ecuación de Benesi-Hildebrand es asintótica (Figura 4.24). A pesar de producirse una desviación de la linealidad, el ajuste a la ecuación de una recta en un intervalo pequeño de concentraciones (véase las ampliaciones de los gráficos de la Figura 4.24) proporcionó valores bastante similares a los obtenidos con las absorbancias, aunque con un error muy considerable [para a^* se obtuvo $K_f = (3 \pm 2) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ y para b^* fue $K_f = (2.8 \pm 1.5) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$].

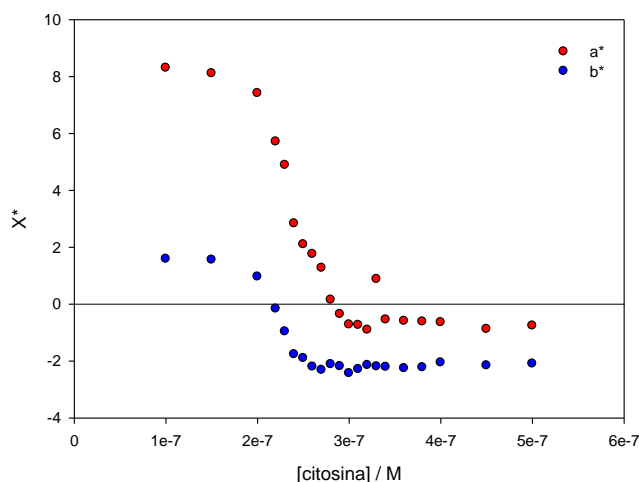


Figura 4.64. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de citosina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 91.75 \pm 0.25$.

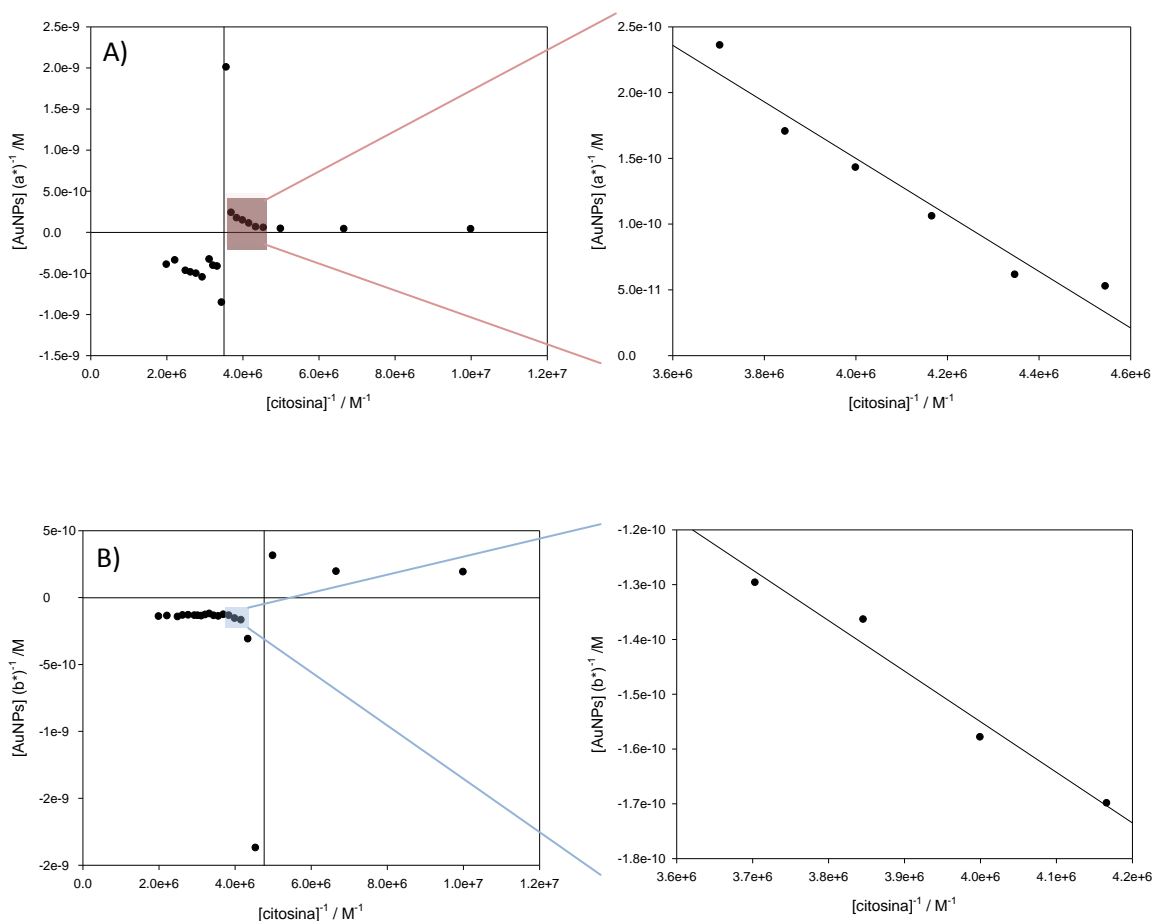


Figura 4.65. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab. A) Ajuste del parámetro a^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo $[citocina] = 2.2 \times 10^{-7} - 2.7 \times 10^{-7}$ M. B) Ajuste del parámetro b^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo $[citocina] = 2.4 \times 10^{-7} - 2.7 \times 10^{-7}$ M.

Tabla 4.12. Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de citosina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.

[Citosina]/ M	λ_1/nm	Área ₁	λ_2/nm	Área ₂	λ_3/nm	Área ₃	A _{libre}	A _{agre}
0.00	522	7.512	-	-	-	-	1.000	0.000
1.0 x10⁻⁷	523	9.131	-	-	-	-	1.000	0.000
1.5 x10⁻⁷	522	7.688	-	-	-	-	1.000	0.000
2.0 x10⁻⁷	523	6.512	585	0.084	-	-	0.987	0.013
2.2 x10⁻⁷	522	4.726	596	2.697	-	-	0.637	0.363
2.3 x10⁻⁷	520	3.401	590	3.016	-	-	0.530	0.470
2.4 x10⁻⁷	520	2.700	594	4.285	-	-	0.386	0.613
2.5 x10⁻⁷	520	2.271	612	6.375	-	-	0.263	0.737
2.6 x10⁻⁷	520	2.406	604	5.672	630	0.676	0.275	0.725
2.7 x10⁻⁷	520	1.525	613	6.286	647	3.488	0.135	0.865
2.8 x10⁻⁷	521	1.661	638	8.473	664	2.034	0.137	0.863
2.9 x10⁻⁷	521	1.542	632	7.022	667	4.632	0.117	0.883
3.0 x10⁻⁷	521	1.342	642	8.050	669	5.002	0.093	0.907
3.1 x10⁻⁷	522	1.045	636	4.482	677	9.329	0.070	0.930
3.2 x10⁻⁷	522	1.197	657	10.02	677	2.164	0.089	0.911
3.3 x10⁻⁷	521	2.050	643	9.595	668	2.311	0.147	0.853
3.4 x10⁻⁷	521	4.235	612	5.843	633	0.462	0.402	0.598
3.6 x10⁻⁷	524	1.195	655	10.961	680	2.481	0.082	0.918
3.8 x10⁻⁷	522	1.145	644	10.600	676	3.634	0.074	0.926
4.0 x10⁻⁷	523	1.322	648	12.060	677	2.556	0.083	0.917
5.0 x10⁻⁷	526	1.028	655	9.801	691	5.000	0.065	0.935

Los valores de longitud de onda y área que se obtuvieron para cada banda por deconvolución de los espectros con citosina se muestran en la Tabla 4.5. A partir de la proporción de áreas de las AuNPs agregadas se halló un valor de $K_f = (3.5 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (véase Figura 4.25), es decir, $\Delta G^0 = -37.3 \pm 0.3 \text{ kJmol}^{-1}$.

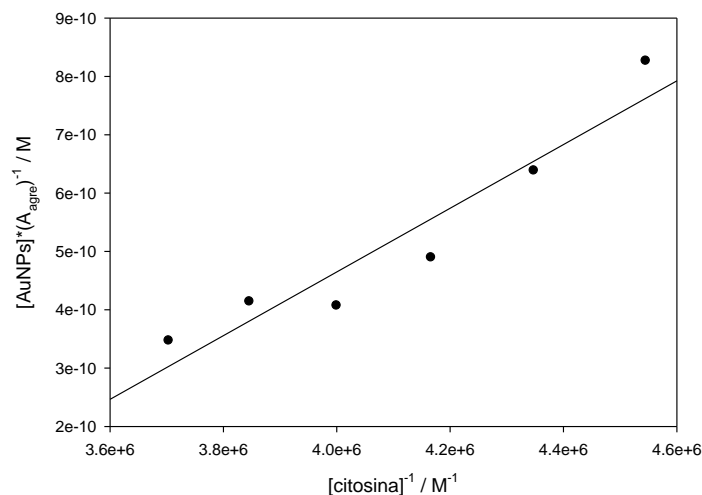


Figura 4.66. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo $[\text{citosina}] = 2.2 \times 10^{-7}$ a $2.7 \times 10^{-7} \text{ M}$.

4.3.4. Guanina

Con el fin de completar la cuantificación de las cuatro bases se intentó repetir el mismo procedimiento con la guanina, sin embargo no fue posible debido a su baja solubilidad en agua (por debajo de 10^{-5} M a pH neutro).¹⁴⁷ Por este motivo la concentración más alta que se consiguió disolver fue 10^{-6} M . En la Figura 4.26 se muestra la evolución de la banda SPR con el tiempo para esta concentración. Como se puede observar, se produjo un ligero ensanchamiento de la banda así como un imperceptible desplazamiento ($\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$). A pesar de ser tan insignificantes las diferencias, se pueden apreciar éstas levemente en los colores de las muestras (véase las fotografías insertadas en la Figura 4.26A). A esta concentración, la formación de hombros se produjo transcurridas unas 12 horas (véase Figura 4.26B), lo que impide la titulación con guanina y su cuantificación.

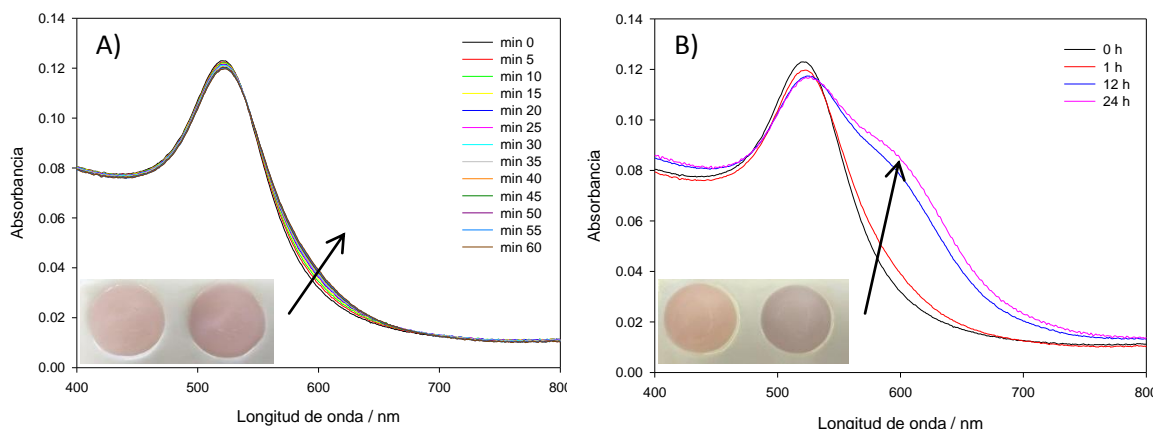


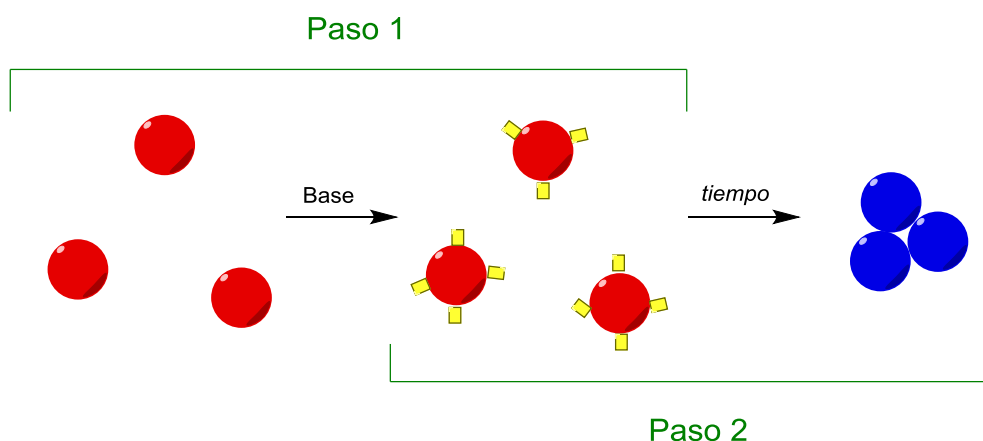
Figura 4.67. Evolución con el tiempo del espectro de absorción UV-Visible de AuNPs a una concentración de guanina de 10^{-6} M. A) En la primera hora tras mezclar los reactivos. Las fotografías insertadas corresponden a la muestra en el minuto 0 (izquierda) y en el minuto 60 (derecha). B) tras 1 hora, 12 horas y 24 horas tras mezclar los reactivos. Las fotografías insertadas corresponden a la muestra en el minuto 0 (izquierda) y tras 24 horas (derecha).

4.3.5. Comparativa de las interacciones de las cuatro bases

4.3.5.1. Discusión sobre el criterio para establecer el orden de afinidad

Antes de proceder a la comparativa de los resultados expuestos en las secciones anteriores, conviene discutir hasta qué punto ha sido adecuada la metodología empleada. Con el fin de establecer cuál es el mejor criterio para obtener el orden de afinidad, se estudiaron los cambios de la banda SPR a diferentes concentraciones de las cuatro nucleobases (10^{-7} M, 10^{-6} M y 10^{-3} M) después de una hora de su adición (Figura 4.27). Para la concentración más baja no se observaron diferencias, no generándose agregación alguna: todas las muestras mostraron su característico color rojo y el máximo se situó en 520 nm (Figura 4.27A). Sin embargo, cuando la concentración se aumentó 10 veces, tanto la adenina como la citosina presentaron fenómenos de agregación, mientras que la guanina dio lugar a un ligero ensanchamiento. El espectro de la timina no sufrió cambio alguno (Figura 4.27B). Para la concentración más alta, la citosina presentó la reversión ya mencionada y por ello la banda SPR se encuentra muy cercana a la de la adenina, mientras que la timina indujo la agregación de las nanopartículas posicionando su banda próxima a las otras. Este estudio comparativo de la evolución de la banda SPR para las diferentes nucleobases a varias concentraciones muestra que establecer el orden de afinidad por la longitud de onda puede inducir a error debido a la influencia de la concentración de ligando y a las reversiones en la agregación. También sería necesario considerar la relación entre los conceptos de afinidad y la posición de la banda causada por las AuNPs agregadas. La IUPAC define la afinidad o “fuerza conductora” como la disminución en la energía de Gibbs al pasar los

reactivos a productos en una reacción química ($-\Delta G$),¹⁴⁸ es decir, la espontaneidad del proceso. Por otro lado, la posición de la banda SPR es un parámetro relacionado con el tamaño, entre otros (véase Capítulo 1). La agregación de AuNPs provocada por las bases del ADN es atribuida al desplazamiento de los aniones citrato para formar interacciones metal-ligando, lo que implica una disminución de la carga.¹⁴¹ De manera que si se considera el Esquema 4.1 como modelo del proceso de interacción y de agregación de nuestro sistema, el orden de afinidad de la interacción monómero/AuNPs está relacionado con el primer paso mientras que la posición de la banda de agregación lo está con el segundo. La primera etapa solamente podría implicar pequeños cambios en la banda debido a los cambios de polaridad producidos en el entorno al añadir las nucleobases.¹⁷ Para esclarecer este punto, se midieron los índices de refracción a varias concentraciones de las diferentes nucleobases (véase Tabla 4.6), siendo la mayor variación producida de sus valores respecto al agua de $\Delta\eta = \pm 0.0005$ (dentro del error del refractómetro), lo que implica que no se deben apreciar variaciones en la banda SPR según la teoría de Mie (si se considera la ecuación obtenida en la Figura 3.17, $\Delta\lambda = 0.02$ nm). Esto también permite confirmar que los retrocesos del máximo de absorción en la adenina y en la citosina no se debieron a cambios de polaridad del medio. Es decir, que cuando una molécula (en este caso una base del ADN) desplaza la banda de agregación a mayores longitudes de onda que otro ligando, simplemente está generando agregados de mayor tamaño, pero no aporta ninguna información directa sobre la espontaneidad con la que ha interactuado.



Esquema 4.3. Modelo para la agregación de AuNPs producida por las bases del ADN. Los rectángulos amarillos corresponden a las nucleobases. Las figuras no están a escala.

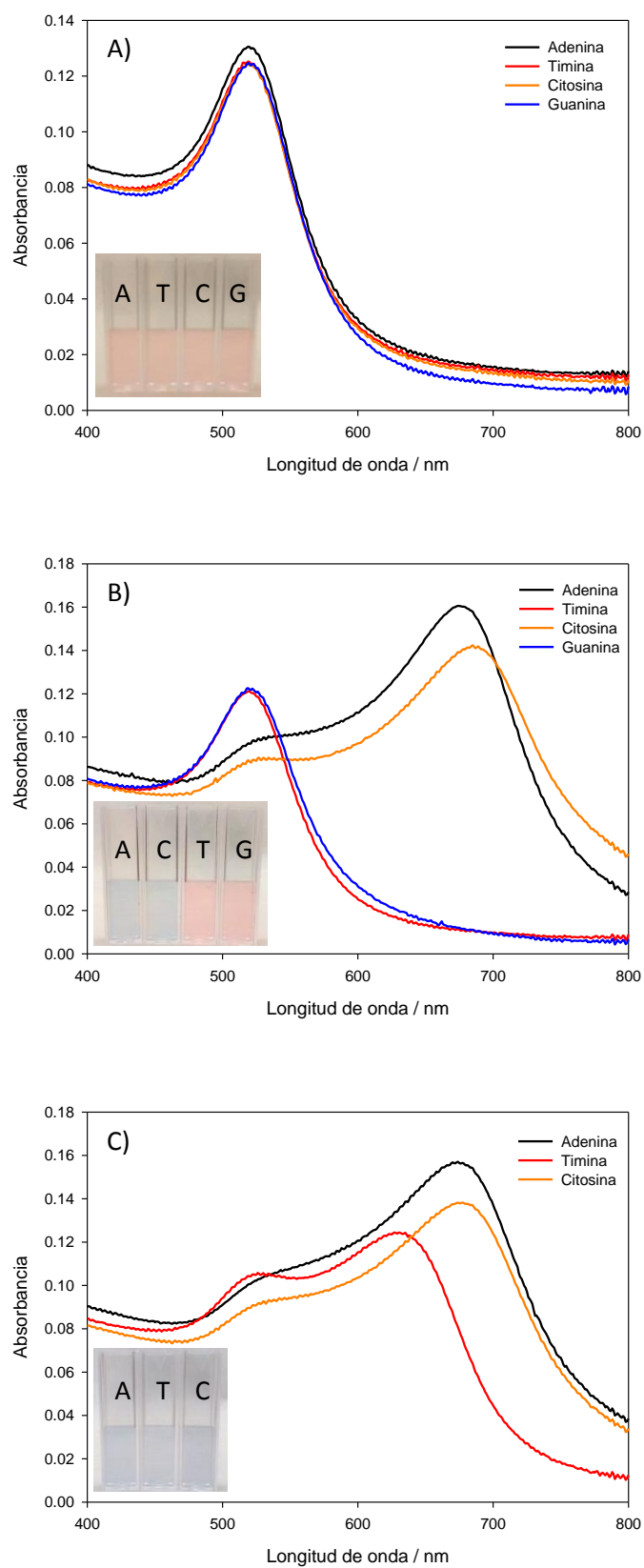


Figura 4.68. Espectros de absorción UV-visible de AuNPs con las cuatro bases del ADN 1 hora después del mezclado. Las fotografías insertadas corresponden a las muestras justo después de realizar el espectro. Las concentraciones de nucleobase fueron: A) 10^{-7} M; B) 10^{-6} M; C) 10^{-3} M.

Tabla 4.13. Índices de refracción para disoluciones con diferentes concentraciones de adenina, timina o citosina. Las medidas se realizaron a una temperatura de 298.7 K.

[Adenina]/ M	η	[Timina] / M	η	[Citosina] / M	η
0	1.3323	0	1.3322	0	1.3325
10^{-7}	1.3318	10^{-7}	1.3322	10^{-7}	1.3324
10^{-6}	1.3322	10^{-6}	1.3322	10^{-6}	1.3320
10^{-5}	1.3321	10^{-5}	1.3324	10^{-5}	1.3320
10^{-4}	1.3321	10^{-4}	1.3319	10^{-4}	1.3323
10^{-3}	1.3324	10^{-3}	1.3321	10^{-3}	1.3323

En base a la reflexión expuesta, es indudable que el mejor criterio para establecer un orden de afinidad es a partir de datos cuantitativos. Los estudios de desactivación de fluorescencia (o de “*quenching*”) son los más habituales para la cuantificación de la interacción entre los ligandos y las nanopartículas.^{149–151} Las AuNPs presentan una alta eficiencia desactivadora comparada con los desactivadores orgánicos,¹⁵² y su versatilidad en el diseño de la banda SPR les confiere también una gran capacidad de transferir energía desde el fluoróforo a la superficie de la nanopartícula.¹³ Sin embargo, no siempre es posible la cuantificación por esta vía: no todos los ligandos son fluorescentes y a veces son necesarias concentraciones muy altas de AuNPs, lo que provoca la dispersión de la luz. Otra alternativa es considerar los pequeños desplazamientos de la banda SPR causados por los cambios de polaridad en el entorno de la nanopartícula,¹⁵¹ pero para ello es necesario que dicho ligando no provoque la agregación del sistema coloidal. Sin embargo, el método propuesto aquí consiste en el estudio del espectro de absorción en el rango visible de las AuNPs a diferentes concentraciones de monómero (que es el ligando del sistema) y el ajuste de la señal medida (u otro parámetro procedente de ésta) a una ecuación fisicoquímica para obtener la constante de unión (K_f). En este caso, la señal usada ha sido la absorbancia a la longitud de onda del máximo asociado a los aglomerados. También se determinó, como se ha descrito, la constante de formación a partir de parámetros colorimétricos y a partir de las áreas obtenidas por deconvolución. La Tabla 4.7 recoge los valores de K_f obtenidos para cada base por los diferentes procedimientos.

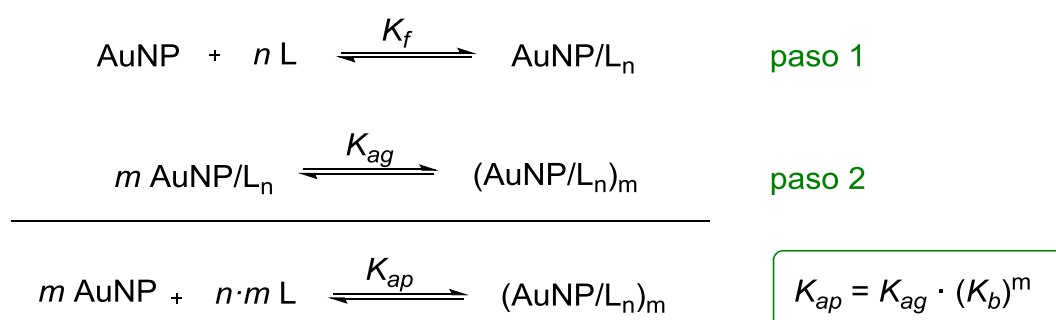
Tabla 4.14. Constantes de formación obtenidas para cada base por los diferentes métodos empleados.

	Adenina	Timina	Citosina
	K_f (dm ³ mol ⁻¹)	K_f (dm ³ mol ⁻¹)	K_f (dm ³ mol ⁻¹)
Absorbancias	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^6$	$(4.0 \pm 1.8) \times 10^4$	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^6$
Color (a*)	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^9$	$(1.6 \pm 0.7) \times 10^5$	$(3 \pm 2) \times 10^9$
Color (b*)	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^6$	$(5.7 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.8 \pm 1.5) \times 10^6$
Deconvolución	$(1.6 \pm 0.4) \times 10^9$	$(3.2 \pm 1.7) \times 10^4$	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^6$

Al comparar las diferentes constantes calculadas para una misma base se puede comprobar que los valores son bastante próximos. Sin embargo, el uso de a* y b* para la determinación de la constante es muy sensible a la dispersión, lo que provoca el cálculo de constantes lejanas a la real con pequeños errores; un ejemplo de ello es el parámetro a* para la timina, donde una leve desviación en los puntos de la zona lineal (véanse los puntos desde 6.0 x10⁻⁶ a 1.0 x10⁻⁵ M en la Figura 4.15) genera una constante casi 4 veces mayor que las obtenidas por los otros procedimientos. A pesar de ello, la similitud de los resultados confirma la validez de los diferentes métodos empleados.

4.3.5.2. Análisis de los resultados obtenidos

Siendo estrictos, al tomar como referencia la banda de las AuNPs agregadas, la constante obtenida no es la constante de formación del complejo AuNP/base sino una constante aparente (K_{ap}) como se muestra en el Esquema 4.2:



Esquema 4.4. Relación entre la constante aparente y las constantes de las diferentes etapas del proceso de agregación.

donde K_f es la constante de formación del complejo AuNP/L_n (esto es, la verdadera constante de interacción), K_{ag} es la constante del proceso de agregación de los complejos AuNP/L_n y K_{ap} es la

ya mencionada constante aparente determinada. El procedimiento realizado en el presente estudio permite establecer los órdenes de afinidad a partir de las constantes obtenidas, que se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.15. Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con las diferentes bases del ADN. Los valores de K_{ap} son los calculados a partir de los datos de absorbancia.

Base	Adenina	Timina	Citosina	Guanina*
$(\lambda_{max})_{ag}$ / nm	671	635	684	-
n / molécula NP ⁻¹	1900	30700	1050	-
K_{ap} / dm ³ mol ⁻¹	2.0 x10 ⁶	4 x10 ⁴	3.2 x10 ⁶	-
$(\Delta G^0)_{ap}$ / kJmol ⁻¹	-35.9	-26.3	-37.2	-

* No ha sido posible su obtención debido a problemas de solubilidad

La base con mayor afinidad es la citosina, aunque la constante aparente de la adenina es muy próxima; la timina es la base con menor afinidad de las interacciones cuantificadas. Si no se considera la guanina, el orden obtenido (C > A >> T) coincide con el de otros autores siguiendo la interacción mediante los desplazamientos de la banda SPR o bien por calorimetría de titulación isotérmica.^{60,71} Si se considera el cambio obtenido de la interacción guanina/AuNPs, se produce una gran discrepancia: según Mirkin y Letsinger la guanina debería presentar una agregación mayor que la adenina (ya que el orden de afinidad que estimaron es: dC > dG > dA > dT).⁶⁰ No obstante la Figura 4.27B muestra una banda de nanopartículas agregadas para la adenina mientras que la guanina a la misma concentración únicamente produjo un leve ensanchamiento de la banda. Una justificación plausible a esta diferencia de afinidad en nuestros resultados es que el monómero usado en dicho trabajo era el correspondiente desoxinucleósido (dG), el cual es más soluble en agua que su respectiva base (G). Para poder introducir a la guanina en nuestro orden de afinidad sería necesario repetir el estudio en un sistema donde la guanina sea lo suficientemente soluble, como mezclas alcohol/agua, considerando que algunos alcoholes producen cambios insignificantes en la banda SPR (véase sección 3.5).

Respecto al número de moléculas de nucleobases por NP que participan en la interacción, se calculó el factor de recubrimiento (f_r) a partir de la siguiente ecuación:

$$f_r = \frac{n \cdot S_m}{S_{NP}} \quad 4.2$$

donde S_m es la superficie que ocupa una molécula de monómero y S_{NP} la superficie de una NP. La superficie que ocupan la adenina y la timina en el plano en el que se disponen los anillos

aromáticos es de 1.42 nm^2 , mientras que la de la citosina es de 1.27 nm^2 .⁴² Para una AuNP con un diámetro de 14.8 nm su superficie es 688 nm^2 , obteniéndose un factor de 3.9 para la adenina, de 63.4 para la timina y de 1.9 para la citosina. Que el factor sea superior a 1 (cuando por definición $f_r \leq 1$) significa que la interacción de la base no se produce de forma paralela o bien que se forman varias capas en el proceso de asociación. Estudios de la interacción de las bases del ADN en superficie plana de oro han mostrado que todas las bases, excepto la adenina, se orientan paralelas a la superficie;⁴⁸ e incluso a un alto factor de recubrimiento (como es nuestro caso) las interacciones de apilamiento π pueden llegar a darse, lo que generaría la aparición de multicapas de bases.¹⁴³

4.3.5.3. Estudio de la interacción adenina/AuNPs y timina/AuNPs por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La propuesta de la forma de interaccionar las bases con las nanopartículas siempre han sido en base a los resultados obtenidos por la espectroscopía Raman potenciada de superficie (ERPS).^{69,70} Sin embargo la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una herramienta de gran aplicación para el estudio de interacciones ligando-receptor.¹⁵³ Con el fin de comprobar los modos de interacción de las bases estudiadas así como una posible vía alternativa de obtener las constantes de unión, se estudiaron por RMN las interacciones de la adenina y de la timina con las AuNPs.

Dentro de la espectroscopía RMN, una de las herramientas más habituales para el estudio de sistemas ligando-receptor es la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Transferencia de Saturación (en inglés, STD-NMR). Esta técnica de RMN es una de las más potentes cuando la cinética de interacción es rápida.^{154,155} Sin embargo, más popular es una de sus variantes dada su mayor sensibilidad respecto a los espectros STD: WaterLOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy).¹⁵⁶ Para una explicación más extensa de estas técnicas, véase el Capítulo 2. La Figura 4.28A muestra un espectro ^1H -RMN en el que se ha suprimido la señal de agua por *excitation sculpting water suppression* y en el que se identificaron tres picos pertenecientes a los átomos de hidrógeno de la adenina. La magnetización del agua (Figura 4.28B) provoca la inversión del pico procedente de los protones del grupo amino debido a que estos protones son intercambiables con el agua. Por su parte, en el espectro WaterLOGSY de las AuNPs sólo se observó la señal procedente de los citratos (Figura 4.29).

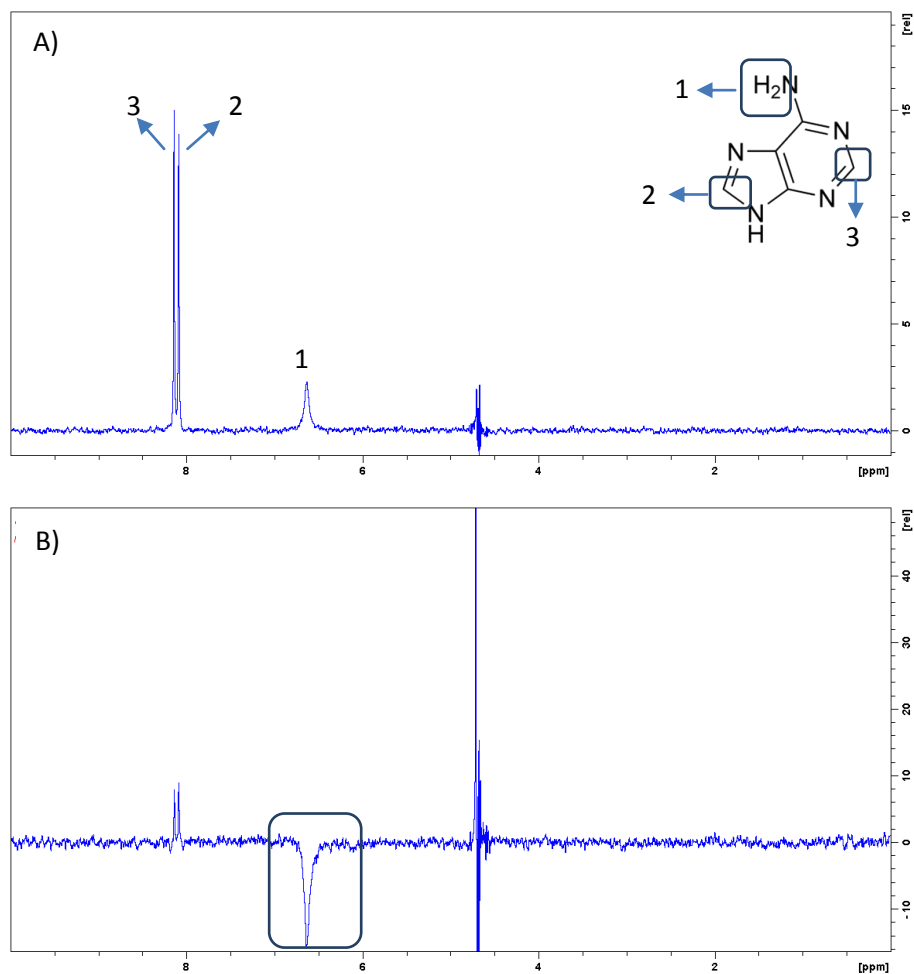


Figura 4. 69. A) Espectro ^1H -RMN de la adenina en agua. La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. B) Espectro de WaterLOGSY para la adenina en ausencia de AuNPs. En ambos espectros la concentración de adenina fue 10^{-3} M.

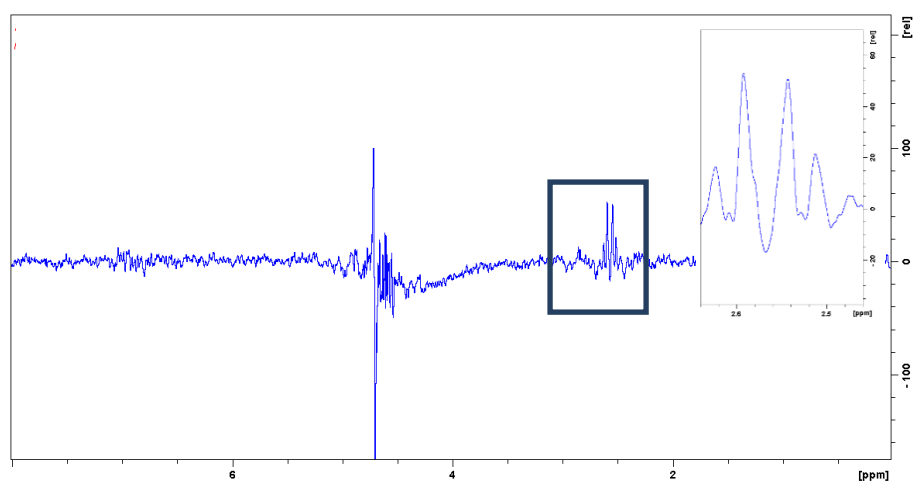


Figura 4.70. Espectro de WaterLOGSY de nanopartículas de oro a la máxima concentración permitida por la experiencia. $[\text{AuNPs}] = 2.7 \times 10^{-9}$ M, $[\text{citrato}] = 10^{-3}$ M.

Desafortunadamente, cuando se compararon los espectros ^1H -RMN y de WaterLOGSY de una muestra que contenía tanto AuNPs como adenina (Figura 4.30A), sólo se observó la inversión de la señal asociada al grupo amino. La desaparición de las señales de citrato es debida a la baja concentración del mismo. Para comprobar que esta inversión no fue debida a la interacción con la AuNP, se repitió el espectro a $60\text{ }^\circ\text{C}$ (333 K), temperatura en la que el proceso de intercambio es tan rápido que la señal debería ser indetectable. La Figura 4.30B muestra dicho espectro, en el que el pico del grupo amino no se detecta, confirmando que la inversión se debe a un intercambio de protones con el agua. No fue posible estudiar las interacciones de la adenina con AuNPs por RMN de pulsos debido a que los tiempos de asociación de la base con la superficie del oro no son adecuados para poder seguir la interacción con esta técnica.

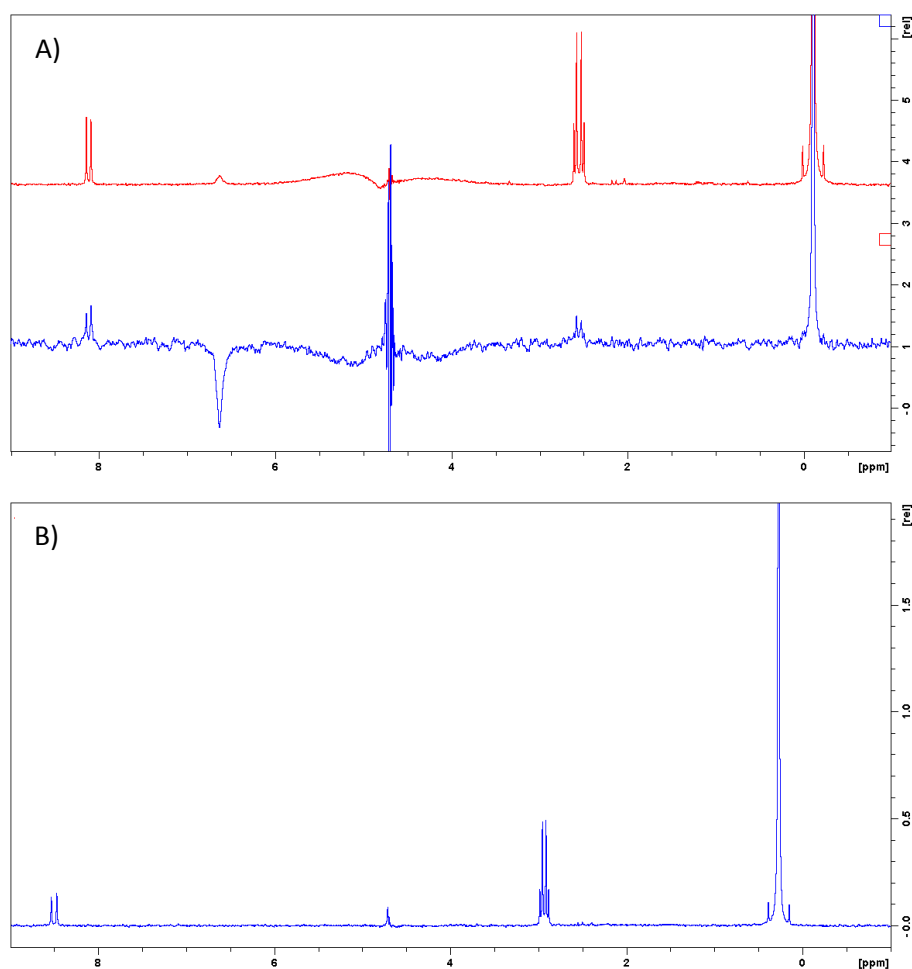


Figura 4.71. A) Comparativa del espectro de ^1H -RMN de la adenina con AuNPs (espectro rojo) con el espectro de WaterLOGSY de la adenina con AuNPs (espectro azul). B) Espectro de WaterLOGSY para el sistema adenina/AuNPs a 333 K . La señal con un desplazamiento químico de 0.25 es debida al referente TMSP. [Adenina] = 10^{-3} M ; [AuNPs] = $9.1 \times 10^{-10}\text{ M}$; [citrato] = $3.5 \times 10^{-4}\text{ M}$.

Dado el alto valor energético que presenta la interacción de la adenina con las nanopartículas de oro, se estudió por RMN la interacción de la timina, ya que es la base que presenta la constante de asociación más baja. La Figura 4.31A muestra el espectro ^1H -RMN de la timina, en el que se ha suprimido la señal de agua. Todos los protones de la molécula generaron un pico en el espectro, siendo las señales de las amidas muy débiles (señales 3 y 4 en la figura). Al igual que en el caso de la adenina, el WaterLOGSY (Figura 4.31B) produjo la inversión de los protones intercambiables con el agua (los amidos). Cuando se comparan los espectros en presencia de AuNPs (Figura 4.32) se produce de nuevo la inversión de los protones intercambiables, lo que significa que es inviable estudiar las interacciones entre bases y AuNPs por RMN.

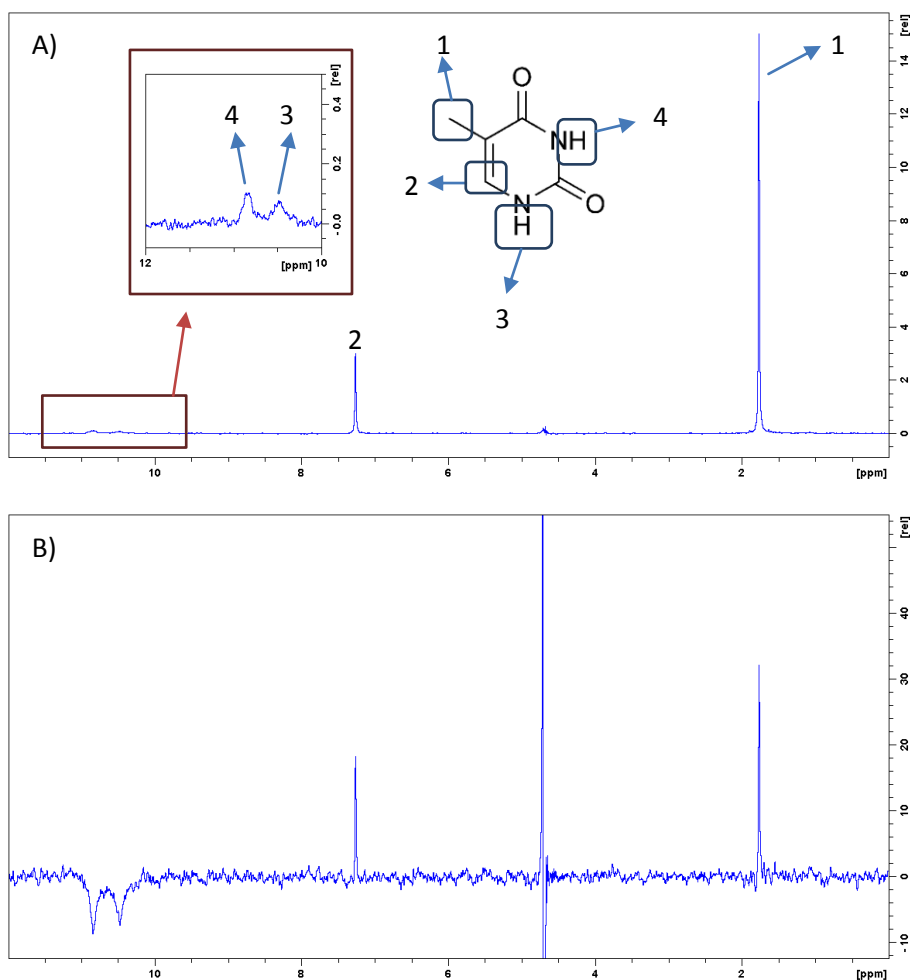


Figura 4.72. A) Espectro de ^1H -RMN de timina en agua. La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. B) Espectro de WaterLOGSY para la timina en ausencia de AuNPs. [Timina] = 10^{-3} M.

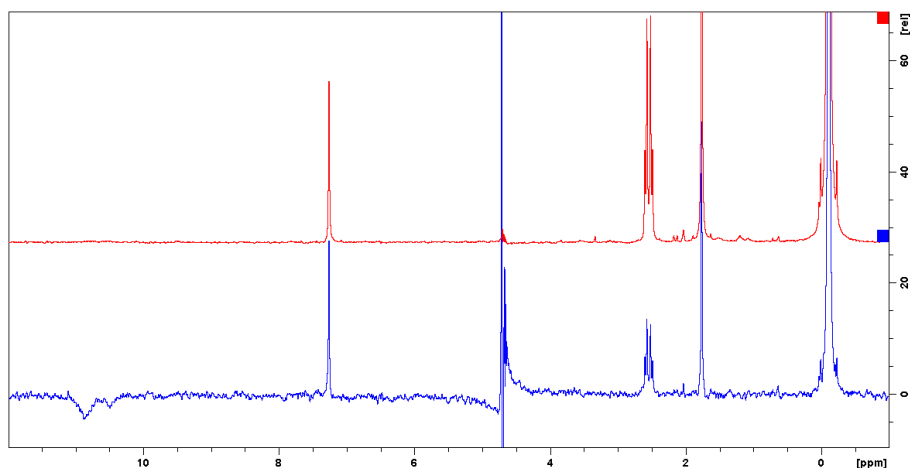


Figura 4.73. Comparativa del espectro de ^1H -RMN de la timina con AuNPs (espectro rojo) con el espectro de WaterLOGSY de la timina con AuNPs (espectro azul). La señal con un desplazamiento químico próximo a 0 es debida al referente TMSP. [Timina] = 10^{-3} M; [AuNPs] = 9.1×10^{-10} M; [citrato] = 3.5×10^{-4} M.

Por último, se trató de estudiar el desplazamiento de citrato cuando la adenina se adsorbe a la superficie de la NP. Para ello se comparó el espectro de resonancia magnética nuclear de las AuNPs solas con otro con un exceso de adenina (3×10^{-3} M) con el fin de visualizar el máximo aumento de la señal de RMN que se produciría al liberar citrato. Para que los espectros pudieran ser comparativos de forma cuantitativa, se añadió un referente que no interacciona con las NPs: el ácido 3-(trimetilsilil)propanoico-D4 (TMSP). La Figura 4.33A muestra el espectro de las AuNPs solas, obteniéndose la señal de citrato y del TMSP (cuya integral se ajustó a 1). Al espectro que se obtuvo en presencia de adenina (Figura 4.33B) se le ajustó también la integral de la señal del TMSP a 1. Cuando se superpusieron estos espectros (Figura 4.33C) no se detectó ningún cambio, por lo que no se pudo realizar ninguna titulación por RMN.

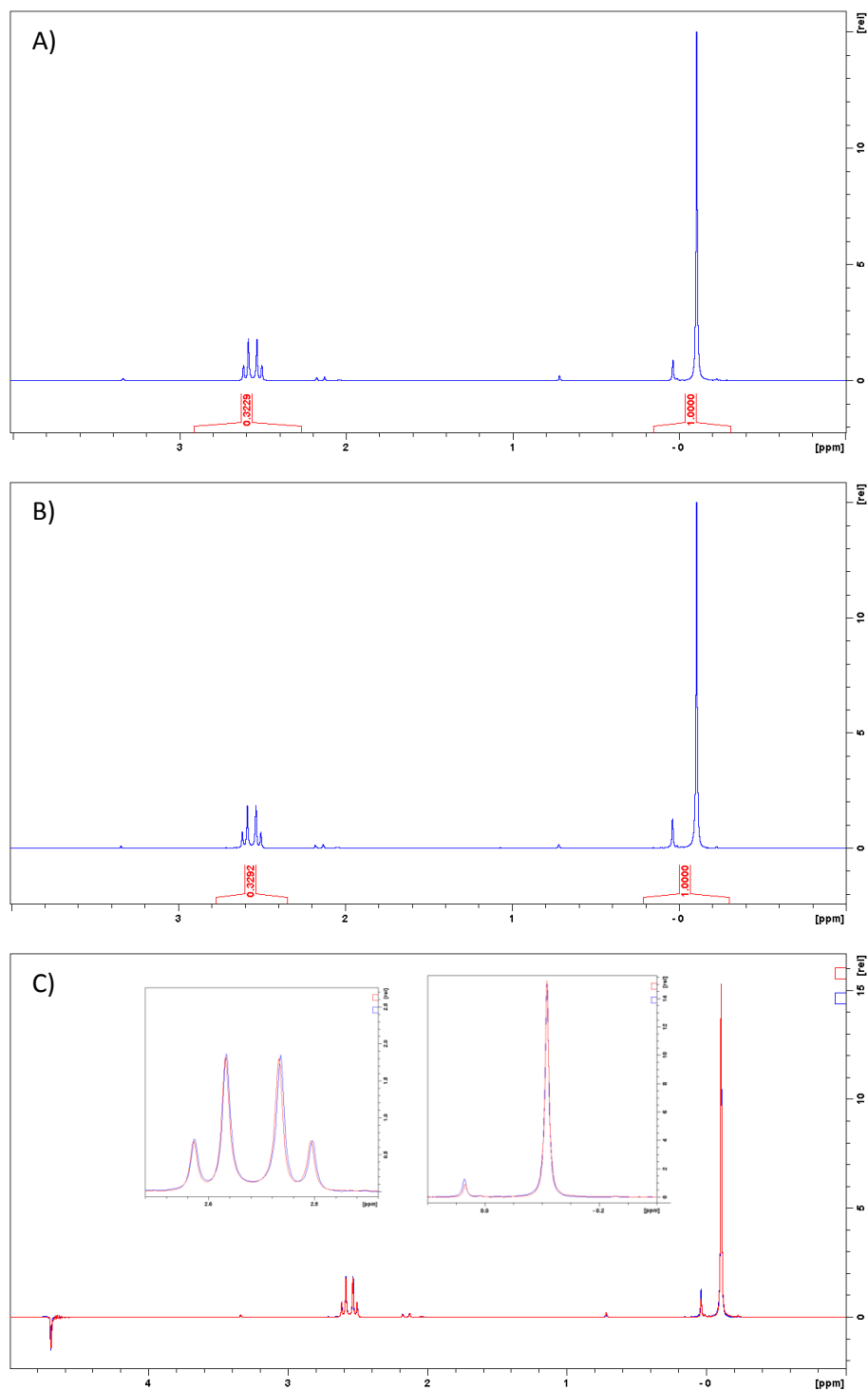
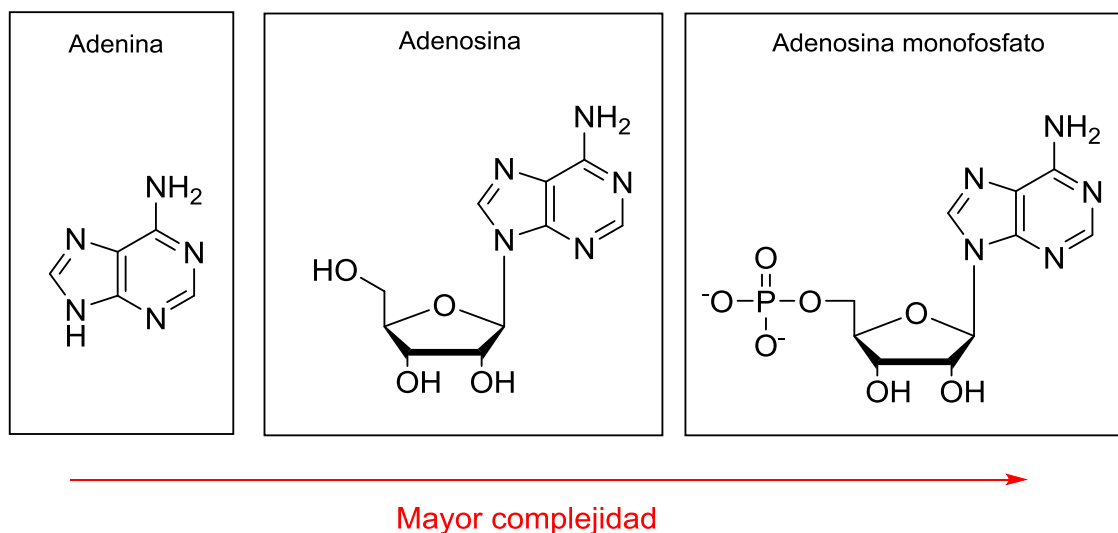


Figura 4.74. A) Espectro de ¹H-RMN de las moléculas de citrato en una solución coloidal. B) Espectro ¹H-RMN de las moléculas de citrato en una solución coloidal a una concentración de adenina de 3×10^{-3} M. C) Comparativa de los espectros de ¹H-RMN de las moléculas de citrato en ausencia de base (espectro rojo) con el espectro de ¹H-RMN de las moléculas de citrato en exceso de adenina (espectro azul). La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. En todos estos espectros $[\text{citrato}] = 4.8 \times 10^{-4}$ M.

4.4. Efecto de la complejidad estructural del monómero en la interacción

Para estudiar cómo afecta a la interacción la complejidad estructural del monómero, se compararon los resultados de la adenina (subsección 4.31), de la adenosina y de la adenosina monofosfato (véase sus estructuras en el Esquema 4.3).



Esquema 4.5. Secuencia de la complejidad estructural de la unidad monomérica del ADN adenina.

4.4.1. Adenosina

En la Figura 4.34A se muestra la evolución de la banda SPR de AuNPs de 14.8 nm a diferentes concentraciones de adenosina, donde estos desplazamientos en la banda SPR también pudieron seguirse por los cambios colorimétricos de las muestras (Figura 4.34B). A diferencia de las bases, en este caso no se llegó a definir completamente la banda asociada a las nanopartículas agregadas, hecho perceptible en las muestras que no adquirieron el color azul, formándose un hombro cuyo centro se estableció a una longitud de onda de 590 nm.

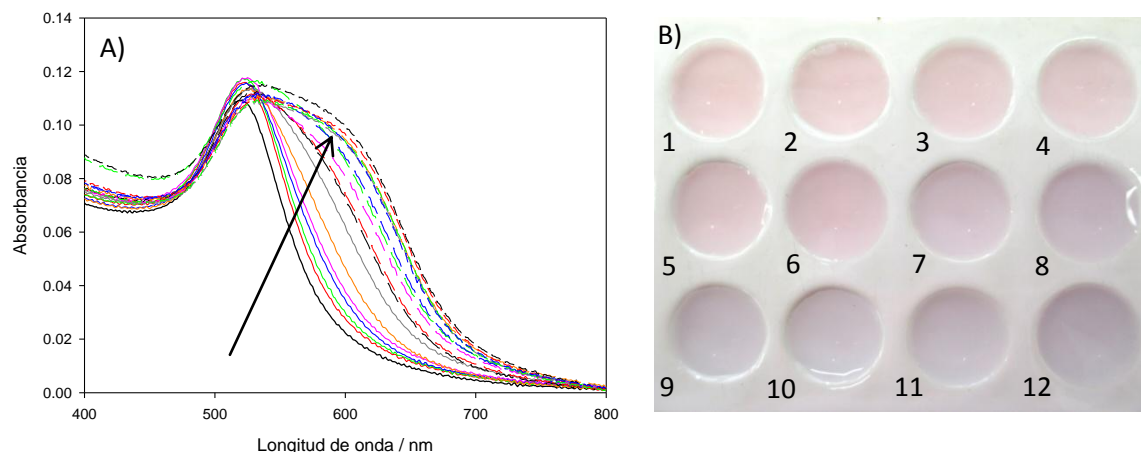


Figura 4.75. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenosina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir el nucleótido y corresponden a un intervalo [adenosina] = 6.0×10^{-5} a 3.2×10^{-3} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la adenosina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenosina: 1) 0 M; 2) 6.0×10^{-5} M; 3) 1.0×10^{-4} M; 4) 1.2×10^{-4} M; 5) 3.0×10^{-4} M; 6) 5.0×10^{-4} M; 7) 7.0×10^{-4} M; 8) 9.0×10^{-4} M; 9) 1.0×10^{-3} M; 10) 1.6×10^{-3} M; 11) 2.4×10^{-3} M; 12) 3.2×10^{-3} M.

Aparentemente el grado de agregación (A_{590}/A_{520}) respecto a la concentración de nucleósido no muestra una tendencia sigmodial (Figura 4.35), aunque esto es debido a la gran extensión del intervalo de agregación (abarcando tres órdenes de magnitud, 10^{-5} - 10^{-3} M) que hace que la zona donde se concentran los primeros puntos no se pueda apreciar bien en la Figura 4.35. A diferencia de la adenina, no se produjo reversión alguna de la agregación, manteniéndose fija la posición de la banda a altas concentraciones de adenosina ($> 10^{-3}$ M).

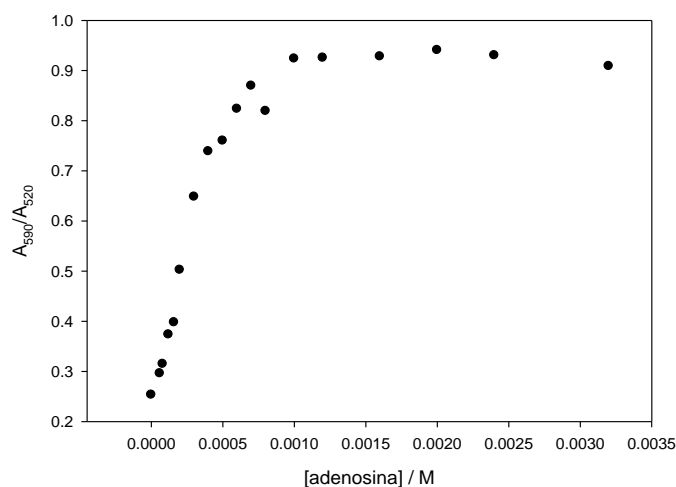


Figura 4.76. Evolución del grado de agregación (A_{590}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de adenosina. La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M.

La Figura 4.36 muestra el ajuste obtenido de los valores de A_{590}/A_{520} según la concentración de adenosina siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand (ecuación 4.1) en el intervalo 8.0×10^{-5} a 8.0×10^{-4} M. La constante obtenida presentó un valor de $K_f = 4900 \pm 170 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$; $\Delta G^0 = -21.0 \pm 0.1 \text{ kJ mol}^{-1}$.

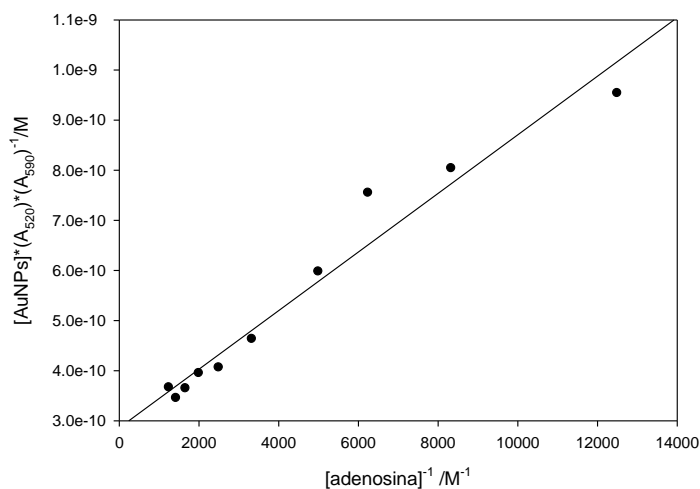


Figura 4.77. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{590}/A_{520} en el intervalo $[\text{adenosina}] = 8.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ a $8.0 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Al igual que en las bases, también se determinó la constante de formación a través de los parámetros colorimétricos de la teoría CIELab y por las áreas de las bandas de las nanopartículas agregadas obtenidas por deconvolución. La Figura 4.31 muestra la variación de los parámetros a^* y b^* respecto a la concentración de adenosina, oscilando L entre 90 y 92. En todo el rango de trabajo la componente a^* se mantiene positiva (color rojo) siendo su valor superior a b^* hasta 10^{-3} M, punto en el que los parámetros colorimétricos se asemejan en sus valores absolutos. Por otra parte el parámetro b^* se mantiene amarillo hasta 2×10^{-4} M, a partir del cual toma valores negativos confiriendo a las muestras tonalidades moradas. Para la componente asociada al color rojo (a^*) se obtuvo una $K_f = 4100 \pm 390 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, lo que equivale a $\Delta G^0 = -20.6 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1}$; con el parámetro b^* se calculó una constante con un valor de $5900 \pm 1500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, es decir, $\Delta G^0 = -21.5 \pm 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Figura 4.38). El valor obtenido por absorbancia resulta ser un punto intermedio entre los calculados por los parámetros a^* y b^* .

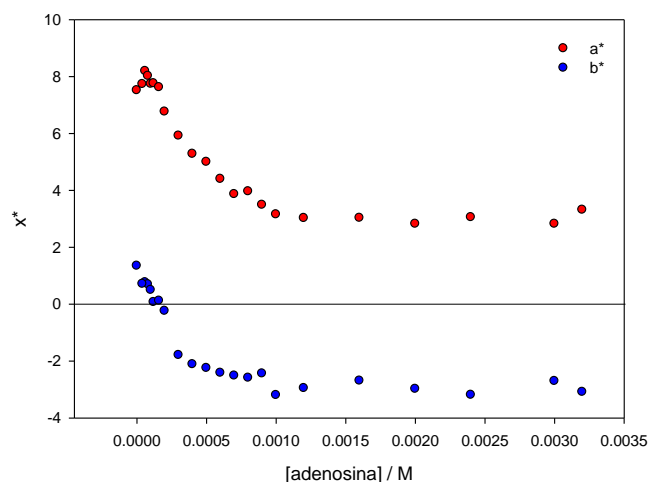


Figura 4.78. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de adenosina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L = 91 \pm 1$.

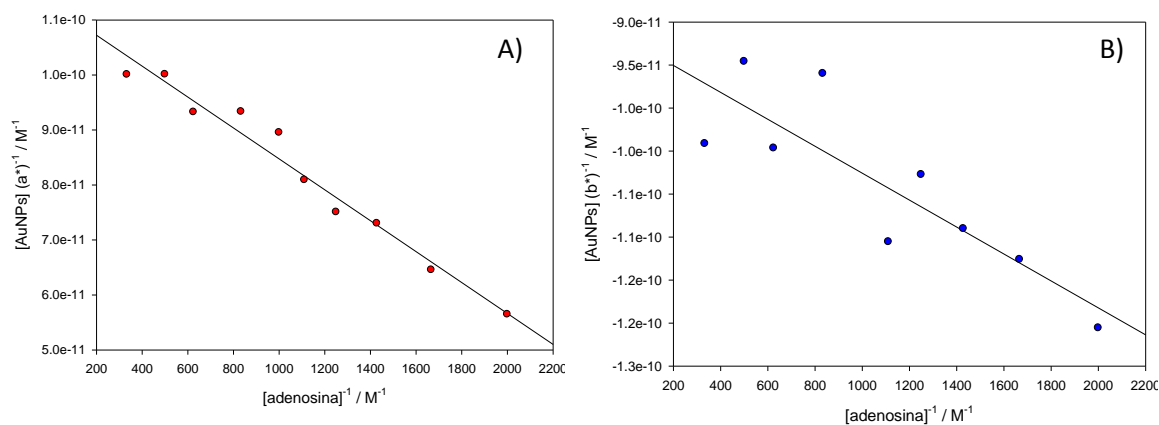


Figura 4.79. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab a la ecuación de Benesi-Hildebrand. A) Ajuste lineal del parámetro a^* en el intervalo $5.0 \times 10^{-4} - 3.0 \times 10^{-3}$ M. B) Ajuste lineal del parámetro b^* en el intervalo $5.0 \times 10^{-4} - 3.0 \times 10^{-3}$ M.

En la Tabla 4.9 se muestran los parámetros (λ y área) de las bandas asociadas a las distintas formas de las nanopartículas según el grado de agregación y obtenidas teóricamente por deconvolución. El ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand de los valores de la proporción de áreas de las bandas de AuNPs agregadas (véase Figura 4.39) proporcionó un valor de $K_f = (4900 \pm 350) \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$; $\Delta G^0 = -21.0 \pm 0.2 \text{ kJmol}^{-1}$.

Tabla 4.16. Parámetros obtenidos por deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de adenosina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a estructuras de AuNPs agregadas.

[Adenosina]/ M	λ_1/nm	Área ₁	λ_2/nm	Área ₂	λ_3/nm	Área ₃	A _{free}	A _{agre}
0.00	522	7.366	-	-	-	-	1.000	0.000
6.0 x10⁻⁵	525	10.818	-	-	-	-	1.000	0.000
8.0 x10⁻⁵	525	11.513	-	-	-	-	1.000	0.000
1.2 x10⁻⁴	526	10.167	578	0.399	-	-	0.962	0.038
1.6 x10⁻⁴	525	11.356	565	0.833	-	-	0.932	0.068
2.0 x10⁻⁴	523	9.041	564	2.617	-	-	0.776	0.224
3.0 x10⁻⁴	522	6.521	568	4.139	-	-	0.612	0.388
4.0 x10⁻⁴	522	6.549	576	5.072	-	-	0.563	0.436
5.0 x10⁻⁴	522	5.803	578	4.985	-	-	0.538	0.462
6.0 x10⁻⁴	524	5.063	587	6.368	-	-	0.443	0.557
7.0 x10⁻⁴	525	5.312	594	5.694	-	-	0.483	0.517
8.0 x10⁻⁴	523	5.600	561	0.096	588	5.172	0.515	0.485
1.0 x10⁻³	527	5.721	567	0.294	603	6.175	0.469	0.531
1.2 x10⁻³	528	5.856	569	0.243	604	6.514	0.464	0.536
1.6 x10⁻³	528	5.726	570	1.075	610	7.621	0.397	0.603
2.0 x10⁻³	529	5.553	571	0.639	610	6.438	0.440	0.560
2.4 x10⁻³	531	6.196	573	0.822	611	6.136	0.471	0.529
3.2 x10⁻³	527	5.462	566	0.177	599	6.069	0.466	0.534

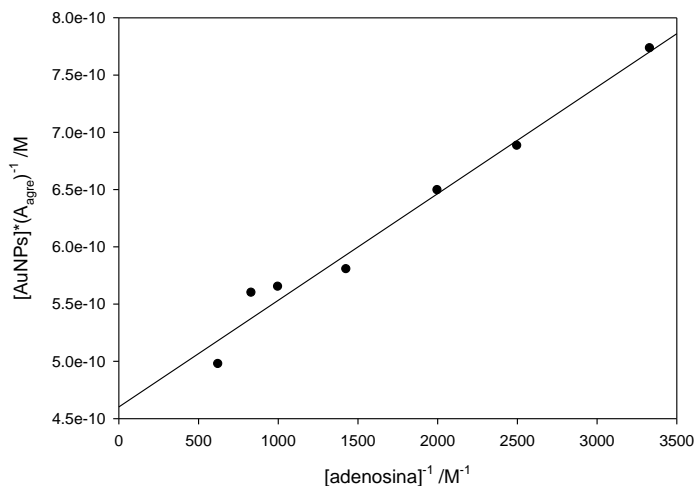


Figura 4.80. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo [adenosina] = 3.0×10^{-4} M a 1.6×10^{-3} M.

4.4.2. Adenosina monofosfato

En el caso del nucleótido AMP, su adición no produjo ninguna agregación del oro coloidal (véase Figura 4.40). Dicho resultado, que coincide con resultados previos,¹⁴¹ es esperable ya que la adsorción de este monómero en la superficie de la AuNP produce un aumento de la carga negativa de la nanopartícula. Para este tipo de sistemas, donde las NPs están protegidas por moléculas cargadas, algunos autores han estudiado su interacción a través de la agregación inducida por sal.^{49,157} Con el propósito de comprobar que la interacción AMP/AuNPs se produce a pesar de no haber cambios en la longitud de la banda SPR, se estudió el efecto protector del AMP adsorbido frente a la agregación inducida por sal. En la Figura 4.41A se observa que conforme aumenta la cantidad de AMP el efecto de la sal es menor, hasta el punto de que a concentraciones de AMP superiores a 5×10^{-5} M se previene totalmente la agregación producida por la sal, no percibiéndose ningún cambio de color (Figura 4.35B).

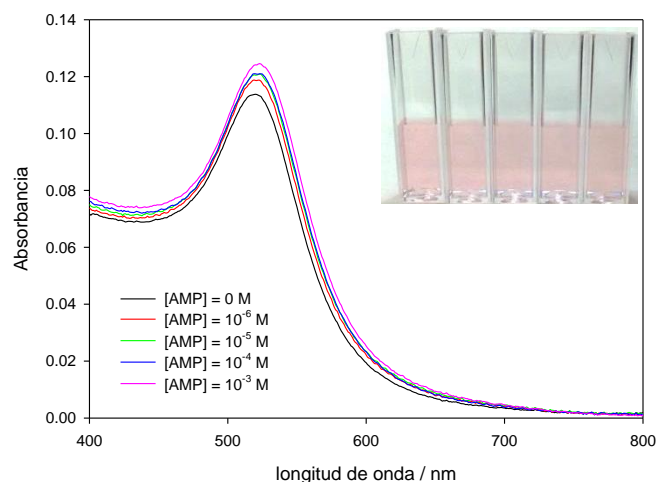


Figura 4.81. Espectro de absorción de AuNPs con diferentes concentraciones de AMP. Los espectros fueron tomados una hora después de mezclar los componentes. Las fotografías insertadas corresponden a las muestras justo después de hacer la medida.

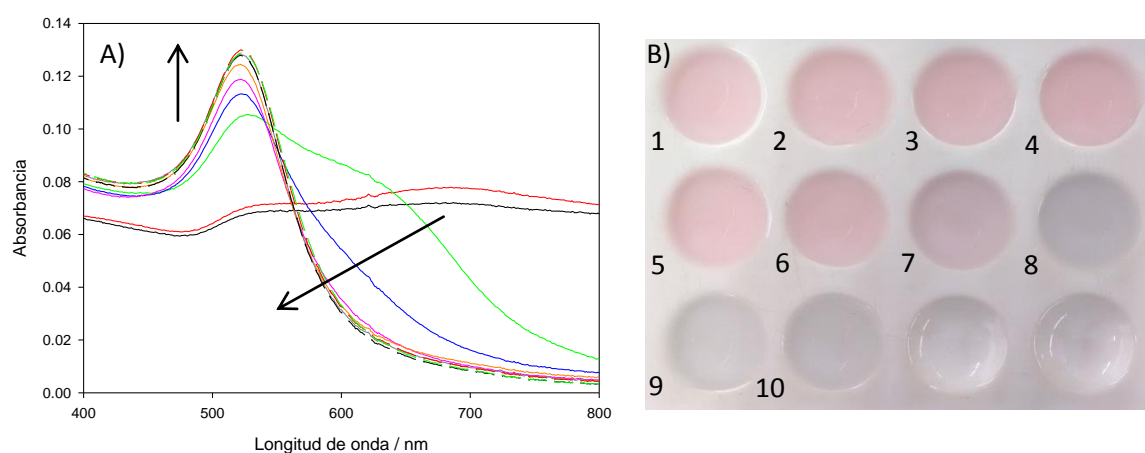


Figura 4.82. A) Evolución de los espectros de absorción de las AuNPs a diferentes concentraciones de AMP en presencia de sal. Los espectros fueron tomados 30 minutos después de añadir la sal. $[\text{NaCl}] = 0.075 \text{ M}$; $[\text{AMP}] = 10^{-8}$ a 10^{-3} M . Las flechas indican el desplazamiento de la banda SPR conforme aumenta la concentración de AMP. B) Fotografía de las muestras a los 30 minutos de añadir NaCl. $[\text{NaCl}] = 0.075 \text{ M}$. Cada casilla corresponde a una concentración diferente de AMP: 1) $1 \times 10^{-3} \text{ M}$; 2) $5 \times 10^{-4} \text{ M}$; 3) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$; 4) $5 \times 10^{-5} \text{ M}$; 5) $1 \times 10^{-5} \text{ M}$; 6) $5 \times 10^{-6} \text{ M}$; 7) $1 \times 10^{-6} \text{ M}$; 8) $1 \times 10^{-7} \text{ M}$; 9) $1 \times 10^{-8} \text{ M}$; 10) 0 M .

4.4.3. Análisis de los resultados obtenidos

La presencia de la molécula de desoxirribosa así como el grupo fosfato aumentan el número de factores influyentes en la interacción monómero/AuNPs. Por ejemplo, en el caso de

las bases los únicos factores a considerar serían las concentraciones de los diferentes componentes así como el pH del medio, ya que en medios ácidos ($\text{pH} < 4$) o básicos ($\text{pH} > 9$) las bases estarán cargadas afectando a la interacción (este punto se desarrollará en la sección 4.5). Sin embargo, para los nucleósidos hay que añadir la presencia del azúcar, que es un grupo voluminoso y que inutiliza uno de los nitrógenos pudiendo afectar al proceso de agregación e incluso a la interacción. Por último, en el caso de los nucleótidos se le añade a todo lo mencionado anteriormente la gran influencia del grupo fosfato. De hecho a igualdad de condiciones (pH, fuerza iónica, concentración de AuNPs) se observó una disminución de la constante aparente conforme el monómero era más complejo, como se refleja en la Tabla 4.10.

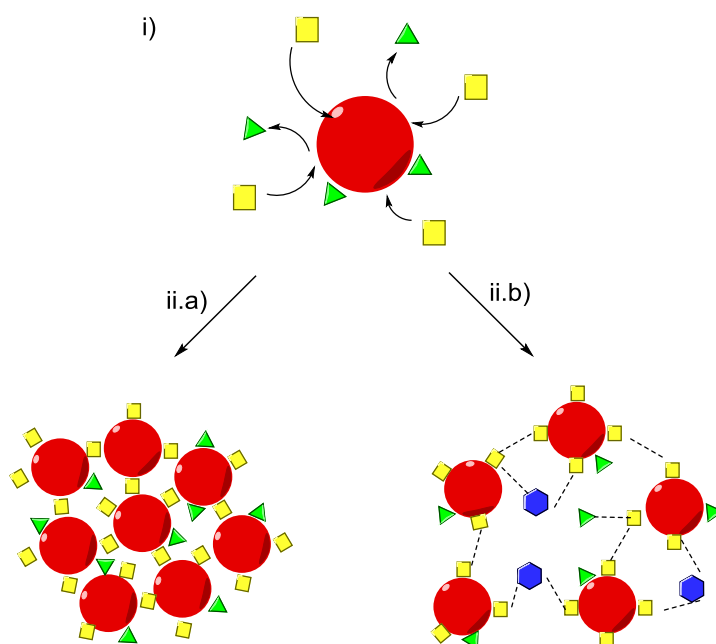
Tabla 17. Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con los diferentes nucleótidos procedentes de la adenina.

Monómero	Adenina	Adenosina	AMP*
$(\lambda_{\text{max}})_{\text{ag}} / \text{nm}$	671	~590	0
$K_{\text{ap}} / \text{dm}^3\text{mol}^{-1}$	2.0×10^6	4900	0
$\Delta G_{\text{ap}} / \text{kJmol}^{-1}$	-35.9	-21.0	0

* No se apreció agregación alguna

Es interesante especificar que a diferencia del estudio de las bases, en este sistema la componente de la K_{ap} que varía es la constante de agregación y no la de interacción (véase Esquema 4.2) ya que los monómeros interaccionan por el fragmento de la base,⁷⁰ que en este caso es la misma (adenina). Es decir, $(K_{\text{ag}})_{\text{A}} > (K_{\text{ag}})_{\text{Ad}} \gg (K_{\text{ag}})_{\text{AMP}}$, siendo $(K_{\text{ag}})_{\text{AMP}} = 0$: un aumento de la complejidad del monómero dificulta el proceso de agregación. El caso del AMP es obvio, se están adicionando cargas negativas en la superficie de la AuNPs lo que sigue favoreciendo las repulsiones electrostáticas entre ellas. Sin embargo, explicar las diferencias producidas en la agregación es más complejo de explicar. La agregación inducida por las bases o los nucleósidos se produce por un mecanismo de no cruzamiento:¹⁴¹ el ligando desplaza al agente estabilizante (citrato en este caso) y las colisiones entre NPs (regidas por el movimiento browniano) son las que forman los agregados. Sin embargo, como la interacción se produce por la base,^{69,70} se esperaría que el desplazamiento de iones citrato fuera el mismo y por lo tanto que los agregados fueran parecidos. La explicación más lógica a este hecho sería que la agregación no fuese exclusivamente de “no cruzamiento”. El principal criterio para establecer que la agregación inducida por monómeros no es por entrecruzamiento fue la rapidez con la que se produce el proceso,¹⁴¹ ya que los que ocurren por un mecanismo de entrecruzamiento requieren

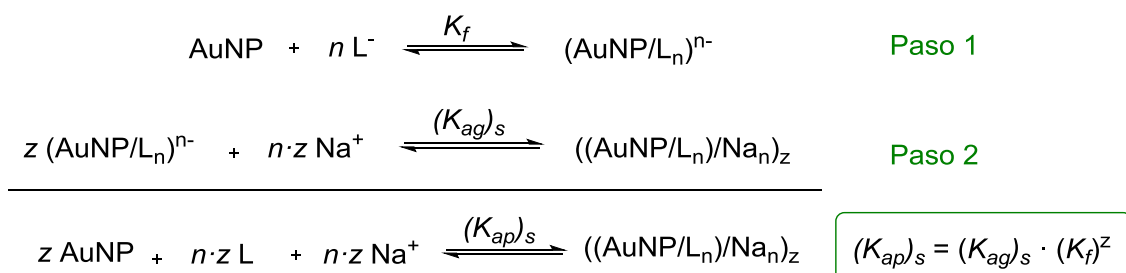
horas.²² Aunque se produzca el desplazamiento de las moléculas de citrato, los grupos funcionales del ligando también ejercen su influencia: la adenina presenta más átomos de nitrógeno disponibles que la adenosina, de manera que dichos átomos deben servir de punto de unión con otras nanopartículas. Esto nos lleva a que el proceso de agregación tenga varias vías posibles (véase Esquema 4.4): i) la adsorción del monómero con el posible desplazamiento de las moléculas de citrato; ii.a) interacción de las bases adsorbidas con las otras nanopartículas, siendo el ligando punto de unión entre las AuNPs; o ii.b) formando las bases adsorbidas puentes de hidrógenos con otros ligandos adsorbidos o con moléculas que se encuentre en el medio. También podrían producirse las etapas a y b conjuntamente.



Esquema 4.6. Posibles etapas para la agregación de AuNPs inducida por los monómeros del ADN. El triángulo verde corresponde a las moléculas de citrato, los cuadrados amarillos son las moléculas de monómero y los hexágonos azules son las diferentes posibles moléculas de citrato, disolvente o base que ayudan a construir los enlaces de hidrógenos. Las figuras no están a escala.

Para cerrar esta subsección, indicar que no es comparable la constante aparente obtenida por la agregación inducida por sal (la que se obtendría para el estudio de AuNP/AMP) con la obtenida por la inducida por el propio monómero. Como se muestra en el Esquema 4.5, la constante tiene el mismo formato que el mostrado en el Esquema 4.1: de hecho, la constante de interacción (K_I) es la misma en ambas situaciones, ya que es la constante de interacción de la base; pero la constante de agregación no puede ser la misma, ya que las moléculas que provocan la agregación son diferentes: obviamente la tendencia del catión Na^+ a aproximarse a las cargas

de los aniones citrato no puede ser la misma que la del monómero (sin carga neta) en su acercamiento a una superficie cargada negativamente. Por esto, estas dos constantes aparentes son diferentes: $K_{ap} \neq (K_{ap})_s$.



Esquema 4.7. Relación entre la constante aparente y las constantes de las diferentes etapas del proceso de agregación inducida por NaCl.

4.5. Influencia del pH en la interacción de la adenina con las nanopartículas de oro

Para justificar el orden de afinidad de los nucleósidos, Letsinger y Mirkin se basaron en la disponibilidad del par de electrones de los nitrógenos y oxígenos que interaccionan.⁶⁰ Por lo tanto el número de formas canónicas (es decir, la deslocalización de estos electrones) y la accesibilidad de estos átomos a la superficie de la nanopartícula son los factores que definen el grado de afinidad de la base con la AuNP. Esto implica que el pH del medio sea un factor determinante, ya que el grado de protonación o desprotonación de los nitrógenos está vinculado a los electrones que interaccionan con la superficie del oro, así como a la carga neta de la molécula. No obstante no se conocen estudios a este respecto.

El trabajo desarrollado en las secciones anteriores corresponde a un pH próximo a 6.0, en el que las moléculas de adenina son neutras. Para estudiar la influencia del pH en la interacción adenina/AuNPs, se repitió el procedimiento antes realizado a pH ácido y básico. Hay que tener presente que el pH no pudo ser excesivamente ácido, ya que esto provocaría la inmediata agregación de las NPs (los pKas del citrato son 3.13, 4.76 y 6.40).¹⁵⁸ Por su parte, la adenina presenta un $\text{pK}_{a1} = 4.1$ y $\text{pK}_{a2} = 9.8$.¹⁵⁹

La Figura 4.42 muestra los espectros de absorción de AuNPs a distintas concentraciones de adenina y diferentes condiciones de pH, mientras que la Figura 4.43 muestra los colores de dichas muestras. Como se puede observar, a medio básico (pH = 10) no se produjo la agregación. A un pH próximo al neutro, se apreció agregación a partir de una concentración de adenina 10^{-6} M, manteniéndose la posición de la banda y siendo invariable el color de la muestra a concentraciones mayores ($\lambda_{\text{max}} \approx 670$ nm, color azul). En medio ácido (pH = 4), la

agregación tuvo lugar a concentraciones más bajas que en las otras condiciones, pero la posición de la banda SPR aparece a una longitud de onda menor que a pH = 6 ($\lambda_{\text{max}} \approx 630$ nm, color morado).

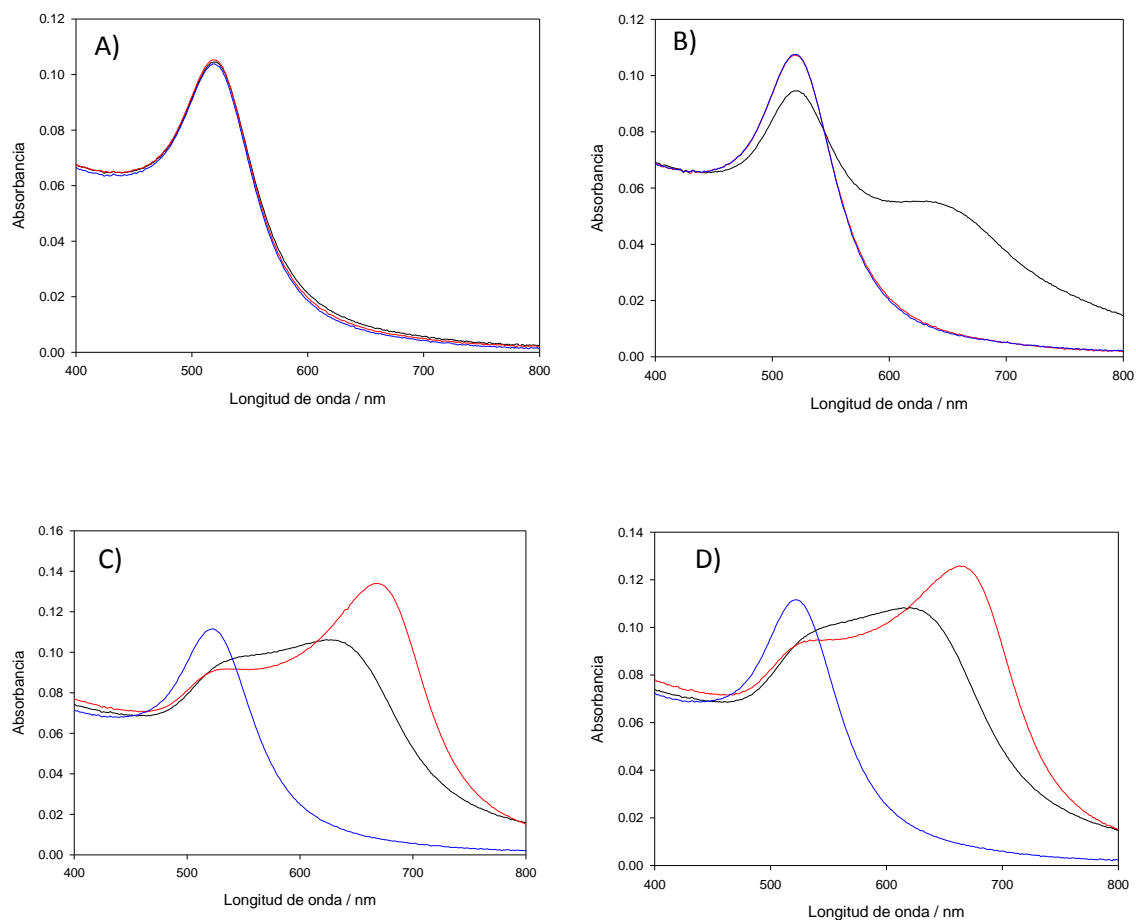


Figura 4.83. Espectros de absorción de AuNPs con diferentes condiciones de pH (la línea negra corresponde a un pH = 4.0; la línea roja a un pH = 6.2 y la línea azul a un pH = 10.0) y concentraciones de adenina: a) 10^{-8} M; b) 10^{-7} M; c) 10^{-6} M; d) 10^{-5} M. $[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10}$ M.

En medio ácido, dado el valor del primer pK_a de la adenina, una proporción de ésta se encuentra en estado catiónico. Por otro lado, atendiendo a los pK_a del citrato, dos de sus tres cargas negativas estarán neutralizadas, lo cual explica la agregación a bajas cantidades de ligando. Así las nanopartículas se pueden aproximar más fácilmente ya que las repulsiones que las estabilizan son menores, siendo además la aproximación de la adenina a la superficie de la nanopartícula más favorecida por las atracciones electrostáticas. Por otra parte, que no se alcance una agregación tan elevada como la conseguida a pH = 6 puede deberse a que conforme

los cationes se van adsorbiendo a la superficie de la nanopartícula se va produciendo una disminución de la carga neta negativa, hasta alcanzarse una inversión de la carga total, por lo que los agregados de nanopartículas se encontrarían protegidos por cargas positivas. De esta forma el aglomerado de nanopartículas no puede aumentar más cuando ha tenido lugar la inversión de carga superficial. En el caso de $\text{pH} = 10$, parte de adenina se encuentra desprotonada (estado aniónico) ya que el segundo pK_a es próximo a 10; la repulsión entre las AuNPs y el anión de adenina impide la interacción entre ellos. A través de los cambios de la banda SPR conforme la concentración de adenina aumenta a $\text{pH} = 4$, es posible obtener la evolución del proceso de agregación (véase Figura 4.44). Resulta sorprendente ver cómo se obtiene una agregación mayor que la mostrada en las Figuras 4.42 y 4.43 gracias a un riguroso análisis de la concentración de adenina. La comparación de estos resultados muestra que la reversión de carga se produce en el intervalo 10^{-7} a 10^{-6} M, confirmando la hipótesis planteada en el párrafo anterior.

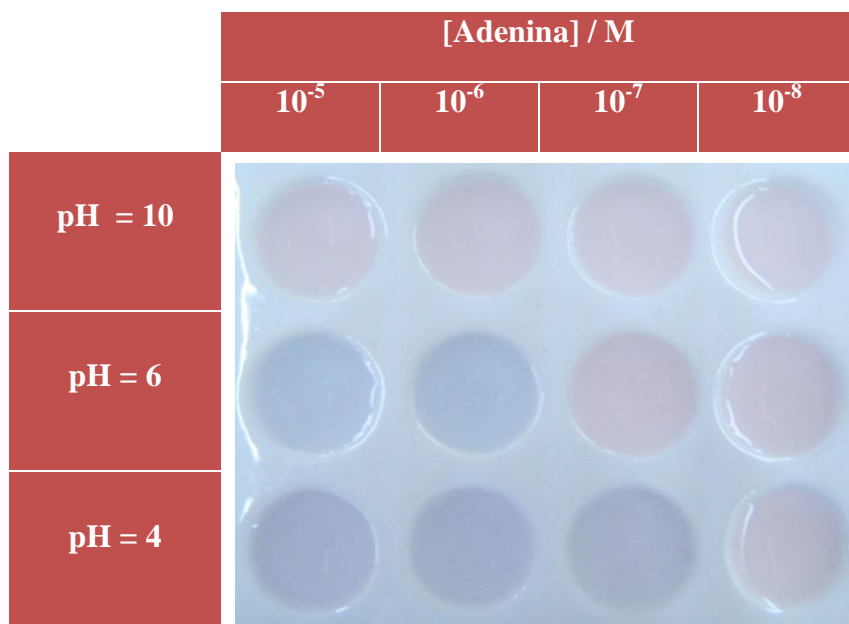


Figura 4.84. Color de muestras de AuNPs en función de la concentración de adenina y pH del medio.

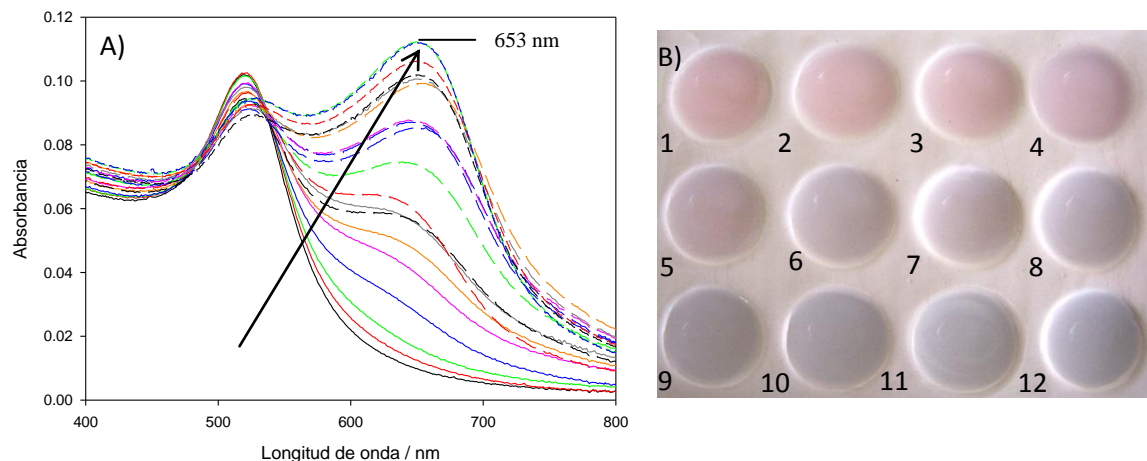


Figura 4.85. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenina a pH=4. El espectro fue tomado una hora después de añadir la adenina. El intervalo de concentraciones de la base fue de 5×10^{-8} a 2×10^{-7} M. B) Fotografía de las muestras una hora después de añadir la adenina a las AuNPs a pH = 4. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenosina: 1) 0 M; 2) 5.0×10^{-8} M; 3) 6.0×10^{-8} M; 4) 7.0×10^{-8} M; 5) 8.0×10^{-8} M; 6) 9.0×10^{-8} M; 7) 1.0×10^{-7} M; 8) 1.2×10^{-7} ; 9) 1.4×10^{-7} ; 10) 1.6×10^{-6} M; 11) 1.8×10^{-7} ; 12) 2.0×10^{-7} .

El ajuste del grado de agregación (A_{653}/A_{520}) a la ecuación de Benesi-Hildebrand (Figura 4.45) proporcionó una constante (aparente) de formación de $(6.3 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$, y un valor de ΔG^0 para el proceso de agregación de $-(38.8 \pm 0.3) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. La Tabla 4.11 muestra una comparativa de los resultados obtenidos a las distintas condiciones de pH estudiadas para la adenina. Al comparar los resultados queda patente que la presencia de cargas positivas en el ligando favorece la interacción con las nanopartículas aniónicas, siendo la constante del proceso tres veces mayor. Estos resultados vuelven a confirmar que considerar la longitud de onda como criterio para establecer la afinidad de los ligandos no es un procedimiento correcto. En base a la Figura 4.42 se podría llegar a concluir que la interacción con adenina a pH = 6 es más favorable que a pH = 4.

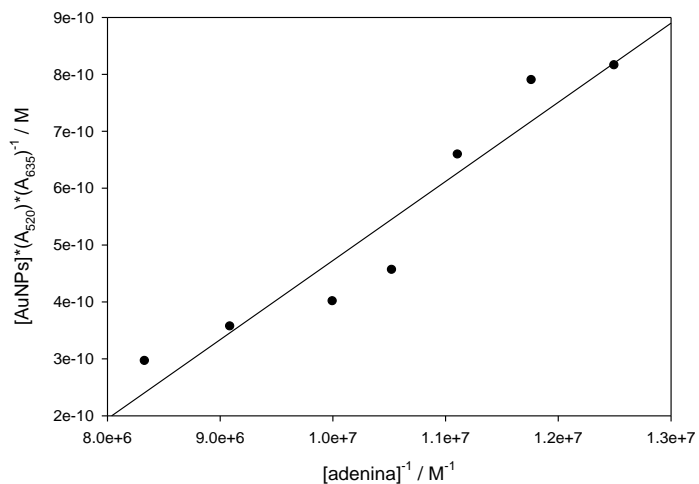


Figura 4.86. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{635}/A_{520} en el intervalo $[\text{adenina}] = 8.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ a $1.2 \times 10^{-7} \text{ M}$ a un $\text{pH} = 4$.

Tabla 4.18. Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con adenina a diferentes pH.

	pH = 4.0	pH = 6.2	pH = 10*
$(\lambda_{\text{max}})_{\text{ag}} / \text{nm}$	635	671	0
$K_{\text{ap}} / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$	6.3×10^6	2.0×10^6	0
$(\Delta G^0)_{\text{ap}} / \text{kJmol}^{-1}$	-38.8	-35.9	0

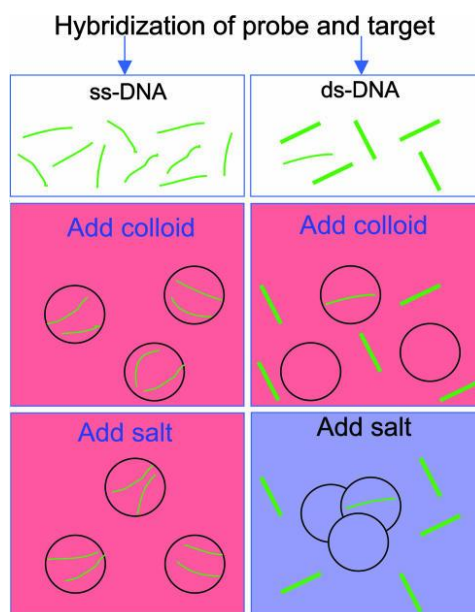
* No se apreció agregación alguna

5. Interacción de ADN de cadena larga con nanopartículas de oro

5.1. Motivación, antecedentes y objetivos

Los trabajos de Huixiang Li y Lewis J. Rothberg en la detección de ADN de cadena simple^{77,78} supusieron un impulso en el uso de AuNPs sin modificar como biosensores, eludiendo la necesidad de funcionalizar al coloide con moléculas selectivas al analito a detectar. El pilar del método desarrollado por H. Li y L. J. Rothberg se basa en la diferencia de propiedades de los oligonucleótidos según sean de cadena simple o doble. El ADN de cadena simple es mucho más flexible que el de doble cadena, debido a la estructura de doble hélice y a los apilamientos π entre bases, de manera que el oligonucleótido puede exponer las bases a la superficie de la nanopartícula produciéndose la adsorción de la hebra en la superficie. Este complejo presenta una densidad de carga negativa mayor que la nanopartícula de por sí,⁷⁷⁻⁷⁹ por lo que la cantidad de sal inerte para provocar la agregación de éste será mayor que la necesaria para alcanzar la aglomeración de simples nanopartículas. En el caso del ADN de doble cadena, la estructura es rígida y no hay posibilidad de que se produzcan interacciones base-oro, por lo que las dobles hebras de ADN se mantienen distanciadas por las repulsiones electrostáticas. Que en el caso del ADN de cadena simple se forme un complejo AuNPs-ADN mientras en el de doble cadena no se produzca la formación de éste hace que la adición de sal provoque la agregación de las AuNPs en el sistema del ADN de doble cadena mientras que en el de simple cadena el color rojo característico de las AuNPs dispersas permanece (véase Esquema 5.1). La sensibilidad del método es inmejorable, hasta el punto de poderse determinar la disparidad de una unidad monomérica en oligonucleótidos complementarios de 24 pares de bases. No obstante dicho procedimiento presenta un hándicap: no es aplicable a moléculas largas de ADN. Como se ha descrito en el Capítulo 1, la longitud del ADN afecta a sus propiedades; así un oligonucleótido de doble cadena con una longitud inferior a los 50 nm se puede considerar como una vara rígida. Por el contrario, a longitudes superiores y en unas condiciones en las que no se favorezca la compactación el ADN se encuentra en una extensión aleatoria. Sin embargo, no se desarrolla justificación alguna de la inviabilidad del método con moléculas largas de ADN, las cuales se acercan más a la realidad que a oligonucleótidos con decenas de pares de bases en

sistemas biológicos. Por este motivo, resulta interesante conocer la posible interacción entre AuNPs aniónicas y ADN de doble cadena larga.



Esquema 5.8. Representación esquemática del método colorimétrico desarrollado por H. Li y L. J. Rothberg para la diferenciación de oligonucleótidos de cadena simple y doble. Los círculos representan nanopartículas de oro. Reimpreso con permiso de H. Li and L. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 14036–14039.⁷⁷ Copyright 2004 National Academy of Sciences.

Por otra parte ha habido un especial interés en la compactación del ADN por “entornos saturados” (*crowded environment*) dentro de la célula, donde la estructura y estabilidad del biopolímero se ve afectada a causa de la presencia de múltiples moléculas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, entre otras.¹⁶⁰ En este aspecto, el uso de nanopartículas cargadas negativamente suponen un excelente modelo para simular estos entornos dentro de la célula, gracias a la viabilidad para modificar su carga y tamaño.¹⁶¹ Sin embargo estos trabajos se han desarrollado con nanopartículas de sílice,^{162,163} las cuales presentan interesantes propiedades ópticas pero muy diferentes a las nanopartículas de metales nobles¹⁶⁴ además de no presentar afinidad alguna para interactuar específicamente con el ADN.¹⁶¹ Dada la mayor flexibilidad del ADN de cadena larga así como la afinidad de las nucleobases para interactuar con el oro coloidal, profundizar en posibles interacciones entre ADN largo y AuNPs resulta clave para el desarrollo de sistemas de detección de ADN con tamaños similares a los presentes En sistemas biológicos.

Considerando todo lo expuesto, el objetivo del presente capítulo es el establecimiento de las bases de un sistema colorimétrico de detección de ADN de cadena larga con AuNPs, así

como el estudio de las interacciones entre ambos. Además, se analiza la posibilidad de generar complejos ADN-AuNPs sin necesidad de modificar la superficie del oro coloidal.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

El cacodilato de sodio trihidratado $[(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ y el polietilenglicol (PEG, con un peso molecular promedio de $600 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich, mientras que el cloruro sódico (NaCl) fue de Merck. El ADN procedente de bacteriófagos T4 GT7 [ADN-T4, 166000 pares de bases (bps) con una longitud de contorno de $57 \mu\text{m}$] fue adquirido de Nippon Gene Co., LTP. Los tintes fluorescentes YOYO-1 y Gelgreen fueron obtenidos de Molecular Probes Inc. y de Biotium respectivamente; el antioxidante 2-mercaptoetanol (2-ME) de Wako Pure Chemical Industries. Todos los reactivos se utilizaron sin ninguna purificación previa.

Las nanopartículas de $14.8 \pm 1.8 \text{ nm}$ fueron sintetizadas y caracterizadas como se describió en el Capítulo 3.

El ADN de doble cadena de *calf thymus* (ADN-CT: 8-15 kbps) se adquirió de Sigma-Aldrich y se utilizó sin purificación alguna; la proporción en absorbancia de la disolución stock de ADN a 260 nm y 280 nm estuvo entre 1.8 y 1.9 ($A_{260}/A_{280} = 1.87$), lo que confirma la pureza del reactivo dada la ausencia de proteínas.⁴⁵ La concentración de la disolución stock de polinucleótido se determinó por espectroscopía de absorción a partir de la absorptividad molar ($\epsilon = 6600 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 258 nm, expresada la concentración de ADN en grupos fosfatos).¹⁶⁵ Las muestras y las disoluciones de ADN se prepararon en un tampón de cacodilato ([cacodilato] = 10^{-3} M ; [NaCl] = 0.01 M), cuidadosamente ajustado a pH=7 con ayuda de HCl y NaOH. Las disoluciones se prepararon en agua desionizada, siendo su conductividad menor a $10^{-6} \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$.

5.2.2. Preparación del ADN de cadena simple

La disolución madre de ADN de cadena simple fue preparada por desnaturalización térmica: una solución *stock* de ADN de doble cadena se mantuvo en un baño a 85°C durante 25 minutos e inmediatamente se introdujo en un baño de hielo para provocar un enfriamiento rápido que evite la recombinación.¹⁶⁶ Las disoluciones fueron preparadas en las mismas condiciones que las de ADN de doble cadena (cacodilato 10^{-3} M y NaCl 0.01 M). La presencia

mayoritaria de ADN de cadena simple se confirmó por espectroscopía de absorción UV-visible y por espectroscopía de Dicroísmo Circular (CD).

5.2.3. Fragmentación del ADN por sonicación

El ADN se preparó en una disolución de tampón cacodilato esterilizada (pH = 7.0) con una concentración final de 330 µg/ml. El ADN fue fragmentado por sonicación usando un sonicador Fisher Scientific FB120 equipado con una sonda de titanio de 2 mm de diámetro y 80 mm de largo. La potencia se estableció en el máximo del dispositivo (100 W); la amplitud de sonicación fue del 50% (0.5 s de pulso y 0.5 s de pausa) con el fin de evitar un calentamiento excesivo del ADN. La disolución se mantuvo en un baño de agua/hielo durante la sonicación.

Las muestras se tomaron a diferentes tiempos de sonicación, desde los 10 segundos hasta los 10 minutos, y fueron analizadas en un gel de agarosa del 0.8 % (p/v). La agarosa fue disuelta en un microondas en un tampón TAE (Tris acetato 4×10^{-2} M y AEDT 10^{-3} M, con un pH = 8.3) y se añadió el tinte de ácidos nucleicos *Red Safe* para visualizar el ADN por fluorescencia UV. La electroforesis se realizó acorde al protocolo establecido por Sambrook y Russel.⁴⁵ El ADN se visualizó por fluorescencia UV usando un sistema de escaneo Ultima 16si (Hoefer INC., EE.UU.). El referente usado para la estimación de tamaño fue *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher) el cual permite determinar tamaños comprendidos desde 12 kbps hasta 100 bps.

Todo el material utilizado fue esterilizado con un autoclave.

5.2.4. Espectros de absorción en el UV-vis

5.2.4.1. Espectros de absorción para el estudio de la agregación inducida por sal en presencia de ADN

Los espectros de cada muestra fueron registrados cada cinco minutos después de la adición de NaCl. A los 30 minutos los espectros eran prácticamente invariables, tomándose este tiempo como límite máximo de la medida. Las experiencias se realizaron con AuNPs de 14.8 nm, a concentración fija $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, a diferentes cantidades de ADN y a una concentración fija de sal, $[NaCl] = 0.075$ M. Los volúmenes de la alícuotas fueron: 200 µl de la solución coloidal sintetizada, 1600 µl de ADN con concentración variable y 200 µl de NaCl (0.65 M). Finalmente, se reservaron las muestras en un termobloque (298 K) hasta la toma del espectro.

En el caso de las AuNPs de 27 nm el procedimiento fue análogo al descrito, de manera que la concentración final fue $[AuNPs] = 4.7 \times 10^{-10}$ M; para el oro coloidal de 4.5 nm de tamaño se adicionó una alícuota de 230 μ l, 1570 μ l de ADN (de concentración variable) y 200 μ l de NaCl (2.4 M), siendo la concentración final $[AuNPs] = 1.0 \times 10^{-8}$ M.

Dado que las muestras de ADN y NaCl fueron preparadas en el tampón cacodilato-NaCl, se consideraron los cationes sodios provenientes de dicho tampón; los cantidad de contraiones de ADN se considero despreciable dada las bajas concentraciones de trabajo. Las disoluciones de NaCl se prepararon en el tampón cacodilato-NaCl para evitar una mayor dilución, ya que las AuNPs se sintetizan dispersas en agua.

5.2.4.2. Medidas de cinética

La reacción fue monitorizada siguiendo los cambios de intensidad de absorbancia a 520 nm y 668 nm para el proceso de agregación inducido por NaCl ($[Na^+] = 0.075$ M) a diferentes concentraciones de ADN-CT o PEG 600. La temperatura se mantuvo a 25 °C.

5.2.4.3. Medidas de absorbancia a diferentes temperaturas: estudios de *melting* de ADN

Los valores de absorbancia se obtuvieron en un espectrofotómetro Hitachi U-2900, con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz y conectada a un sistema de circulación termostatzado. Se tomó el valor de absorbancia a 258 nm, posición del máximo de absorción del ADN. Una primera experiencia con una disolución de ADN (5×10^{-5} M) se realizó como control; después se estudiaron una muestra con AuNPs de 14.8 nm (3.3×10^{-10} M) y otra con nanopartículas de 4.5 nm (1×10^{-8} M) en ausencia de sal. La temperatura de partida fue 25 °C, alcanzándose como máxima cerca de los 90 °C; el incremento fue de 5 °C hasta alcanzarse los 60 °C, punto en el que la toma de datos fue cada 2 °C. Alcanzada la temperatura objetivo, se esperó 10 minutos para la medición de la absorbancia.

5.2.5. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones

Los espectros de cada muestra fueron registrados en un espectrómetro de RMN Ultra-Compact 800 MHz Bruker Avance III. La temperatura de medición fue 278 K. La concentración de ADN fue de 2.7×10^{-3} M. La muestra se preparó colocando 540 μ l de una disolución *stock* de ADN (preparada en las mismas condiciones de cacodilato y NaCl) en un *ependorf* para

adicionarle 60 μl de D_2O . El *eppendorf* se agitó con el fin de homogeneizar la muestra, colocándose su contenido en un tubo de RMN.

La secuencia de pulsos para los experimentos de *excitation sculpting water suppression* fue: zgesgp ; $\text{p}90^\circ$ (19 W) = 7.25 μs (con forma SMSQ10.100). Se utilizaron gradientes en el eje Z de 1 ms de duración y amplitudes del 31% y 11% respectivamente para el módulo de *excitation sculpting*. El ancho espectral fue de 25 ppm centrado en la señal del agua. La señal del agua se invirtió selectivamente mediante un pulso con forma (squa100.1000) de 2 ms. Se registraron 512 *scans*. El espectro se procesó con un factor de ensanchamiento (lb) de 3 Hz con una función ventana exponencial.

5.2.6. Espectroscopía de Dicroísmo Circular

Los espectros de Dicroísmo Circular (CD) fueron registrados en un espectropolarímetro BioLogic Mos-450. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Los espectros fueron expresados en términos de elipticidad. Los escaneos se realizaron en el intervalo 220 – 330 nm, región asociada al espectro intrínseco del ADN. Cada espectro se obtuvo del promedio de 5 medidas. Las muestras se reservaron a 25 °C en un termobloque durante 30 minutos para asegurar el estado térmico de equilibrio.

5.2.7. Medidas de viscosidad

Las medidas de viscosidad se realizaron empleando un viscosímetro de Ostwald, inmerso en un baño de agua termostaticado a 298 (± 0.1) K. Cada valor de viscosidad proviene de la media de 10 medidas. El tiempo de flujo de las muestras fue medido después de un tiempo de equilibrio térmico de 15 minutos. Las muestras fueron preparadas mediante la adición de AuNPs de 14.8 nm a disoluciones de ADN manteniendo la proporción [AuNPs]/[ADN] en el rango de 8.2×10^{-6} a 3.0×10^{-4} . La concentración del polinucleótido se fijó a 10^{-5} M.

La viscosidad relativa del ADN en presencia y ausencia de las nanopartículas de oro fue calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho \cdot t}{\rho_0 \cdot t_0} \quad 5.1$$

donde t_0 y t son los tiempos de flujo observados en ausencia y presencia de las AuNPs, y ρ_0 y ρ son las densidades de las muestras en ausencia y presencia del coloide. Se ha comprobado que ρ es similar en todas las muestras, de manera que $\rho/\rho_0 \approx 1$. Los datos se han presentado como

representación gráfica de (η/η_0) frente a [AuNPs], donde η es la viscosidad del ADN en presencia de AuNPs y η_0 es la viscosidad del ADN en ausencia de los nanoclusters.

5.2.8. Medidas de Microscopía de Fuerza Atómica

Las imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se obtuvieron con un microscopio Molecular Imaging Picoscan 2500 (Agilent technologies). Se empleó un cantiléver de silicio, de Model Pointprobe (Nanoworld), con una frecuencia de resonancia de 240 kHz (42 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ de fuerza constante nominal). Todas las imágenes de AFM fueron registradas en aire y en modo de golpeteo, con una rapidez de escaneo de 05 Hz y una ventana de recolección de datos de 256 x 256 píxeles. Después de la adquisición, las imágenes fueron aplastadas para remover la pendiente de fondo, pero se presentan inalteradas en todos los demás aspectos.¹⁶⁷

Debido al gran tamaño de las moléculas de ADN, con el fin de obtener imágenes de moléculas individuales de éste, se utilizaron disoluciones diluidas del polinucleótido (3×10^{-7} M). Las imágenes de los sistemas ADN-AuNPs y de ADN fueron obtenidas secando una gota de 30 μl de la muestra a estudiar, depositada en mica modificada. Para la modificación de la superficie de la mica, una gota de 60 μl de una disolución de APTES 0.1 % (v/v) fue depositada en una superficie exfoliada de mica e incubada durante 20 minutos; transcurrido este tiempo la superficie se limpió con agua y entonces secada al aire. Después de la adición de los 30 μl de muestra, se deja que se adsorba durante 60 minutos; transcurrido este tiempo se lavó con agua y se secó al aire para poder obtener las imágenes de AFM.

5.2.9. Medidas de Dispersión Dinámica de Luz

La distribución de tamaños del ADN y de los complejos AuNPs/ADN fue caracterizada por medio de la técnica de DLS empleando un Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments Ltd. (UK). La muestra fue iluminada con un láser, con una disposición de 173° respecto al centro de la celda, analizándose la intensidad de fluctuación en la luz dispersada. Se llevaron a cabo al menos seis medidas de tamaño por muestra. La concentración de ADN fue fijada en 5×10^{-5} M, mientras la concentración de AuNPs varió desde 3.3×10^{-10} a 1.6×10^{-9} M.

5.2.10. Análisis de deconvolución

La deconvolución de los espectros experimentales se realizó con la ayuda del programa *Fitlyk*.¹¹⁵ En todos los casos las bandas asociadas a la Resonancia del Plasmón Superficial de las

nanopartículas fueron ajustadas a funciones Voigt. El modelo de deconvolución considera que la banda de las AuNPs dispersas y libres es la centrada alrededor de 521 nm, mientras que las bandas con mayores longitudes de onda (550 nm o valores superiores) se asocian a diferentes estructuras de aglomerados. Además se fijó una banda (función gaussiana) a 400 nm para corregir el efecto de dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.¹³² En todos los casos el error de análisis entre el espectro simulado y el experimental resultó ser inferior al 5%.

5.2.11. Obtención de los parámetros CIELab

La conversión de las medidas de transmitancia a los parámetros del sistema cromático CIELab se llevó a cabo por el uso de ecuaciones estándares CIE para convertir medidas experimentales a valores cromáticos XYZ, y posteriormente a $L^*a^*b^*$.

5.2.12. Medidas de Microscopía de Fluorescencia

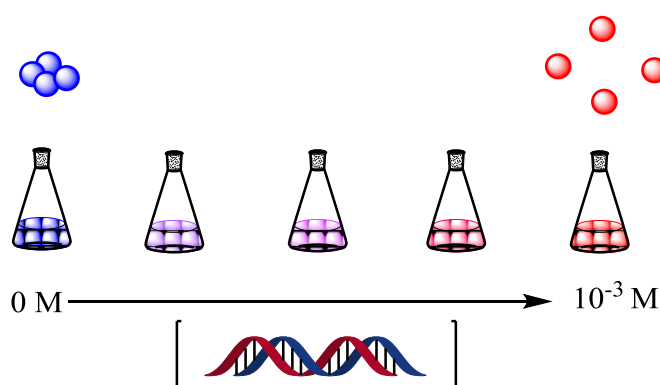
El 2-mercaptoetanol y el tinte fluorescente fueron añadidos a 950 μ l de la muestra, con una concentración final del 4% (v/v) y 5 μ M, respectivamente. El 2-ME fue utilizado para eliminar los radicales libres y así reducir la debilitación de la fluorescencia y el daño al ADN inducido por la luz. YOYO-1 o Gelgreen, según el caso, fueron añadidos para visualizar moléculas individuales de ADN por Microscopía de Fluorescencia (FM). El efecto de estos sobre la conformación de las moléculas de ADN es despreciable.¹⁶⁸ La observación de moléculas individuales se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una lente 100x inmersa en aceite con iluminación fluorescente gracias a una lámpara de mercurio (100 W) a través de un set de filtros (Zeiss-10, paso de banda de excitación 450-490; divisor de haz FT 510; paso de banda de emisión 515-565). Las imágenes fueron grabadas en un DVD a 30 imágenes por segundo con una cámara de alta sensibilidad EBCCD (Hamamatsu Photonics, Japón), analizadas con el programa *ImageJ*.

5.2.13. Medidas de Microscopía de Transmisión Electrónica con filtrado energético

Para la obtención de imágenes de TEM, una simple gota (~10 μ l) de la disolución a analizar fue colocada en una rendija de cobre cubierta por una película de carbono, dejada secar durante varias horas a temperatura ambiente. Las medidas se realizaron en un microscopio electrónico con filtrado energético JEM2100F trabajando a 200 kV.

5.3. Detección colorimétrica de ADN de cadena doble con nanopartículas aniónicas de oro

Generalmente, la detección colorimétrica con nanopartículas toma como referencia las nanopartículas libres y dispersas y establece la presencia del analito cuando tiene lugar agregación. Sin embargo en nuestro estudio se tomó como referencia nanopartículas agregadas por una sal inerte (color azul), de manera que conforme aumenta la concentración de nuestra molécula a detectar (ADN de doble cadena) más dispersas estarán las AuNPs (véase el Esquema 5.2). Para ello se utilizaron como punto de partida las nanopartículas agregadas en un proceso optimizado en el Capítulo 3 (véase la sección 3.4).



Esquema 5.9. Representación del sistema de detección colorimétrica de ADN de doble cadena con nanopartículas aniónicas de oro, donde las concentraciones del coloide y de la sal inerte son fijadas.

Las muestras fueron preparadas en tampón cacodilato (10^{-3} M) y NaCl ya que la estabilidad de la disolución madre de ADN era más mayor en dicho tampón que en agua, con un notable efecto positivo en la reproducibilidad de los resultados. A pesar de la toxicidad del cacodilato de sodio éste presenta la gran ventaja de disponer de ADN estable un largo periodo de tiempo, en el que no se favorece la formación de microorganismos ni se produce la precipitación. La Figura 5.1 muestra que este tampón no afecta a la banda SPR de las AuNPs: no se produce desplazamiento alguno y el color de la disolución se mantiene durante varios días. Hay que tener en consideración que debido a que la disolución coloidal no está preparada en el tampón cacodilato se produce una pequeña dilución de sus componentes (véase descripción de la Figura 5.1).

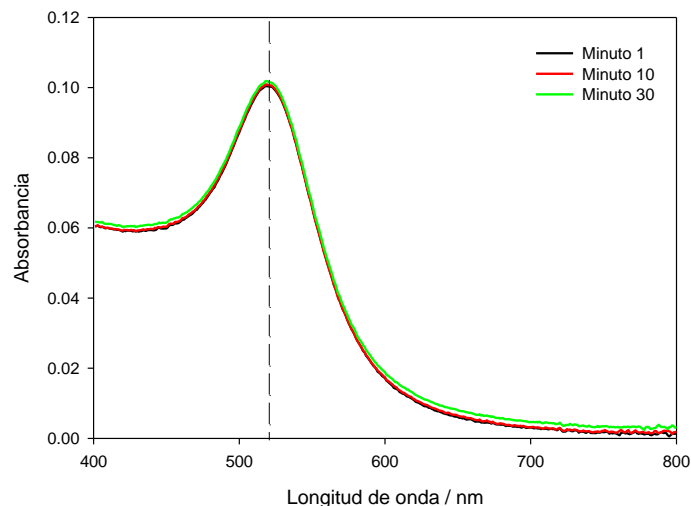


Figura 5.87. Evolución del espectro de absorción de las AuNPs con el tiempo en una mezcla de tampón cacodilato (9×10^{-4} M, poner concentración real) y NaCl (9×10^{-3} M). $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M. La línea discontinua indica la posición de la banda en ausencia de tampón.

Considerando que el sistema consta de tres componentes, el estudio se abordó en su inicio tomando el orden de adición como parámetro clave. Considerando que el primer componente a añadir en la cubeta fueron las AuNPs, las posibilidades son:

- A) AuNPs + ADN + NaCl
- B) AuNPs + NaCl + ADN

Así pues, si antes de añadir la sal se adiciona el ADN a la muestra tendremos el denominado Método A, mientras que si se adiciona la sal antes del ADN sería lo que hemos venido a llamar Método B.

Antes de proceder a los diferentes métodos de detección se comprobó que el ADN de por sí no provoca cambios en la banda SPR y por lo tanto en el color de la disolución. La Figura 5.2 muestra los espectros de absorción de AuNPs a lo largo de 90 minutos a las dos concentraciones extremas del presente estudio. Aunque a largo plazo se produce una pequeña disminución de la absorbancia, estas variaciones se encuentran fuera del intervalo de tiempo de trabajo, el cual se estableció en 30 minutos; a partir de este tiempo las nanopartículas agregadas con sal comienzan a aglomerarse y a sedimentar.

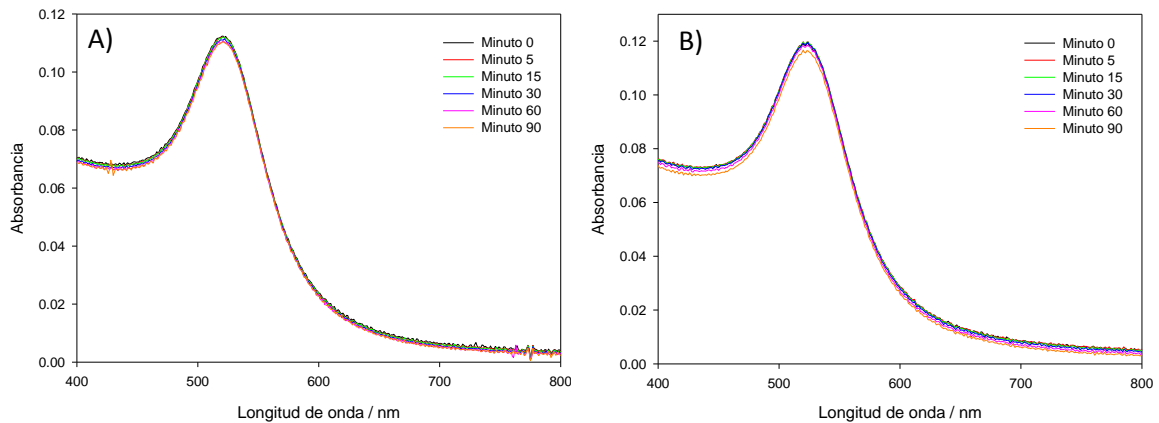


Figura 5.88. Evolución de espectros de absorción de las AuNPs con el tiempo en tampón cacodilato (9×10^{-4} M) y NaCl (9×10^{-3} M), a una concentración de ADN de doble cadena de: A) 10^{-7} M; B) 10^{-3} M.

5.3.1. Determinación del orden de adición óptimo para el método colorimétrico

La Figura 5.3 muestra la evolución de la banda SPR de AuNPs al añadir diferentes concentraciones de ADN a una cantidad fija de NaCl, así como también los cambios colorimétricos de las muestras. Como se puede observar, conforme aumenta la cantidad de biopolímero en la disolución se produce una mayor protección frente a la agregación; a partir de 5×10^{-5} M no se observa ensanchamiento de la banda ni tonalidades moradas en las muestras. No obstante la tendencia del grado de agregación (Figura 5.4) con la concentración de ADN muestra que se produce una débil reversión a concentraciones superiores a 10^{-4} M.

El efecto de protección también se puede detectar a través de estudios cinéticos. Como muestra la Figura 5.5, el grado de agregación (A_{668}/A_{520}) aumenta con el tiempo conforme disminuye la cantidad de ADN presente mientras que no se observan cambios a partir de 10^{-5} M.

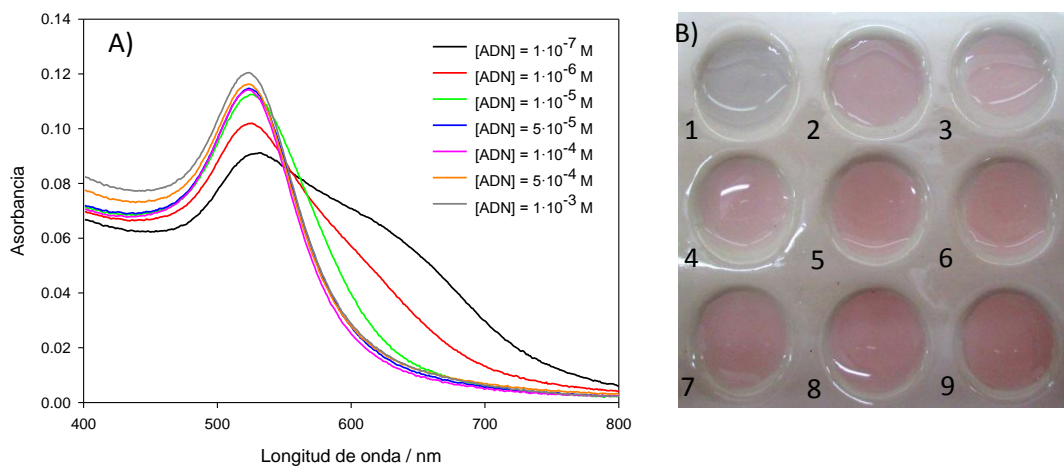


Figura 5.89. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena (método A). $[\text{Na}^+] = 0.075$ M. Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen $[\text{Na}^+] = 0.075$ M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 5×10^{-5} M; 6) 10^{-4} M; 7) 5×10^{-4} M; 8) 10^{-3} M; 9) 0 M ($[\text{Na}^+] = 0$ M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN.

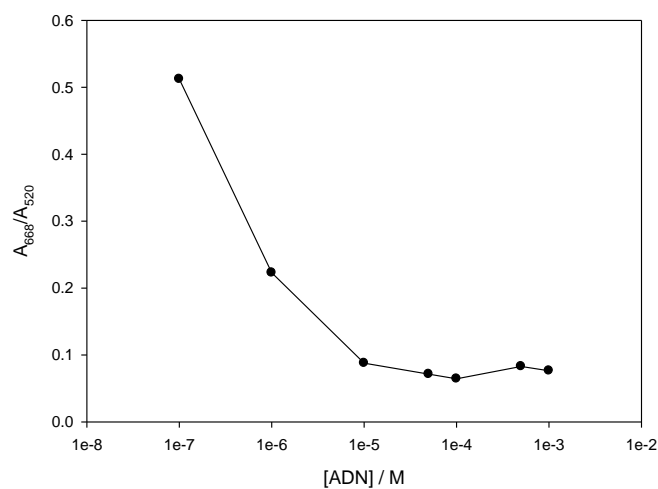


Figura 5.90. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) frente a la concentración de ADN. $[\text{AuNPs}] = 3.3 \times 10^{-10}$ y $[\text{Na}^+] = 0.075$ M.

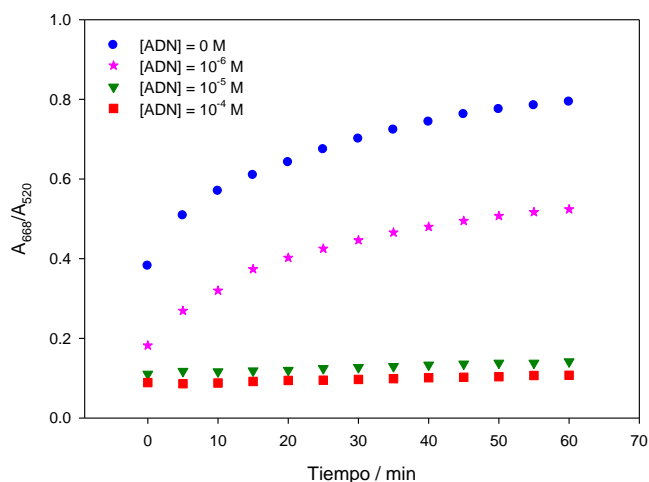


Figura 5.91. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) con el tiempo, donde A_{668} representa la absorción a 668 nm y A_{520} a 520 nm. $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M; $[Na^+] = 0.075$ M.

En el caso del método B los resultados son totalmente diferentes a los descritos. No se produce protección alguna, indistintamente de la concentración de ADN que haya en el medio: todas las muestras mostraron el característico color azul violáceo de las nanopartículas agregadas (véase la Figura 5.6); el ADN no fue capaz de desagregar a las AuNPs. El método A prevalece por tanto para una detección colorimétrica del ADN, mostrando que el orden de adición es un parámetro fundamental.

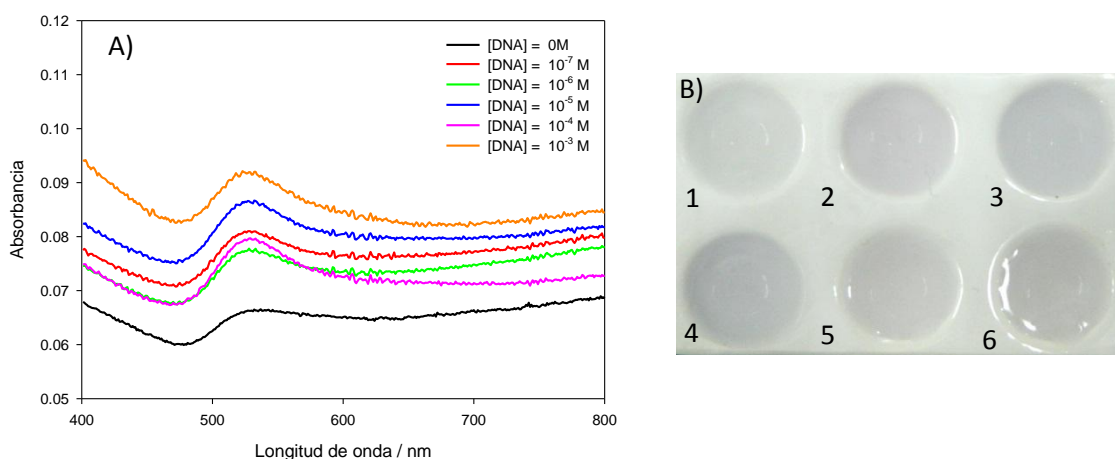


Figura 5.92. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena (método B). $[Na^+] = 0.075$ M. Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de ADN a la mezcla AuNPs-NaCl. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método B. Todas las casillas tienen $[Na^+] = 0.075$ M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 10^{-4} M; 6) 10^{-3} M; 9) 0 M ($[NaCl] = 0$ M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de ADN a la disolución AuNPs-NaCl.

5.3.2. Comparativa del método entre ADN de cadena doble y simple

En el caso de los oligonucleótidos es posible la distinción entre ADN de doble cadena y simple cadena: sus diferencias en cuanto a rigidez y capacidad de interacción permite esta distinción estructural. Sin embargo, cuando el ADN es muy largo (como es nuestro caso) diferentes autores señalan que el método de detección colorimétrica no es viable.⁷⁷ Por ello el siguiente punto fue estudiar las diferencias que se producen al aplicar el procedimiento desarrollado para el caso de ADN de cadena simple (a través del método A).

El ADN de cadena simple se preparó por desnaturalización térmica de ADN de doble cadena (véase la subsección 5.2.2). Comparando los espectros de absorción del ADN de cadena simple y de cadena doble se puede confirmar la formación del primero, ya que el ADN de cadena simple tiene una absorptividad mayor que el de doble cadena (Figura 5.7). Una disolución de ADN de doble cadena con una concentración de $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tiene una absorbancia de 1, mientras que una disolución de ADN de cadena simple muestra una absorbancia de 1 con una concentración de $40\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.⁴⁵ Así, la proporción de absorbancia $A_{\text{simple}}/A_{\text{doble}}$ a la longitud de onda del máximo es 1.25. El valor obtenido de nuestros espectros de absorción fue de 1.26, lo que confirma la presencia de ADN de cadena simple. Por otro lado, los espectros de CD también confirmaron la presencia de ADN de cadena simple. M. Rosa y colaboradores observan cambios en el espectro de dicroísmo circular cuando desnaturalizaron el ADN: la intensidad de la banda negativa, relacionada con la helicidad del ADN, disminuye mientras la banda positiva, relacionada con las interacciones de apilamiento π , crece, y el punto de cruce se desplaza 3 nm más.¹⁶⁶ La Figura 5.8 muestra la comparativa de los espectros de CD para nuestro ADN de cadena simple preparado a partir de ADN de doble hebra.

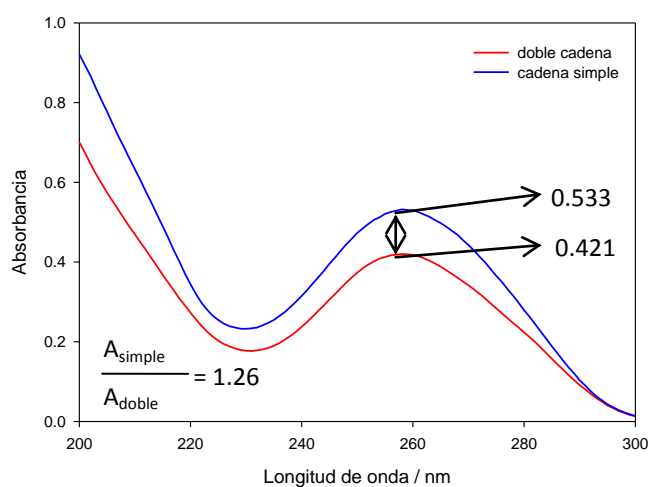


Figura 5.93. Espectro de absorción UV de ADN de doble cadena (línea roja) y de ADN de cadena simple (línea azul) ambos a la misma concentración. El ADN de cadena simple proviene de la desnaturalización térmica del ADN de cadena doble del que se obtuvo el espectro.

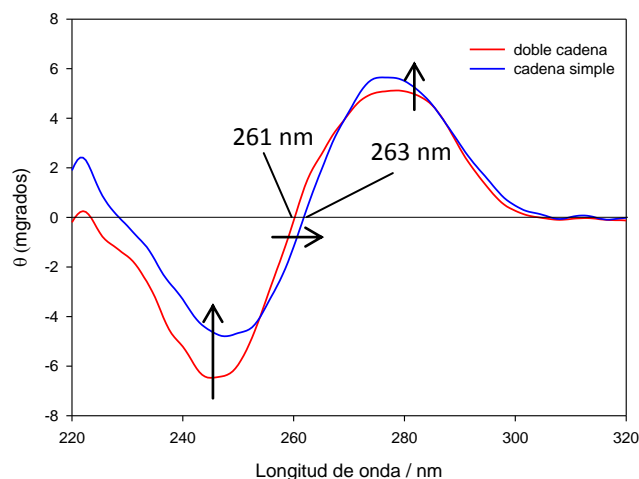


Figura 5.94. Espectros de dicroísmo circular de ADN de doble cadena (línea roja) y de ADN de cadena simple (línea azul), ambos a la misma concentración. El ADN de cadena simple proviene de desnaturalización térmica del ADN de cadena doble del que se obtuvo el espectro.

Siguiendo el método A se determina un comportamiento análogo al ADN de doble cadena. En la Figura 5.9 se puede observar cómo los espectros de absorción son semejantes así como la tendencia en el cambio de color de las distintas disoluciones. El ADN de cadena simple también puede prevenir la agregación de las AuNPs: el ADN de cadena larga, a diferencia de los oligonucleótidos, protege de la agregación independientemente de su estructura secundaria.

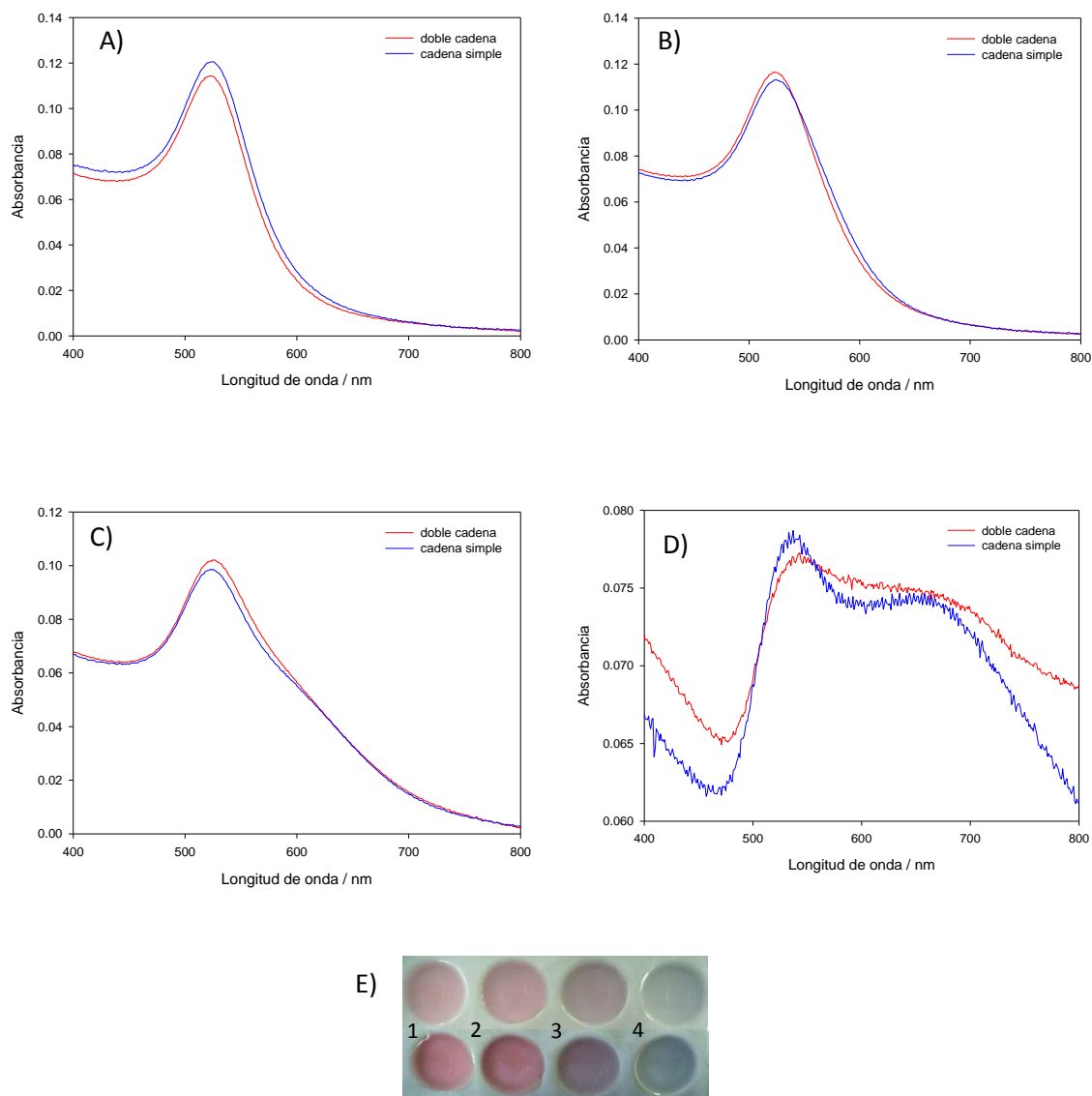


Figura 5.95. A-D) Comparativa de los espectros de absorción obtenidos por el método A para ADN de doble cadena (línea roja) y ADN de cadena simple (línea azul). [ADN] =: A) 10^{-4} M; B) 10^{-5} M; C) 10^{-6} M; D) 10^{-7} M. Todos los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el NaCl. E) Fotografías de las diferentes muestras obtenidas por el método A para ADN de cadena doble (fila superior) y para ADN de cadena simple (fila inferior). Cada casilla tiene una concentración diferente de ADN: 1) 10^{-4} M; 2) 10^{-5} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-7} M. En todos los casos, [AuNPs] = 3.3×10^{-10} M y $[\text{Na}^+] = 0.075$ M.

5.3.3. Influencia de la longitud de la cadena del ADN

Un tercer aspecto a considerar en la presente Tesis Doctoral es el tamaño de la hebra de ADN: los estudios bibliográficos hasta la fecha se realizaron con oligonucleótidos con menos de 25 unidades monoméricas,^{77,78,169} mientras que en el presente estudio se utiliza un ADN que tiene entre 8000 y 15000 bps. Dado que la diferencia de tamaño es muy grande, nos propusimos comprobar si la protección observada se mantiene a un tamaño menor pero siempre por encima

de los 1000 bps. Para ello se fragmentó el ADN por sonicación.⁴⁵ Una misma disolución de ADN se sonicó a distintos tiempos, tomándose una alícuota en estos instantes previamente fijados para, posteriormente, estimar el tamaño promedio de la biomolécula. La muestra se colocó en un baño de hielo para evitar la posible desnaturalización que provocaría el sobrecalentamiento del sistema. Los tamaños obtenidos por un test de agarosa se muestran en la Figura 5.10, donde se puede comprobar que a los 10 minutos el ADN sonicado tenía un tamaño comprendido entre 1000 y 5000 pares de bases y cuya máxima intensidad se centra en 1650 bp, valor que se tomará como referente. La imagen también muestra una distribución de tamaño del ADN, patente en las bandas anchas que se forman en lugar de líneas que se podrían esperar de biomoléculas con un tamaño definido (véase por ejemplo la Figura 5.10A).

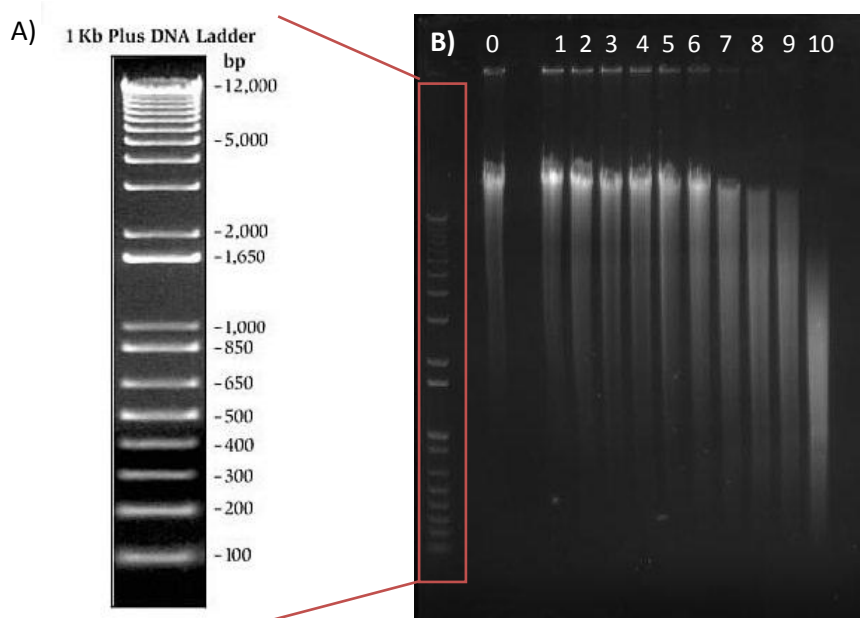


Figura 5.96. A) Bandas que genera el marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (0.7 $\mu\text{g}/\text{línea}$ en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio). B) Fotografía del test de agarosa (0.8 %, con *Red Safe* como tinte) para las 10 alícuotas tomadas de la sonicación. Cada línea corresponde a un tiempo concreto de sonicación: 0) 0 s (control); 1) 10 s; 2) 20 s; 3) 30 s; 4) 40 s; 5) 50 s; 6) 60 s; 7) 120 s; 8) 180 s; 9) 240 s; 10) 600 s.

Cuando se aplicó el método A con el ADN sonicado durante 10 minutos (es decir, con un tamaño medio cercano a los 1650 pares de bases) se observó de nuevo el efecto protector, pero con la salvedad de que la prevención de la agregación inducida por sal se produjo incluso a concentraciones más bajas de ADN (Figura 5.11). Si se compara con la Figura 5.3, se puede

apreciar como la protección es análoga con una diferencia de concentraciones de dos órdenes de magnitud.

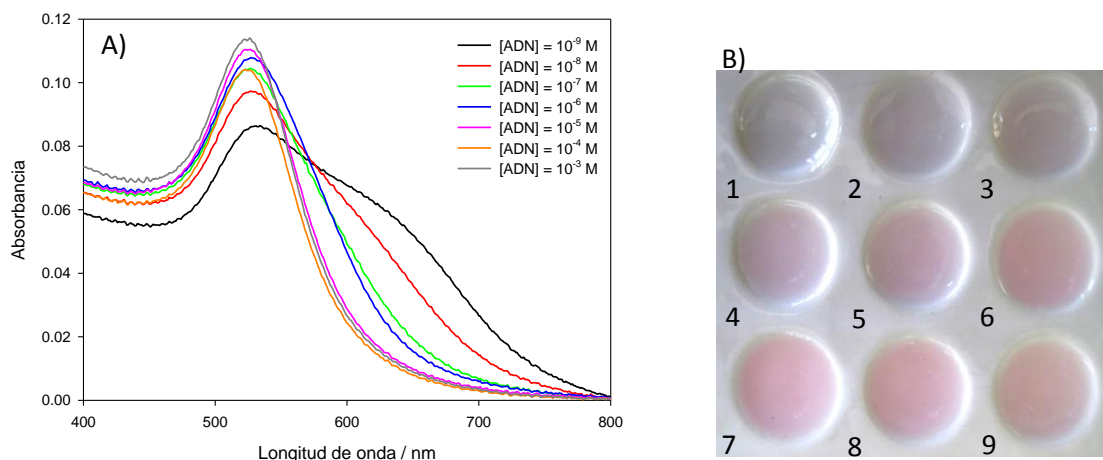


Figura 5.97. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN con un tamaño medio estimado de 1650 pares de bases, siendo $[\text{Na}^+] = 0.075$ M (método A). Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A con ADN de aproximadamente 1650 bps). Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde al control) tienen $[\text{Na}^+] = 0.075$ M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-9} M; 3) 10^{-8} M; 4) 10^{-7} M; 5) 10^{-6} M; 6) 10^{-5} M; 7) 10^{-4} M; 8) 10^{-3} M; 9) 0 M ($[\text{Na}^+] = 0$ M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN.

Aparentemente parece que esta diferencia de tamaño repercute en los resultados del estudio, sin embargo es necesario tener en cuenta otro factor que se ha modificado: el disolvente. En el estudio desarrollado en la subsección 5.3.1 el ADN y las diferentes muestras se prepararon en agua sin esterilizar, mientras que en este punto todas las disoluciones (incluida la madre del ADN) se prepararon con una disolución tampón que se esterilizó en el autoclave. Con el fin de discernir la verdadera causa de una mejora del efecto protector, se repitió el método A con ADN sin sonicar pero preparado en disolución esterilizada; la tendencia obtenida resultó ser análoga (datos no mostrados). Esterilizar tanto el material como las disoluciones amortiguadoras produce una mejora de los resultados dándose protección a concentraciones de ADN inferiores a 10^{-6} M. La razón de esterilizar en el estudio de la influencia del tamaño del biopolímero en el proceso de protección radica en el hecho de eliminar enzimas, restos de proteínas y nucleasas para las que, el ADN más debilitado al estar sonicado y fragmentado, es más sensible.

5.4. Influencia del tamaño de las nanopartículas en la detección de ADN de cadena larga

Estudios previos con oligonucleótidos han determinado que la curvatura de la NP tiene un efecto considerable en la interacción,⁸⁴ hasta el punto de provocar la separación de las hebras.⁴⁹ Además el uso comparativo de AuNPs de diferentes tamaños también implica variar el efecto de saturación o acumulación (*crowding effect*) y de exclusión de volumen, los cuales repercuten en la estructura y estabilidad del ADN.^{160,161}

5.4.1. Criterio para establecer la concentración de AuNPs en las muestras

Trabajar con AuNPs de diferentes tamaños implica un gran problema: ¿cuál es la concentración adecuada para comparar los resultados? Debido a la dependencia de las propiedades ópticas con el tamaño del clúster, así como las cantidades necesarias para su síntesis, es inviable el uso de la misma concentración (expresada en mol de NP por litro) de AuNPs para un estudio comparativo. Actualmente no parece haber criterio alguno establecido, aunque algunos ciertos recomiendan tomar como patrón la “área de superficie específica por volumen” (*Volume-Specific Surface Area, VSSA*); sobre todo desde que la Comisión Europea propuso la VSSA en 2011 como criterio para definir los nanomateriales.¹⁷⁰ Dicho parámetro requiere obtener el tamaño y la forma de las nanopartículas¹⁷¹ y el considerar todos los factores que repercuten en él puede conducir a complejas ecuaciones.^{172,173} Considerando que el sistema es monodisperso y que todas las nanopartículas tienen un diámetro “ d ”, la VSSA (en m^2/cm^3) se puede expresar como:^{173,174}

$$VSSA = \frac{S}{V} \quad 5.2$$

donde S es la superficie de la nanopartícula (expresada en m^2) y V el volumen de la misma (pero expresado en cm^3). Los valores que se obtienen para cada sistema coloidal sintetizado se muestran en la Tabla 5.1. De la superficie específica de las muestras de AuNPs de 14.8 nm se calcularon las concentraciones necesarias de los otros sistemas coloidales para igualar dicho valor. Aunque la concentración estimada es viable para las nanopartículas de mayor tamaño, no ocurre lo mismo con las más pequeñas ya que al ser necesaria una dilución tan grande del coloide, tomando tan solo 62 μl y diluyendo a 2000 μl , no es posible detectar su color a simple vista.

Tabla 5.19. Valores obtenidos de VSSA para las distintas síntesis de AuNPs y concentraciones de éstas (para obtener la misma superficie específica), obtenidas de la adición del volumen de la alícuota (V_{al}) siendo el volumen final de la muestra 2000 μl .

Diámetro /nm	VSSA / m^2cm^{-3}	V_{al} / μl	[AuNPs] / M
4.5	1333	62	2.8×10^{-9}
14.8	404.7	200	3.3×10^{-10}
27	222.3	364	8.6×10^{-11}

Ante este problema se optó como criterio emplear la misma concentración de oro en la muestra ([Au]), lo cual proporciona concentraciones adecuadas para la detección colorimétrica a simple vista y por espectroscopía de absorción.

5.4.2. Detección colorimétrica de ADN con AuNPs de 27 nm

Debido a que la concentración oro es la misma tanto para la síntesis de NPs de 14.8 nm como para la de 27 nm, se trabajó con un alícuota del mismo volumen que en el estudio con AuNPs de 14.8 nm; la concentración final de AuNPs de 27 nm fue 4.7×10^{-11} M.

Antes de proceder con el método A empleando nanopartículas de mayor tamaño, se comprobó que el ADN no produce efecto alguno en la banda SPR. La Figura 5.12 muestra que la banda de absorción de las AuNPs permanece inalterada en el intervalo de trabajo, al igual que con las AuNPs de 14.8 nm.

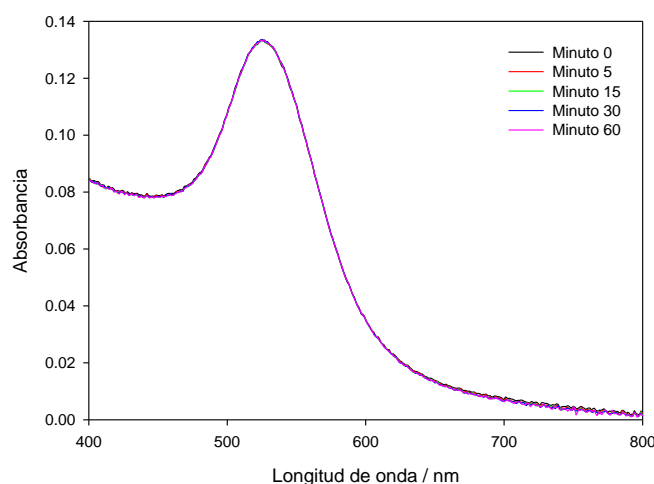


Figura 5.98. Evolución con el tiempo de la banda SPR de AuNPS de 27 nm (4.7×10^{-11} M) en presencia de ADN de doble cadena (10^{-4} M). Las concentraciones de cacodilato y de Na^+ fueron 9×10^{-4} M y 9×10^{-3} M respectivamente.

Cuando se adicionó sal a mezclas de AuNPs-ADN con diferentes concentraciones del biopolímero se observó un descenso en la agregación conforme aumentaba la concentración de este último. La Figura 5.13 muestra como la agregación es imperceptible a partir de la concentración de ADN de 10^{-5} M, manteniéndose rojo el color de las disoluciones desde este punto. En la subsección 5.4.4 se compararán los resultados obtenidos para cada tamaño de coloide.

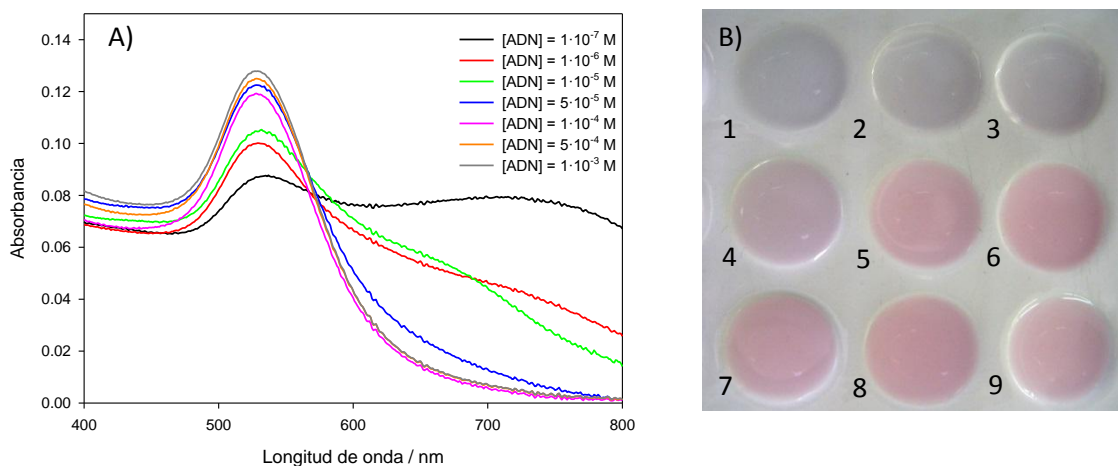


Figura 5.99. A) Espectros de absorción de AuNPs de 27 nm (4.7×10^{-11} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena a $[\text{Na}^+] = 0.075$ M (método A). Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A para AuNPs de 27 nm. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen $[\text{Na}^+] = 0.075$ M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 5×10^{-5} M; 6) 10^{-4} M; 7) 5×10^{-4} M; 8) 10^{-3} M; 9) 0 M ($[\text{Na}^+] = 0$ M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN.

5.4.3. Detección colorimétrica de ADN con AuNPs de 4.5 nm

En el caso de las AuNPs de menor tamaño fue necesario hacer una corrección en el volumen de la alícuota a tomar de la disolución coloidal madre; se tomaron 230 μl en lugar de los 200 μl que se tomaban con las otras síntesis de AuNPs, siendo la concentración final 1.0×10^{-8} M.

Al igual que en el caso anterior, se comprobó la influencia del ADN en la banda de absorción de las AuNPs. Como se puede observar en la Figura 5.14, no se produce variación alguna de la banda SPR en el intervalo de tiempo de trabajo.

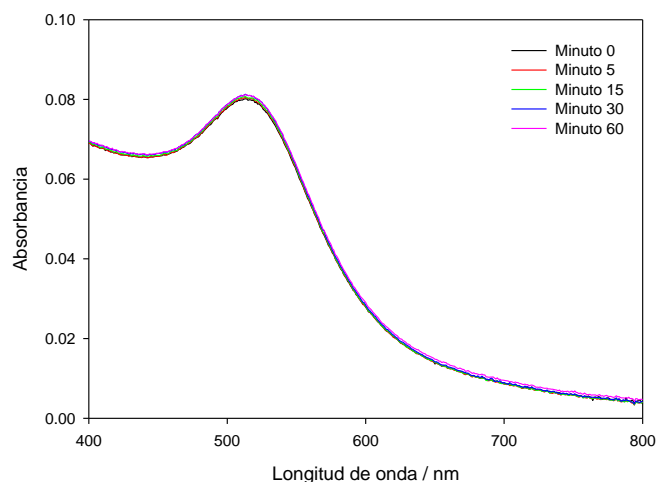


Figura 5.100. Evolución con el tiempo de la banda SPR de AuNPs de 4.5 nm (1.0×10^{-8} M) en presencia de ADN de doble cadena (10^{-4} M). Las concentraciones de cacodilato y Na^+ fueron 8.8×10^{-4} M y 8.8×10^{-3} M, respectivamente.

La Figura 5.15 muestra la influencia de la sal en la banda SPR de AuNPs de 4.5 nm en presencia de ADN de doble cadena. Al igual que en los casos anteriores, la agregación disminuye conforme mayor es la cantidad de biopolímero en el medio. La agregación queda totalmente prevenida a partir de 10^{-5} M, aunque se produce cierta oscilación de la intensidad y anchura de la banda SPR a altas concentraciones de ADN.

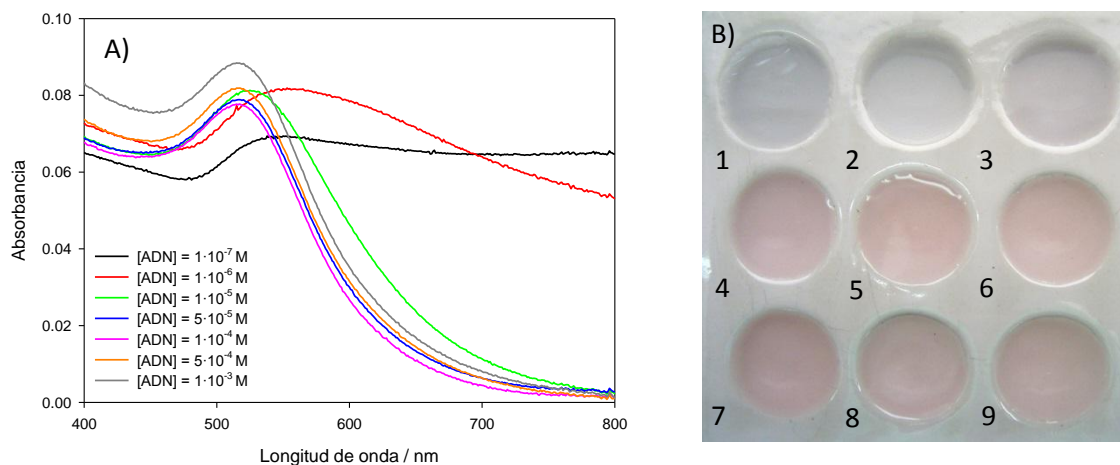


Figura 5.101. A) Espectros de absorción de AuNPs de 4.5 nm (1.7×10^{-11} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena a $[\text{Na}^+] = 0.25$ M (método A). Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A para AuNPs de 4.5 nm. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen $[\text{Na}^+] = 0.25$ M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 5×10^{-5} M; 6) 10^{-4} M; 7) 5×10^{-4} M; 8) 10^{-3} M; 9) 0 M ($[\text{Na}^+] = 0$ M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN.

5.4.4. Diferencias en el efecto de protección según el tamaño

Resulta difícil hacer una comparativa exhaustiva de los resultados del método A según el tamaño de las nanopartículas ya que la reactividad y propiedades están fuertemente vinculadas a este parámetro (véase Capítulo 1). Sin embargo, sí es posible analizar qué AuNPs han proporcionado mejores resultados con el fin de optimizar los factores influyentes en el desarrollo de protocolos de detección colorimétrica de ADN. La Figura 5.16 muestra la evolución del grado de agregación para los tres sistemas estudiados: en los tres casos se alcanza la protección total a 10^{-4} M y se observa cierta incompetencia en la protección a las concentraciones más altas (5×10^{-4} y 10^{-3} M) donde las nanopartículas se encuentran levemente más agregadas o más cercanas entre sí que a 10^{-4} M. Por otra parte, las pendientes en la zona donde se aprecia agregación muestran que el cambio más significativo se produce para las AuNPs de 4.5 nm mientras que la protección menos abrupta se da en las partículas de 14.8 nm; se ha de considerar que el estado de agregación del que se parte es diferente en cada sistema como muestran los puntos de partida (A_{668}/A_{520} a 10^{-7} M), diferentes según el tamaño del clúster.

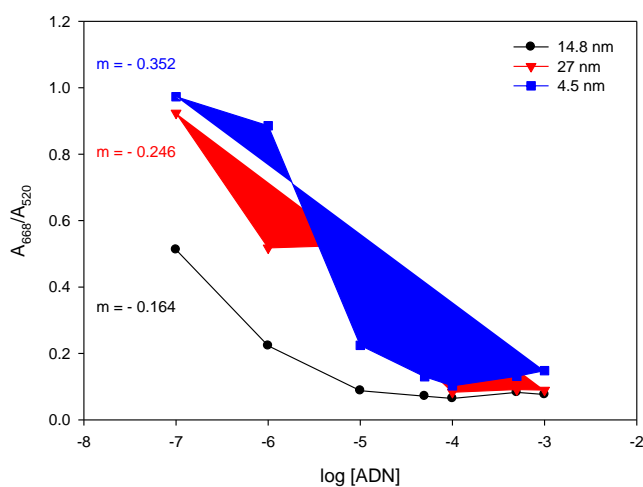


Figura 5.102. Evolución del grado de agregación con la concentración de ADN para diferentes tamaños de AuNPs. Las pendientes calculadas se obtuvieron en el intervalo de $[\text{ADN}] = 10^{-7}$ a 5×10^{-5} M, zona en la que se produce la disminución de la agregación.

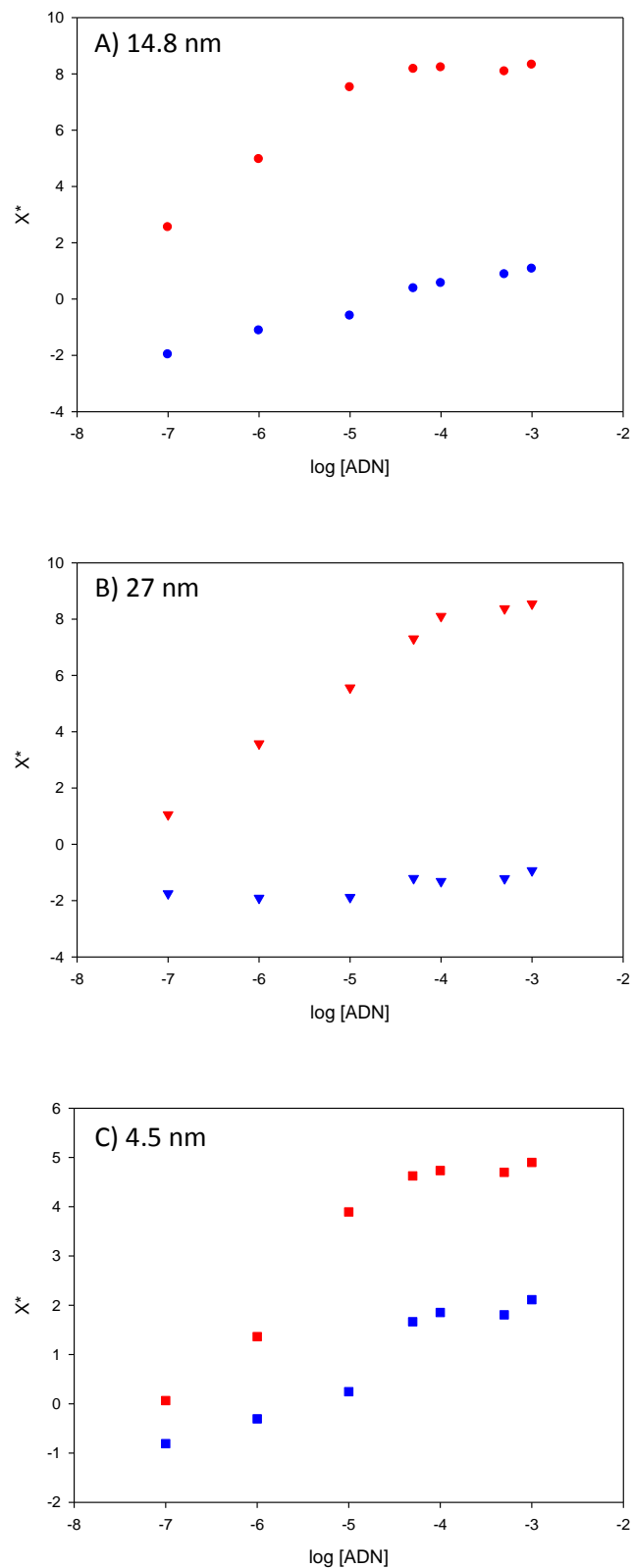


Figura 5.103. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de ADN. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIELab y para diferentes tamaños de AuNPs: A) 14.8 nm, siendo $L^* = 93.5 \pm 0.5$; B) 27 nm, siendo $L^* = 93.0 \pm 0.5$; C) 4.5 nm, siendo $L^* = 94 \pm 1$. Los puntos de color rojo representan el parámetro a^* mientras los azules el parámetro b^* .

Desde un punto de vista colorimétrico, la comparación de la variación cromática de las muestras parece la misma en los tres casos (compárese las Figuras 5.3B, 5.13B y 5.15 B) si bien la Figura 5.16 del estudio en detalle muestra comportamiento diferente en función del tamaño. Para poder contrastar más sensiblemente estos cambios, se obtuvieron los parámetros colorimétricos por la teoría CIELab. Como se puede observar en la Figura 5.17, la componente roja del sistema es más sensible en las nanopartículas de 27 nm aunque bastante parecida al comportamiento de las AuNPs de 14.8 nm; debido a que las muestras de oro coloidal de tamaños de 4.5 nm son más anaranjadas que rojas, dicha componente alcanza valores más pequeños y la variación también es menor. Aunque estas nanopartículas son las que presentan la mayor variación de la componente azul en el caso de las AuNPs de 27 nm permanece invariable. Sin embargo la protección más efectiva y sensible es la que producen las nanopartículas de tamaño intermedio: el color que adquiere la muestra a 10^{-7} M es morado, que se refleja en la similitud (en valor absoluto) de los valores de a^* y b^* a esta concentración, y permite diferenciar a simple vista del color azul-violeta de la muestra en ausencia de ADN (casillas 2 y 1 respectivamente de la Figura 5.3B). Para los otros dos tamaños estudiados, a esta misma concentración de AN, la componente azul predomina frente a la roja ($|b^*| > |a^*|$) siendo más difícil la distinción a simple vista de las bajas cantidades de ADN (compárese las casillas 1 y 2 en las Figuras 5.13B y 5.15B). Se pueden considerar las AuNPs de 14.8 nm como las mejores para el empleo de sistemas de detección colorimétrica de ADN basado en oro coloidal. Además conviene considerar que la alta reactividad y tendencia a la agregación por fuerzas atractivas de van der Waals de las AuNPs de 27 nm las hace más sensible a los errores de adición de NaCl; Por otro lado la banda SPR de las AuNPs de 4.5 nm es menos definida que las de coloides de mayor tamaño. Nanopartículas de 14.8 nm son óptimas desde el punto de vista del tamaño del clúster.

5.5. Posibles causas del efecto protector del ADN de cadena larga frente a la agregación de nanopartículas de oro inducida por sal

Los resultados presentados suponen una contradicción respecto a los fundamentos en los que se basan los sistemas de detección de oligonucleótidos con AuNPs, ya que resulta más que evidente que el ADN de cadena larga puede proteger de la agregación a las nanopartículas independientemente de si es de doble o simple cadena. Tres posibles causas son las que pueden provocar esta protección por parte del ADN de doble hebra: i) apertura total o parcial de la cadena de ADN; ii) captura de cationes sodio por parte del ADN; iii) interacción del ADN con las AuNPs, favoreciendo la protección contra la agregación por una sal inerte.

5.5.1. Posibilidad de apertura total o parcial del ADN

Los resultados mostrados en la subsección 5.3.2 demostraron que la protección que realiza el ADN de hebra simple es similar a la que produce el de doble. Para comprobar una posible apertura del ADN en presencia de AuNPs se realizó un estudio de la variación de absorbancia del ADN con la temperatura: la absorción del biopolímero en forma de doble hebra es menor que en su forma desnaturalizada.¹⁷⁵ El punto intermedio de la transición de hebra doble a simple es la llamada “temperatura de fusión” (*Melting Temperature*, T_m) y su valor depende de la composición de las bases y de la longitud del biopolímero, de la fuerza iónica y pH del medio, así como de la concentración de ADN.⁵²

La Figura 5.18 corresponde al *melting* del ADN con nanopartículas de oro de diferente tamaño. Los puntos negros corresponden a ADN de doble cadena en ausencia de cualquier nanopartícula, el cual presenta un temperatura de fusión de 67.2 °C; no fue posible el contrastar este valor con el obtenido por otros autores debido a que no se encontró en la bibliografía estudios en las mismas condiciones experimentales. La adición de nanopartículas provocó una leve modificación de la T_m , aunque dichas diferencias de hecho son muy pequeñas para considerar que son causadas por la apertura de ADN; generalmente los cambios estructurales se reflejan en variaciones de mayor magnitud en la temperatura de fusión (véase como ejemplo los resultados de las referencias 176 y 177, por lo que se puede considerar que la T_m obtenida es la misma en los tres casos y siendo las diferencias debida a los errores intrínsecos a la medida ($T_m = 67.9 \pm 0.6$ °C). Las nanopartículas no inducen apertura alguna en la estructura del ADN, pudiéndose descartar como causa de la protección contra la agregación.

Más difíciles de justificar resultan los valores altos de absorbancia que presentan las muestras con AuNPs a altas temperaturas. Este incremento del valor esperado podría deberse a que las propias nanopartículas dispersen la luz enmascarando el verdadero valor de absorción. Sin embargo también existe otra posibilidad: que la interacción de las nanopartículas con las nucleobases, que a altas temperaturas son accesibles para las AuNPs al encontrarse las hebras de ADN abiertas, provoque una pérdida mayor aún de apilamientos π ; es sabido que la pérdida del apilamiento π proporciona valores más altos de absorbancia, por ello la absorptividades molares de los monómeros son superiores a la del ADN de cadena simple.¹⁷⁵

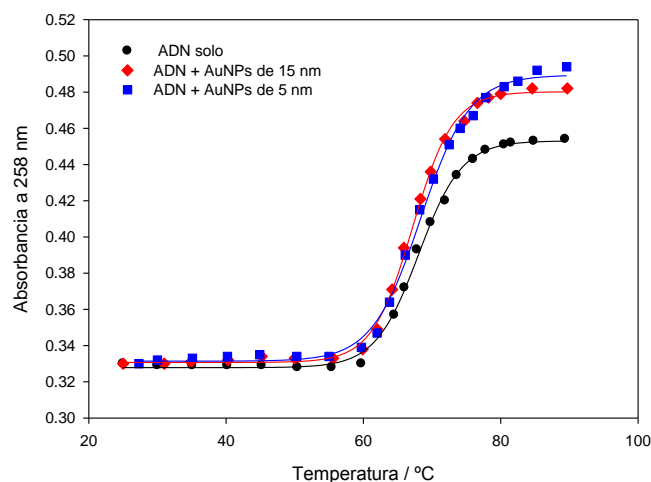


Figura 5.104. Evolución de la absorbancia en el máximo de absorción con la temperatura. Los puntos negros corresponden a ADN sólo, con una concentración de 5×10^{-5} M y con una $T_m = 68.0$ °C; los rombos rojos corresponden a ADN (5×10^{-5} M) con AuNPs de 14.8 nm (3.3×10^{-10} M), y con una $T_m = 67.2$ °C; los cuadrados azules corresponden a ADN (5×10^{-5} M) con AuNPs de 4.5 nm (1.0×10^{-8} M), y con una $T_m = 68.4$ °C. Todas las muestras se prepararon en un tampón cacodilato cuyos componentes presentaron una concentración final [cacodilato] = 9×10^{-4} M, [NaCl] = 9×10^{-3} M.

A través de RMN se trató también de observar la posible apertura de la doble hebra. La señal de ^1H de los grupos imino de las bases tenderá a desaparecer si el protón no se encuentra protegido (es decir, formando el par de bases) ya que tenderá a intercambiarse rápidamente con el disolvente y no se detectará dicha señal, debido al ensanchamiento por el proceso de intercambio. Desgraciadamente el gran tamaño de la biomolécula conlleva un tiempo de relajación tan pequeño que el ensanchamiento de la señal es enorme (la magnetización en el plano XY se pierde muy rápidamente), impidiendo su detección (véase Figura 5.19).^{178,179} De manera que no fue posible el estudio del ADN con AuNPs por RMN.

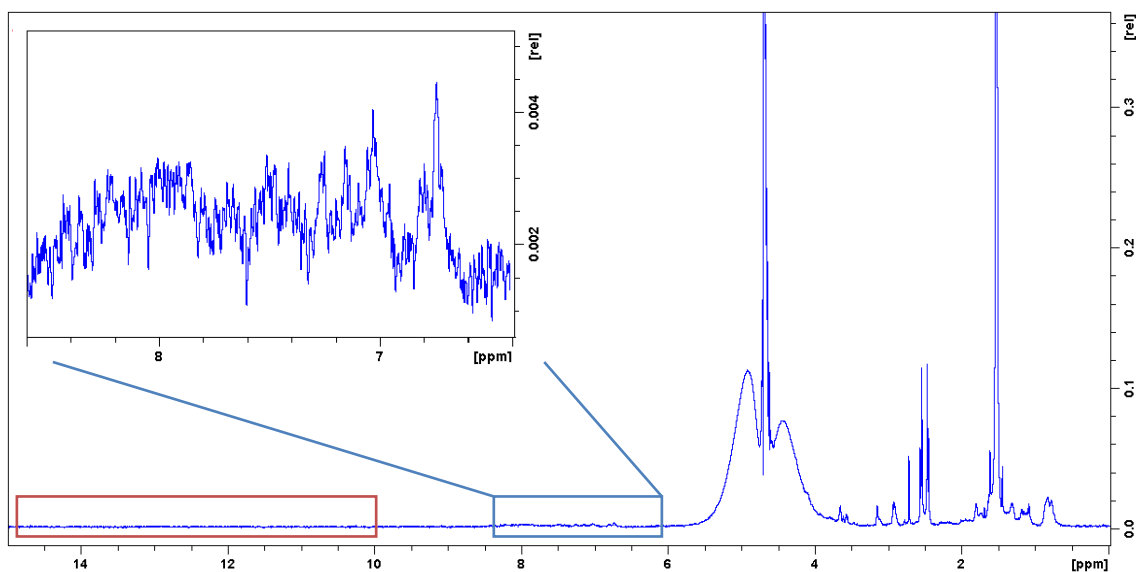


Figura 5.105. Espectro $^1\text{H-NMR}$ de ADN de doble cadena. La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. $[\text{ADN}] = 2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$.

5.5.2. Captura de cationes sodio por parte del ADN

Si el ADN tuviera preferencia frente a las AuNPs en la competición por neutralizar las cargas negativas, sería un motivo plausible de por qué se produce la protección. Para comprobar esta posibilidad se desarrolló un nuevo orden de adición, el método C. En este método se añadieron las alícuotas de AuNPs en disoluciones donde el ADN y el NaCl se habían mezclado previamente. Si realmente el ADN “secuestra” el sodio del medio, se esperaría una mejora de los resultados ya que en este caso no habría competencia entre las AuNPs y el ADN. En la Figura 5.20 se presentan los distintos espectros de las AuNPs en función de la concentración de ADN, así como la fotografía de las muestras. La Figura 5.21 muestra, de forma individual, los espectros de absorción registrados por el método C a diferentes concentraciones de ADN y los compara con los obtenidos por el método A. Como se puede observar, la agregación es mayor cuando el ADN y la sal son previamente mezclados, siendo las bandas más anchas, con la posición del máximo desplazada al rojo. Aunque la agregación total del coloide no tuvo lugar, las diferencias entre los dos métodos indican que las AuNPs provocan algún cambio en el ADN vinculado a la protección.

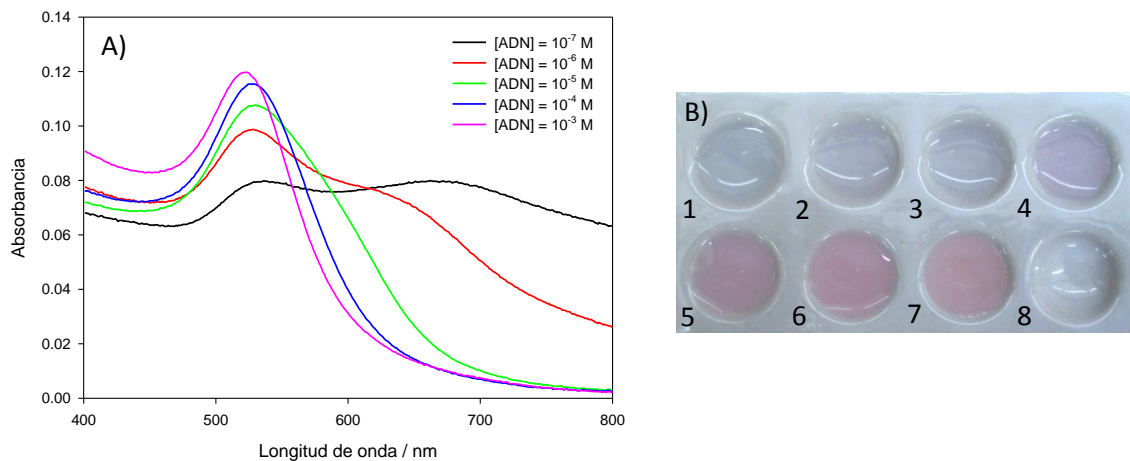


Figura 5.106. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) obtenidos a distintas concentraciones de ADN por el método C y a $[\text{Na}^+] = 0.075$ M. Los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el oro a las mezclas ADN-NaCl. B) Fotografías de las diferentes muestras obtenidas siguiendo el método C. Todas las casillas tienen la misma concentración de AuNPs (3.3×10^{-10} M) y de Na^+ (0.075 M), a excepción de la 7. Las concentraciones de ADN son: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 10^{-4} M; 6) 10^{-3} M; 7) $[\text{DNA}] = 0$ M, $[\text{Na}^+] = 0$ M.

Con el fin de poder analizar estas diferencias en mayor profundidad, se estudiaron las diferentes bandas que componen a los espectros de absorción por deconvolución para así obtener sus parámetros individuales (λ_{max} y área), tanto en el método A como en el C. Como ya se ha descrito con anterioridad, la banda SPR con menor longitud de onda se asocia a las AuNPs dispersas mientras que las bandas con mayores longitudes de onda corresponden a las que se encuentran agregadas en disolución. Como muestra la Figura 5.22 y 5.23, se obtuvieron buenos ajustes entre los datos experimentales (puntos negros) y el espectro simulado (línea rosa). Los resultados obtenidos por el análisis de deconvolución aparecen en la Tabla 5.2.

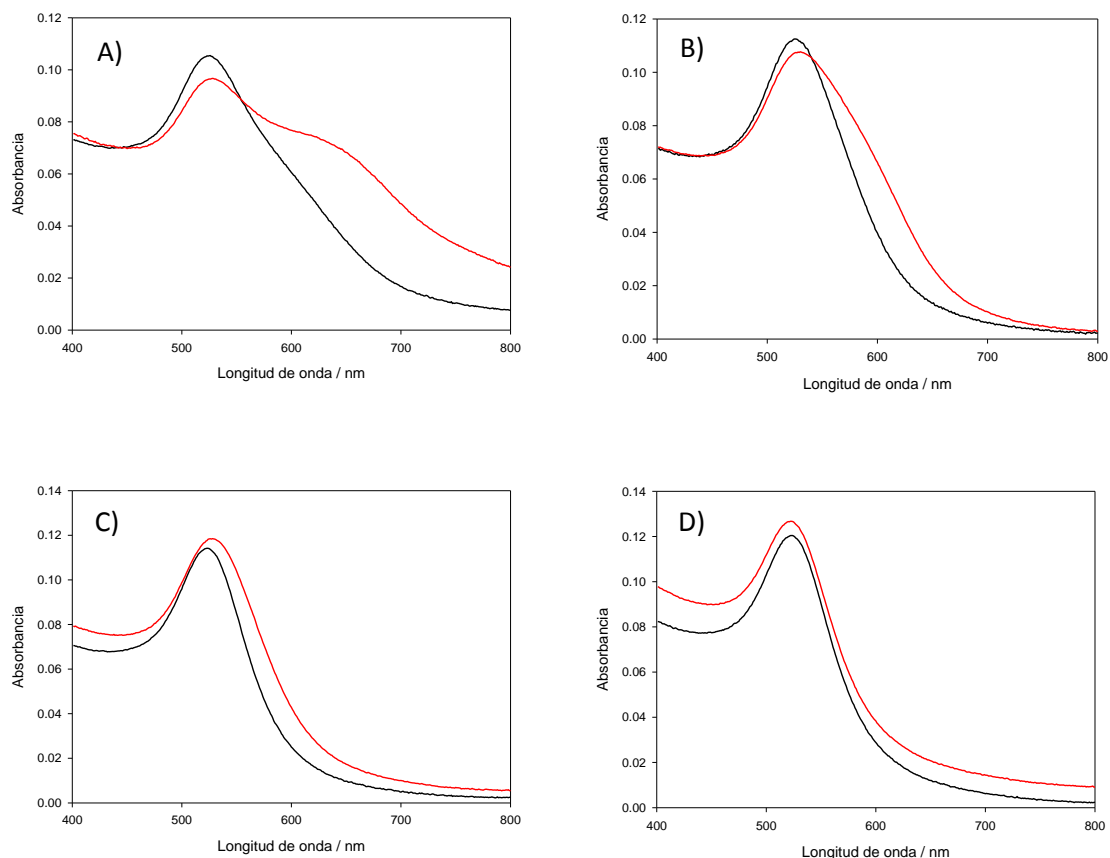


Figura 5.107. Comparativa de los espectros de absorción obtenidos por el método A (línea negra) y el método C (línea roja) para $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10} \text{ M}$, $[Na^+] = 0.075 \text{ M}$. Las concentraciones de ADN son: A) 10^{-6} M ; B) 10^{-5} M ; C) 10^{-4} M ; D) 10^{-3} M . Todos los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el último componente a la mezcla.

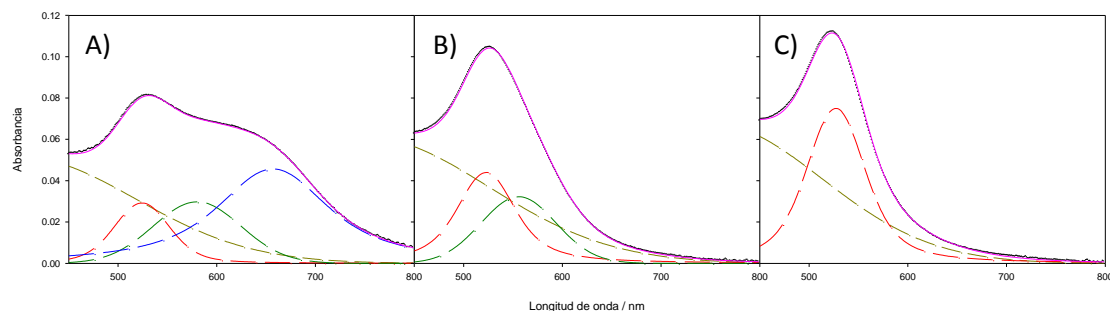


Figura 5.108. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos por el método A para tres concentraciones diferentes de ADN: A) 10^{-7} M ; B) 10^{-5} M ; C) 10^{-3} M . Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde y azul corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.

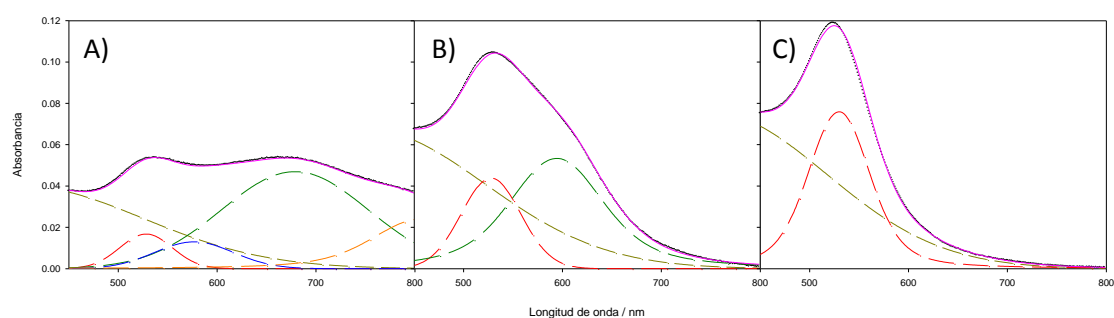


Figura 5.109. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos por el método C para tres concentraciones diferentes de ADN: A) 10^{-7} M; B) 10^{-5} M; C) 10^{-3} M. Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde, azul y naranja corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas.

Tabla 5.20. Parámetros obtenidos por deconvolución para los espectros de absorción experimentales obtenidos con el método A y con el método B.

Método A (AuNPs + ADN + NaCl)

[DNA]/M	λ_1 /nm	Area ₁	λ_2 /nm	Area ₂	λ_3 /nm	Area ₃	λ_4 /nm	Area ₄
10^{-3}	527.1	7.00	-	-	-	-	-	-
$5 \cdot 10^{-4}$	526.8	7.69	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	526.4	8.36	-	-	-	-	-	-
$5 \cdot 10^{-5}$	526.8	8.08	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	522.8	4.21	555.6	3.06	-	-	-	-
10^{-6}	524.7	2.58	600.9	6.00	-	-	-	-
10^{-7}	524.1	2.31	580.0	3.30	656.8	9.10	-	-

Método C (AuNPs + ADN/NaCl)

[DNA]/M	λ_1 /nm	Area ₁	λ_2 /nm	Area ₂	λ_3 /nm	Area ₃	λ_4 /nm	Area ₄
10^{-3}	529.7	6.94	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	531.8	5.36	580.2	1.91	-	-	-	-
10^{-5}	527.8	3.31	594.1	7.87	-	-	-	-
10^{-6}	525.4	2.81	578.2	1.81	635.7	13.90	-	-
10^{-7}	528.0	1.11	576.4	1.29	678.6	8.73	806.8	3.71

Estos resultados muestran que hay una fracción de AuNPs (cuya banda se posiciona en torno a 525 nm en la Tabla 5.2) en que, a pesar de la interacción con los cationes sodio no se produce la agregación, presentando el comportamiento habitual de las AuNPs cuando están distribuidas libremente en disolución. Al comparar este grupo de nanopartículas entre los dos métodos se observa que la banda se posiciona a longitudes de onda menores en el método A que en el método C, subrayando que en este segundo método interaccionan más cationes sodio con las AuNPs ya que la distancia entre ellas es menor a causa de una disminución de las repulsiones electrostáticas. Por otra parte, las nanopartículas restantes habrán interaccionado con iones sodio siendo parcial o totalmente neutralizadas sus cargas negativas, formando agregados de distintos tamaños y generando en el espectro de absorbancia nuevas bandas (véase λ_2 , λ_3 y λ_4 en la Tabla 5.2). Aunque la tendencia en los espectros experimentales es parecida entre los dos métodos, el estudio en detalle de deconvolución muestra que la agregación es mayor en el Método C. Así por ejemplo, si se comparan los datos para la concentración de ADN 10^{-7} M (figura 5.22A y Figura 5.23A), cuando se adiciona la sal junto al ADN se generan tres bandas asociadas a las AuNPs agregadas, mientras que la adición de sal a una mezcla AuNPs/ADN sólo genera dos bandas. Naturalmente y aunque el método A es más efectivo para prevenir la agregación, en ambos casos se observa como las bandas asociadas a NPs agregadas disminuyen conforme la concentración de ADN aumenta (Figura 5.24).

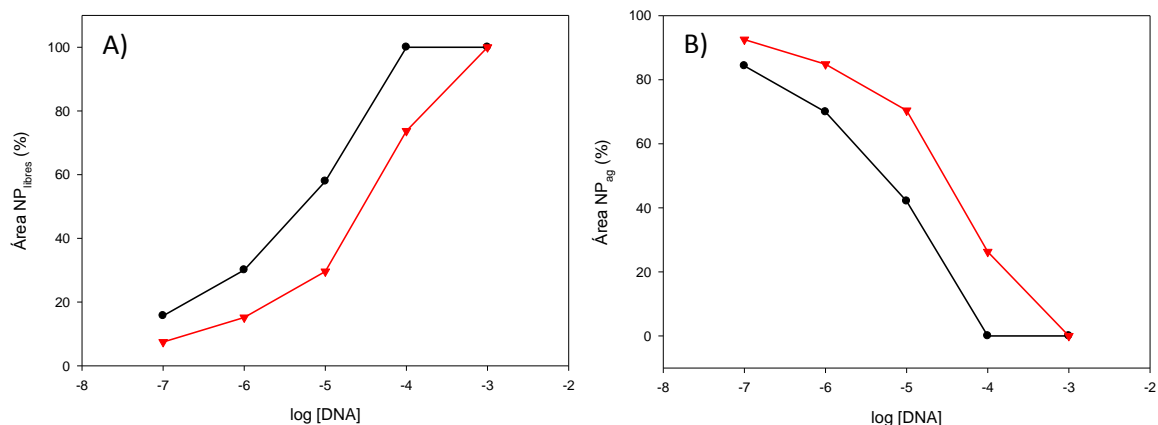


Figura 5.110. Evolución de las áreas deconvolucionadas con la concentración de ADN para el método A y C. A) Proporción del área correspondiente a la fracción de AuNPs libres o dispersas. B) Proporción del área proveniente de las fracciones de AuNPs agregadas. El área de las nanopartículas agregadas se calculó sumando las áreas de las distintas bandas asociadas a las AuNPs agregadas.

5.5.3. Efectos de las nanopartículas aniónicas en la estructura del ADN

En estudios anteriores diversos autores han demostrado que el ADN de doble cadena llega a interactuar no covalentemente con AuNPs aniónicas.^{75,180} Es más, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha llegado a detectar la interacción de AuNPs neutras funcionalizadas con tiopronina [(2-mercaptopropionil)glicina] con ADN de doble cadena,¹⁸¹ habiéndose cuantificado en términos de energía libre dicha interacción¹⁸² y estudiándose desde un punto de vista cinético.¹⁸³ Si bien es cierto que las condiciones experimentales (tipo de ADN y/o tipo de nanopartículas) difieren al sistema estudiado, es importante resaltar que lo que impide que haya una interacción entre las AuNPs y el ADN es la barrera energética proveniente de las repulsiones electrostáticas. La Figura 5.25A muestra la banda SPR de AuNPs de 14.8 nm a diferentes concentraciones de ADN; la cantidad de Na⁺ presente en el medio, proveniente del tampón, es insuficiente para provocar la agregación del coloide (véase Figura 5.1). Como se puede observar en la Figura 5.25A, aunque no se produce ningún desplazamiento al rojo de la banda al añadir ADN, hay un débil aumento de la absorbancia, que puede ser atribuido a débiles interacciones entre el ADN y las AuNPs. Este mismo efecto hipercrómico, sin desplazamiento de la banda SPR, se ha observado en AuNPs de 14 nm y con oligonucleótidos de 16 bps, en el que L. A. Gearheart et al. confirman dicha interacción.⁸⁴ Para confirmar que el efecto hipercrómico representado en la Figura 5.25A no es debido a la dispersión de la luz y por el propio ADN, se corrigió dicha dispersión siguiendo el método establecido por S. J. Leach y H. A. Scheraga;¹⁸⁴ este procedimiento calcula la absorbancia causada por la dispersión de luz ($A_{LS} = k \cdot \lambda^{-n}$) a partir de una zona en la que la muestra no debería absorber radiación, donde la señal se deberá exclusivamente a la dispersión de luz. Como se muestra en la Figura 5.25B, los cambios aunque demasiado pequeños, siguen presentes para considerarlos como válidos dado el error del procedimiento.

A pesar de que tanto el ADN como las AuNPs presentan cargas negativas, las repulsiones electrostáticas podrían provocar cambios estructurales en el ADN para minimizar esta energía de repulsión. Estos cambios estructurales repercutirían en los apilamientos de los anillos aromáticos de las bases así como en la forma de la hélice, y estas variaciones son perceptibles por espectroscopía de Dicroísmo Circular.¹⁸⁵ Como muestra la Figura 5.26, los cambios que producen las AuNPs en el ADN son pequeños pero detectables. La banda negativa del ADN, localizada sobre 252 nm y que se relaciona con el grado de helicidad de la estructura, decrece levemente conforme mayor es la cantidad de AuNPs añadida. La banda positiva, situada a 282 nm, sufre una moderada disminución conforme aumenta la concentración de AuNPs, lo que refleja una pérdida de las interacciones π - π entre las bases. Esta débil tendencia también se obtuvo a una concentración de ADN dos veces mayor (Figura 5.21), en el que se puede visualizar de mejor manera la formación de un punto isosbético a 272 nm.

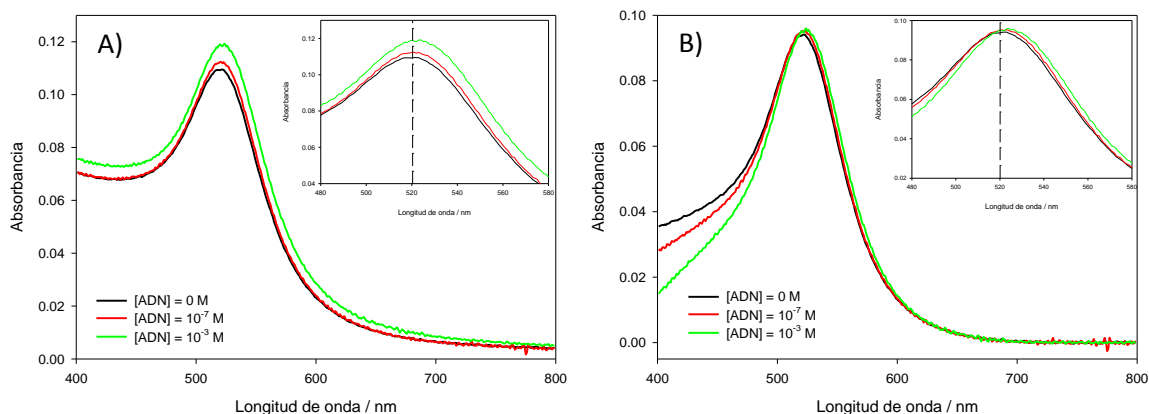


Figura 5.111. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) a distintas concentraciones de ADN de doble cadena. Las concentraciones fueron: [cacodilato] = 9×10^{-4} M, $[Na^+] = 9 \times 10^{-3}$ M. B) Espectros de absorción de AuNPs a distintas concentraciones de ADN obtenidos tras corregir la dispersión de luz según el método propuesto por S. J. Leach y H. A. Scheraga.¹⁸⁴

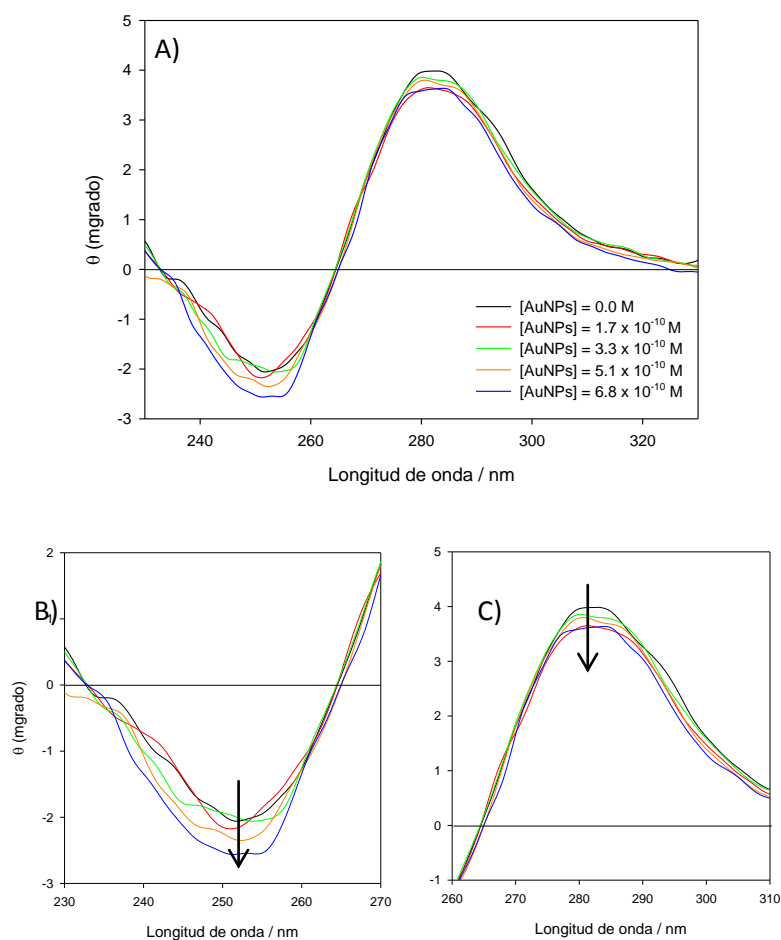


Figura 5.112. A) Espectro de dicroísmo circular de ADN de doble cadena a diferentes concentraciones de AuNPs. B) Evolución de la banda negativa conforme aumenta la concentración de AuNPs. C) Evolución de la banda positiva conforme aumenta la concentración de AuNPs. $[ADN] = 5 \times 10^{-5}$ M, $[AuNPs] = 0.0 - 6.8 \times 10^{-10}$ M.

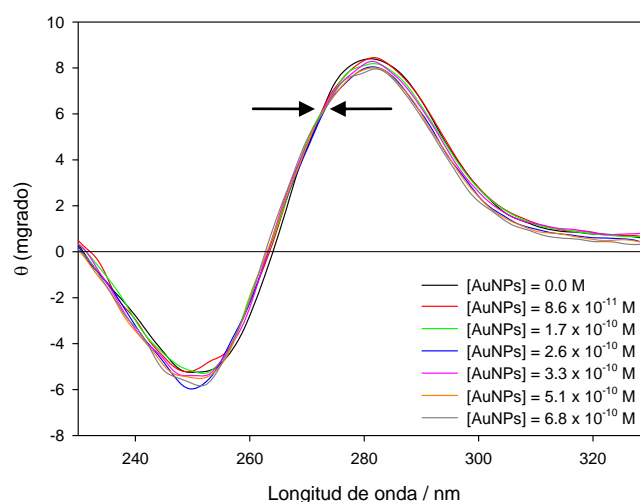


Figura 5.113. Espectro de dicroísmo circular de ADN de doble cadena a diferentes concentraciones de AuNPs. [ADN] = 10^{-4} M, [AuNPs] = 0.0 – 6.8×10^{-10} M. Las flechas indican el punto isobéptico a 272 nm.

Debido a lo débiles que son los resultados obtenidos por espectroscopía de CD, se realizaron estudios hidrodinámicos. La técnica viscosimétrica es un método bien establecido, sensible a los cambios de longitud de un polímero que permite discernir cambios conformacionales de éste en disolución. La Figura 5.28A muestra cómo varía la viscosidad relativa del ADN de doble cadena en función de la concentración de AuNPs en el medio, observándose a un descenso bajas concentraciones de coloide (hasta 3.3×10^{-10} M) se produce para posteriormente alcanzarse una zona en la que permanece prácticamente constante. Aunque los cambios son leves, $\Delta(\eta/\eta_0) \approx 0.02$, la disminución y no un incremento de la viscosidad indica que las moléculas de ADN se curvan (*bending*) en lugar de producirse una intercalación de las AuNPs.^{175,186} Para comprobar que este efecto no es puramente electrostático, sino también debido a la propia nanopartícula, se estudió la evolución de la viscosidad relativa del ADN a las mismas concentraciones de citrato que presenta las disoluciones coloidales de trabajo. La Figura 5.28B muestra que la viscosidad relativa del ADN se mantiene constante, independientemente de la cantidad de citrato presente en el medio, confirmándose que los cambios estructurales del ADN son debidos al efecto de saturación generado por las AuNPs en disolución.

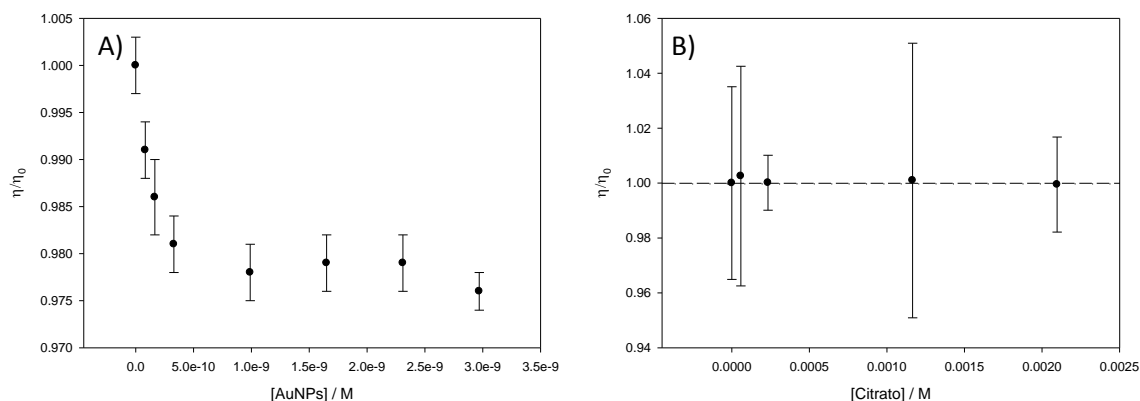


Figura 5.114. A) Evolución de la viscosidad relativa de ADN de doble cadena (10^{-5} M) conforme aumenta la concentración de AuNPs. B) Evolución de la viscosidad relativa de ADN de doble cadena (10^{-5} M) conforme aumenta la concentración de aniones citrato. El rango de concentración de citrato fue el mismo que el del estudio de viscosidad con AuNPs.

Con el fin de confirmar que se producen plegamientos en la molécula de ADN en presencia de NPs aniónicas, se midió el diámetro hidrodinámico (D_h) del biopolímero a través de la dispersión dinámica de luz. La Figura 5.29 muestra la distribución de D_h de las moléculas de ADN a diferentes proporciones ADN/AuNPs. En ausencia de nanopartículas, el polinucleótido se encuentra en dos poblaciones con un tamaño medio de 190 nm y de 1450 nm cada una. Aunque la técnica DLS tiene una polidispersidad intrínseca del 10-15 %, la presencia de dos picos es debido a que la disolución madre de ADN no es de tamaño único, debido a la distribución de tamaño de la muestra comercial. Cuando se añaden AuNPs al medio se produce una disminución del diámetro hidrodinámico, apareciendo dos distribuciones: una centrada a 19 nm (debido a las AuNPs) y otro a 220 nm (el asociado al ADN); pero es más, a la concentración más alta de AuNPs (Figura 5.29C) la anchura de la distribución de tamaños es menor que en el caso de 3.3×10^{-10} M (Figura 5.29B).

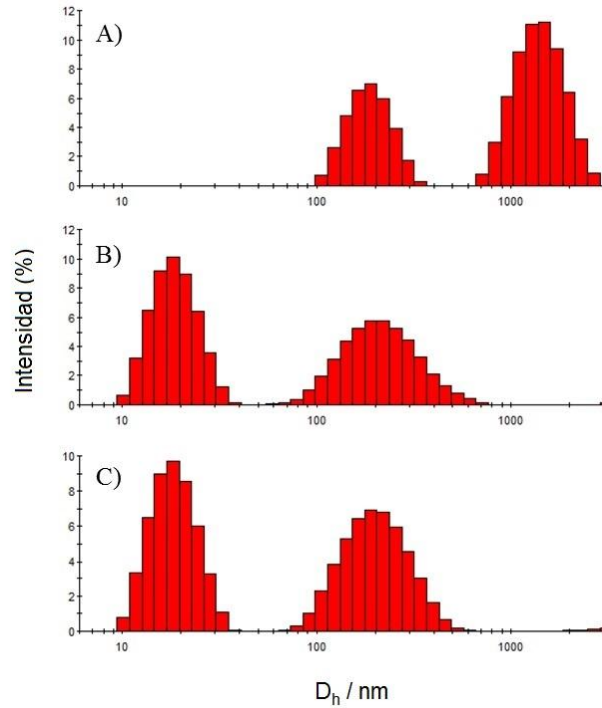


Figura 5.115. Medidas de intensidad de DLS de disoluciones de ADN (10^{-5} M) y diferentes concentraciones de AuNPs: A) 0 M; B) 3.3×10^{-10} M; C) 1.6×10^{-9} M.

Aunque las experiencias de DLS denotan que se produce una compactación del ADN, no aportan información sobre la organización estructural que adquiere el biopolímero. Técnicas como la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) o la Microscopía de Fluorescencia (FM) fueron más útiles para dicho fin. Las imágenes obtenidas por AFM de ADN sin sal y en ausencia y presencia de AuNPs muestran un efecto de curvatura cuando el coloide está presente, indicando una disminución de la longitud de persistencia de la doble hélice (Figura 5.30). Este efecto justifica las medidas de viscosidad descritas anteriormente. Además las moléculas de ADN decrecen de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ a $0.3 \mu\text{m}$, valores que se amoldan bien a los obtenidos por DLS.

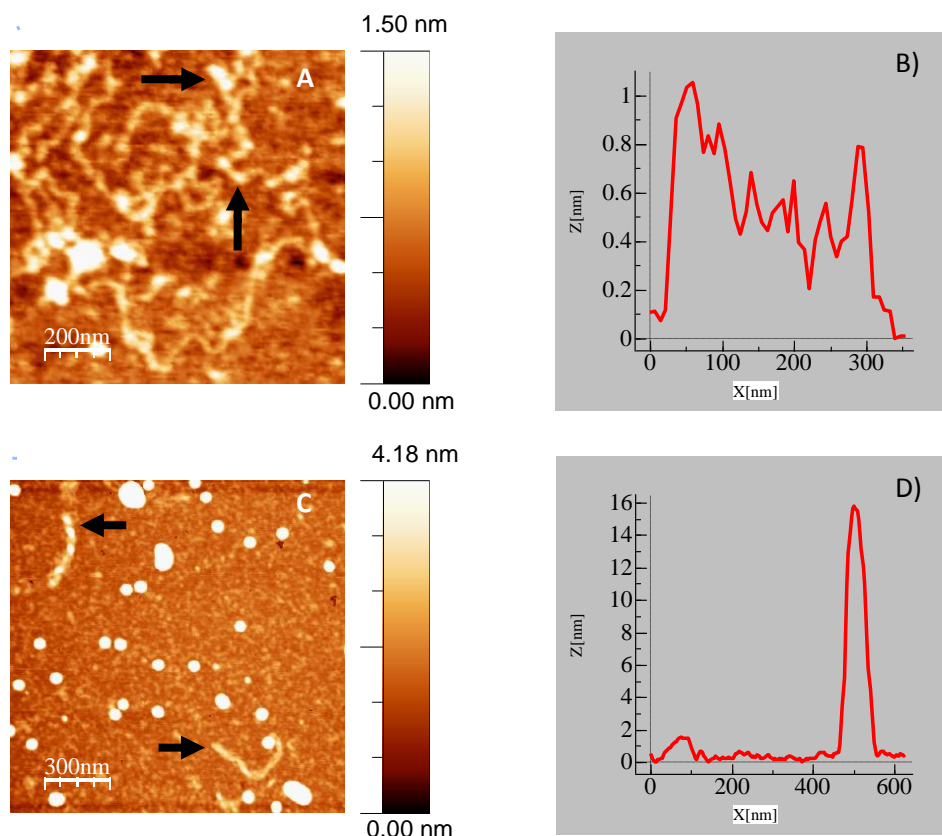


Figura 5.116. Imágenes topográficas de ADN (*calf thymus*) adsorbido en una superficie de mica en ausencia y en presencia de nanopartículas de oro aniónicas. A) $[AuNPs] = 0$ M, $[ADN-CT] = 3 \times 10^{-7}$ M; C) $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[ADN-CT] = 3 \times 10^{-7}$ M. Las Figuras B y D corresponden con el análisis de la sección de cruce (línea celeste en las Figuras A y C) de las alturas. Las flechas marcan moléculas de ADN.

Dado que las imágenes de AFM fueron obtenidas adsorbiendo el biopolímero sobre una placa de mica, se realizaron medidas de FM con el fin de obtener estructuras del ADN en disolución en presencia y ausencia de oro coloidal. Debido a los requisitos del microscopio de fluorescencia para la visualización de las moléculas de ADN, se empleó un polinucleótido mucho más largo que el de *calf thymus*: el ADN-T4 (166 kbps). La Figura 5.31 muestra distintas moléculas de ADN-T4, donde se observa una estructura extendida aleatoria (*random coil*). Al añadir AuNPs se produce la fragmentación de las cadenas de ADN (véase Figura 5.32A) debido a que el láser de excitación es verde, longitud de onda próxima a la de absorción de las AuNPs, provocando el sobrecalentamiento del sistema. Además la diferencia de temperatura en diferentes partes de la muestra genera que el disolvente esté en movimiento por la diferencia de densidad, este flujo estira las hebras del ADN confiriéndole a la molécula una mayor elongación de la que le corresponde (véase Figura 5.32B). Aunque en presencia de coloide se observaron estructuras más compactadas, estos efectos impidieron el estudio completo por microscopía de fluorescencia.

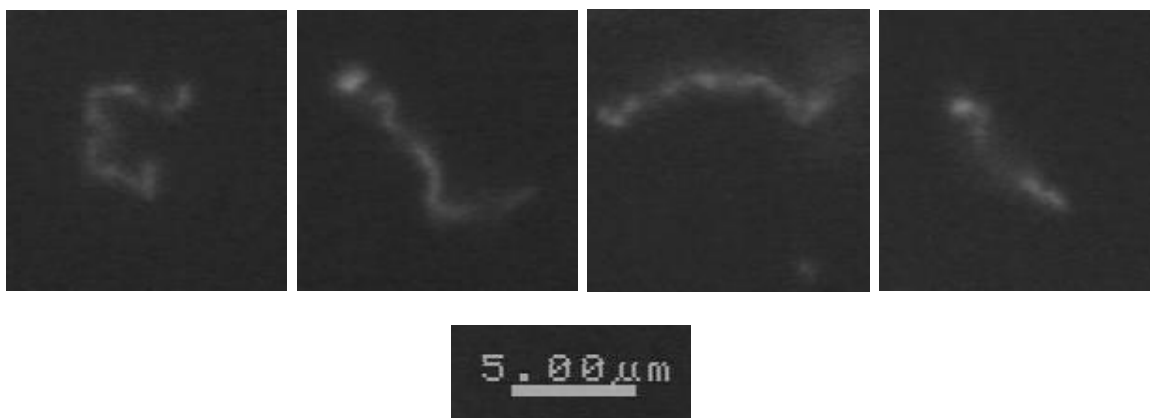


Figura 5.117. Imágenes de moléculas únicas obtenidas por FM de ADN-T4 (10^{-7} M) en ausencia de sal y AuNPs. El tinte fluorescente utilizado fue YOYO-1.

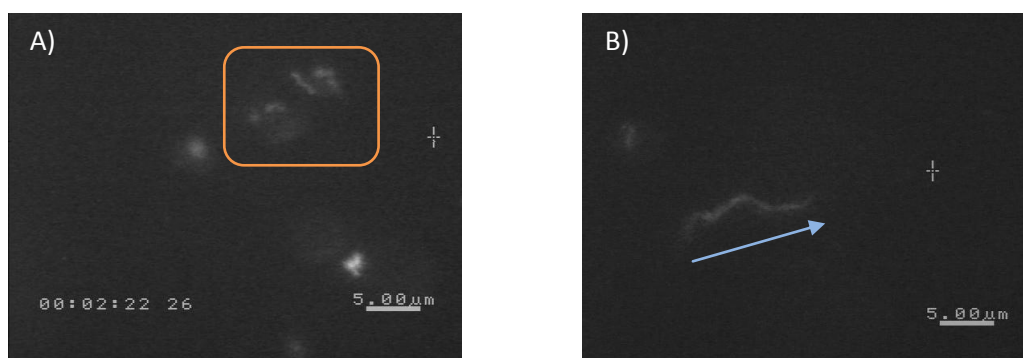


Figura 5.118. Imágenes de FM de ADN-T4 en presencia de AuNPs (3.3×10^{-10} M). A) Fragmentación del ADN en cadenas más cortas. B) Elongación dirigida del ADN por efecto del flujo del disolvente (la flecha indica el flujo de éste). $[\text{ADN}] = 10^{-7}$ M.

La reducción de tamaño de las hebras de ADN en ausencia de sal, sin compactarse totalmente, puede explicarse si se considera el efecto de exclusión de volumen de las AuNPs. Anatoly Zinchenko y colaboradores mostraron que ADN-T4 y de espermatozoos de salmón se compacta a la forma globular en presencia de nanopartículas aniónicas de sílice,¹⁶³ este efecto también se ha observado en sistemas “crowded” con proteínas cargadas negativamente.¹⁸⁷ Para comprobar que la reducción de tamaño del ADN no es exclusivamente un efecto del volumen excluido, se repitieron las cinéticas de agregación de AuNPs con sal sustituyendo el polinucleótido por un polímero *neutro* de peso molecular semejante al ADN, PEG 600. La estimación del peso molecular del ADN de *calf thymus* se encuentra en el Anexo 2. Cuando se compara la cinética del proceso de agregación en presencia de PEG (Figura 5.33) con la cinética

en presencia de ADN de doble cadena (Figura 5.5) se observa que el PEG protege débilmente de la agregación inducida por sal; la pendiente es casi independiente de la concentración y no tiene lugar nunca una protección total, a diferencia del polinucleótido.

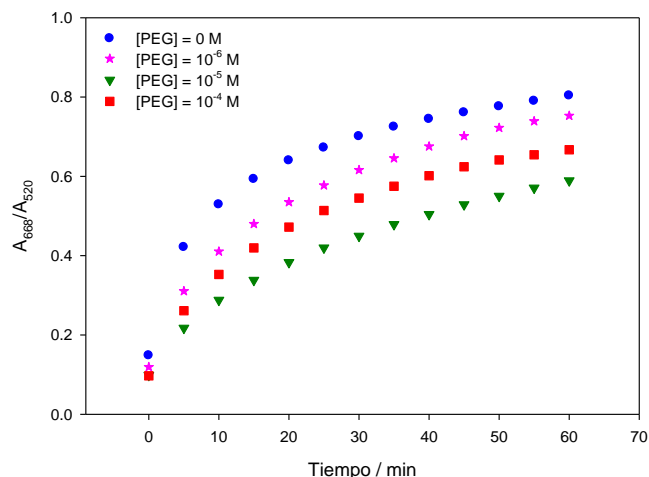


Figura 5.119. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) con el tiempo, donde A_{668} son los datos de absorción a 668 nm y A_{520} a 520 nm. $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[NaCl] = 0.075$ M.

Los cambios que sufre el ADN en presencia de NaCl fueron también estudiados por microscopía de AFM. La Figura 5.34 muestra al ADN de doble cadena en presencia de sal y ausencia de oro coloidal; si se compara con el ADN cuando el electrolito inerte no está presente (Figura 5.24A) se puede apreciar que el ADN se encuentra más encogido cuando el Na^+ neutraliza sus cargas negativas, reduciendo su longitud de persistencia. Esta misma tendencia ha sido observada para ADN-T4 por FM.¹⁸⁸ De hecho, las imágenes de AFM muestran que en presencia de NaCl, el ADN puede desplegarse formando múltiples círculos donde hay varios puntos de cruce entre las hebras, junto a la condensación de algunas partes aleatorias de la cadena (véase la Figura 5.34). Cuando el sistema contuvo además AuNPs (Figura 5.35), se observaron estructuras más extendidas que en ausencia del oro coloidal aunque también ligeramente compactadas. Resulta interesante la existencia de los puntos brillantes en estas figuras de AFM, los cuales sugieren la existencia de zonas donde se forman agregados de ADN; además se observa una distribución preferencial de las AuNPs por alinearse a través de las cadenas de ADN.

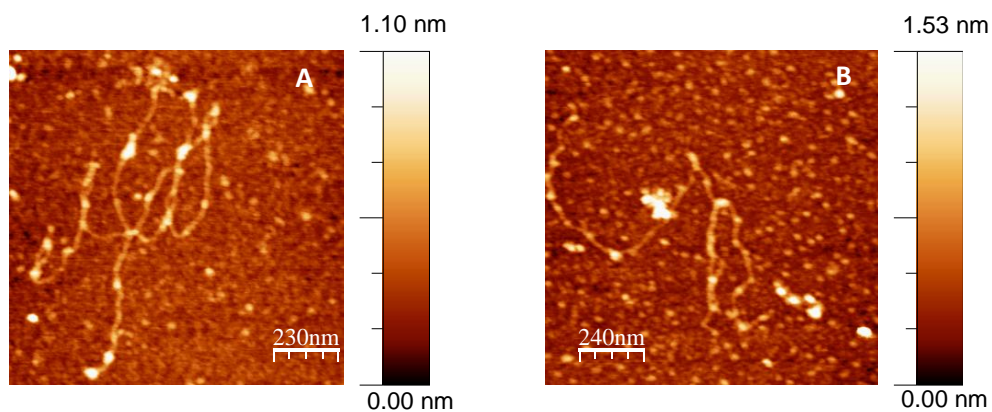


Figura 5.120. Imágenes topográficas de ADN-CT adsorbido en una superficie de mica en presencia de NaCl y en ausencia de AuNPs. $[ADN] = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$, $[NaCl] = 0.075 \text{ M}$.

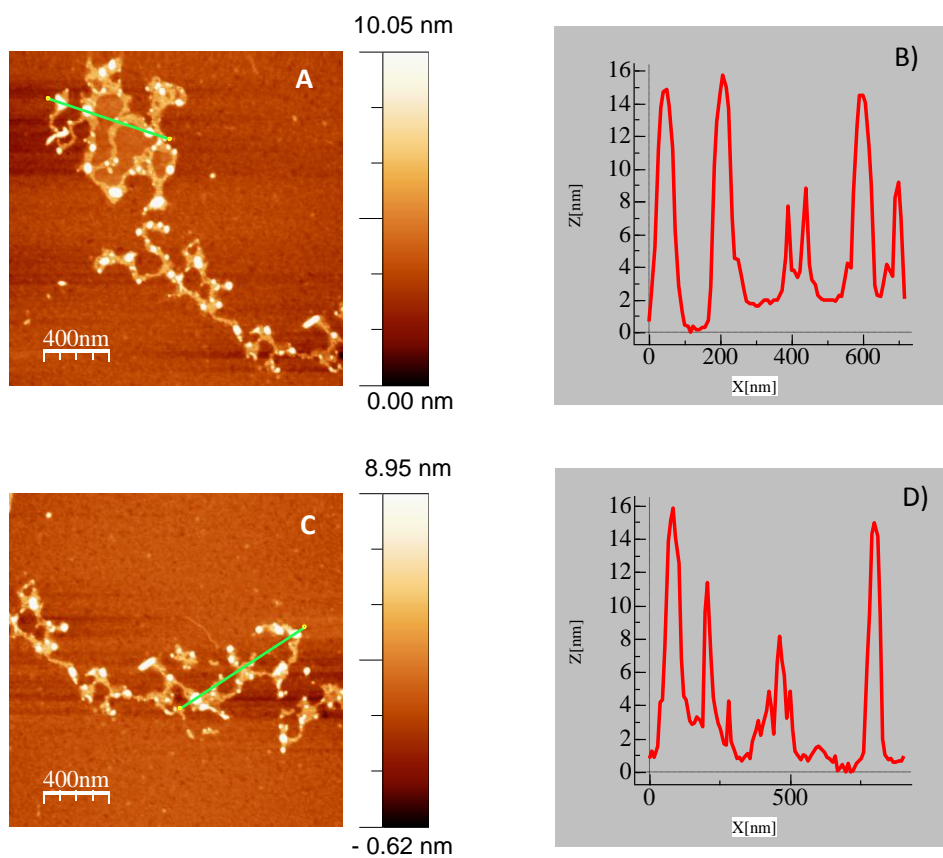


Figura 5.121. Imágenes topográficas de ADN-CT adsorbido en una superficie de mica en presencia de nanopartículas de oro aniónicas y sal. $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10} \text{ M}$, $[ADN] = 3 \times 10^{-7} \text{ M}$, $[NaCl] = 0.075 \text{ M}$. El orden de adición fue el establecido como método A. Las Figuras B y D corresponden con el análisis de la sección de cruce (línea verde en las Figuras A y C) de las alturas.

A la vista de los resultados, la razón última del efecto de protección puede justificarse mayoritariamente por una preferencia de interacción del Na^+ con el ADN multicargado a través de grupos fosfato. Las repulsiones electrostáticas entre AuNPs y hebras de ADN y el volumen excluido por parte de las AuNPs provocan el plegamiento del ADN en ausencia de sal, situación que genera cierta inestabilidad en el polinucleótido; cuando se añade NaCl al sistema, el ADN atrae los cationes sodio para disminuir esta desestabilización. Un vez que el ADN ha disminuido las repulsiones y tensiones entre sus hebras, el resto de cationes Na^+ libres en disolución y una fracción de los adheridos a la superficie del ADN son accesibles a las AuNPs: de hecho, como muestra la Figura 5.35, las propias nanopartículas pueden interaccionar con un catión sodio interaccionando con grupos fosfato, formándose un complejo AuNP-ADN cuyo nexo es el catión.

5.6. Uso de la temperatura para la formación de complejos de ADN simulando a histonas

Actualmente, y desde hace algunos años, una de las líneas de estudio de ADN de cadena larga con nanopartículas catiónicas se centra en la formación de complejos similares a las histonas. Gracias a su semejanza en tamaño y curvatura, las nanopartículas son por excelencia los mejores modelos biomiméticos de este complejo proteico.^{87,189} La atracción de los grupos fosfatos por las cargas positivas de la proteína provoca el enrollamiento del ADN con 1.7 vueltas por octámero.¹⁹⁰ Dado el carácter electrostático de la interacción, es necesario que la nanopartícula sea catiónica para que se produzca la tendencia del ADN a adsorberse. Debido a que la principal aplicación de estos complejos es la terapia génica, donde las nanopartículas deben ser introducidas en un ser vivo, el interés mostrado en nanopartículas de oro catiónicas ha sido escaso debido a su toxicidad.¹⁹¹ Sin embargo, resulta extensa la bibliografía en la que se emplean nanopartículas de sílice o puntos cuánticos funcionalizados con moléculas positivas.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Muchas de estas nanopartículas no presentan propiedades ópticas que permitan estudiar el sistema, condicionando la funcionalización del coloide con moléculas con propiedades ópticas (como por ejemplo, fluorescencia), lo que muchas veces implica procesos tediosos y de alto coste económico. El objetivo de esta sección ha sido comprobar la posibilidad de obtener complejos AuNPs-ADN con nanopartículas aniónicas y sin necesidad de ser funcionalizadas.

Se tomaron 10 μl de una disolución de ADN-T4 (10^{-5} M) y se colocaron en 790 μl de un tampón Tris-HCl (pH = 7.5). Esta muestra fue colocada en un baño de agua a 60 °C, manteniéndose durante 10 minutos en éste. Transcurrido este tiempo, sin desplazar la muestra del baño, se adicionaron 200 μl de AuNPs con un tamaño aproximado de 15 nm, siendo las concentraciones finales de ambos compuestos $[\text{ADN}] = 10^{-7}$ M y $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10}$ M. La

muestra se mantuvo en el baño otros 5 minutos más para dejarla finalmente enfriar a temperatura ambiente (24 °C). Como control se utilizó una disolución de ADN con la misma concentración y el mismo tratamiento, pero en ausencia de AuNPs. Además se preparó otra muestra con su respectivo control pero sin aplicarle calentamiento alguno. Cuando las muestras fueron comparadas por FM, los resultados obtenidos fueron claramente diferentes (véase Figura 5.36). Las Figuras 5.36A y B se corresponden con las muestras de control, sin y con calentamiento respectivamente; en ambos casos se pueden observar moléculas alargadas de ADN con un brillo débil. Además se observan moléculas más pequeñas en el control calentado debido a la fácil tendencia a fragmentarse del ADN de cadena larga al aumentar la temperatura. Cuando las AuNPs fueron añadidas a la disolución de ADN a temperatura ambiente (Figura 5.36C), surgieron nuevos cambios: moléculas compactadas de ADN, cuya intensidad era mayor que las moléculas alargadas (véase la imagen de la izquierda en la Figura 5.36C) y un tamaño de moléculas no compactadas similar a su respectivo control. Esta compactación encaja con los fenómenos descritos en la subsección 5.5.3, donde las repulsiones entre cargas del mismo signo y el volumen de exclusión provocan el plegamiento del ADN (“bending”), o incluso la total compactación de la molécula.¹⁶³ Sin embargo en la muestra calentada (Figura 5.36D), se observan estructuras más compactas que las mostradas previamente y con unos puntos muy brillantes. Aunque estos puntos podrían considerarse AuNPs, esta posibilidad se descartó ya que se comprobó que las nanopartículas de oro no generan señal en la FM a la concentración de trabajo. Estos puntos sólo pueden ser zonas donde se produce una gran compactación, formándose “nudos” de ADN. A pesar de la carga negativa de las AuNPs, la estructura observada es similar a las obtenidas en otros estudios con nanopartículas catiónicas, donde se forman complejos similares a las histonas.^{192,193} Las experiencias fueron repetidas cambiando la temperatura del baño a 52 °C y a 70 °C, observándose la formación de dichos complejos para la primera temperatura y no formándose complejo alguno a la temperatura más alta de estudio. Es interesante indicar que la sonda fluorescente utilizada para estas imágenes fue *Gelgreen* en lugar de YOYO-1, ya que con el segundo no se observaron las estructuras de la Figura 5.36D. La principal diferencia entre estos dos tintes radica en que el primero es un polímero de dos cabezas que interacciona con la cadena exterior del ADN mientras que el segundo es un intercalador.

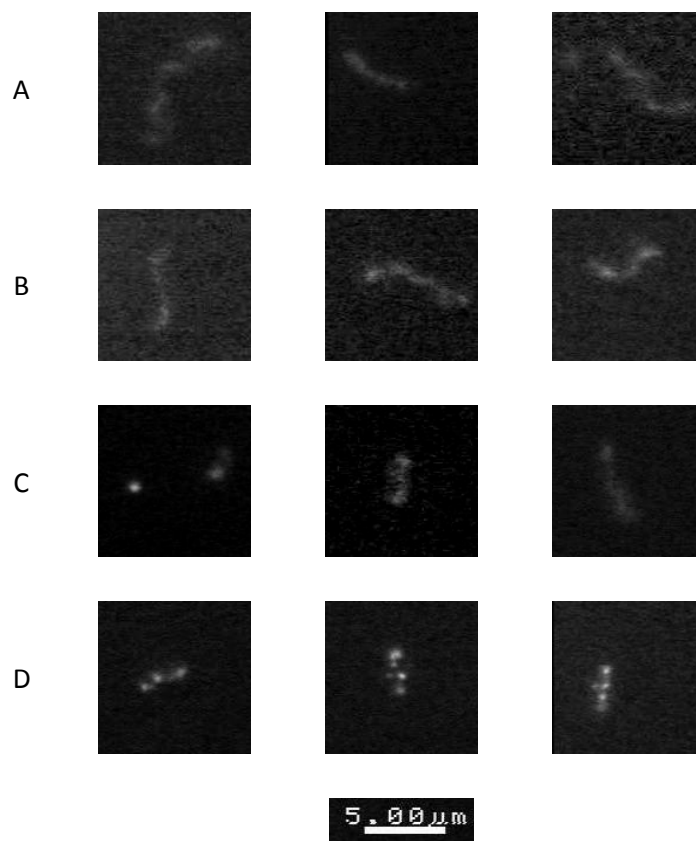


Figura 5.122. Imágenes de microscopía de fluorescencia de moléculas de ADN-T4: A) en ausencia de AuNPs y a temperatura ambiente; B) en la ausencia de AuNPs y a temperatura ambiente después de calentar a 60 °C; C) en presencia de AuNPs y sin calentar; D) en presencia de AuNPs y a temperatura ambiente después de calentar a 60 °C.

La estructura obtenida confiere mayor estabilidad a las nanopartículas: cuando se adicionó NaCl (con una concentración final de 0.02 M) a la muestra de ADN sin calentar, las AuNPs se agregaron produciéndose un cambio de color de rojo a morado, mientras que la adición de la misma sal a la muestra calentada no provocó cambio alguno en el color de la disolución, manteniendo su color rojo (véase Figura 5.37). Este tipo de protección confirma la interacción entre el ADN-T4 y las AuNPs, habiéndose atribuido este mismo fenómeno a la adsorción de oligonucleótido a la superficie de los nanoclusters.^{77,85}

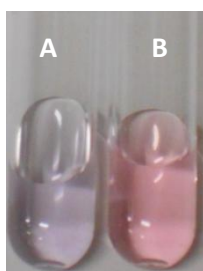


Figura 5.123. Fotografías de las muestras con $[\text{NaCl}] = 0.02 \text{ M}$, $[\text{ADN-T4}] = 10^{-7} \text{ M}$ y $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10} \text{ M}$. A) Sin calentamiento; B) con calentamiento.

La interacción descrita también pudo observarse por TEM. La Figura 5.38A corresponde a una muestra que sólo contenía AuNPs dispersas (la presencia de pequeños grupos aleatorios de AuNPs agregadas es debida al propio procedimiento de preparación de la muestra y no a su propia existencia en la disolución). La adición de ADN, sin calentamiento alguno, provoca una distribución ramificada, con una disposición similar a un collar, donde se observan también pequeñas lagunas en el interior de dicha estructura (véase la Figura 5.38B): las moléculas de ADN ocupan un espacio que las nanopartículas no pueden ocupar, así que las nanopartículas se ven obligadas a posicionarse alrededor de las moléculas de ADN extendidas, aunque hay AuNPs dispersas y pequeños grupos de nanopartículas agregadas totalmente ajenos a las estructuras de ADN. Por otra parte, en la muestra calentada las estructuras observadas por TEM son mucho más compactas y complejas (véase Figura 5.38C). La primera diferencia entre la muestra calentada y sin calentar es la aparición de zonas más oscuras en la primera, como resultado de una alta acumulación de AuNPs en el mismo área. Otra diferencia es la falta de nanopartículas dispersas o agregadas ajenas a la macroestructura, mostrando que todas las AuNPs se encuentran en ésta, que es mucho más compacta y menos ramificada que cuando no hay calentamiento. Estas diferencias en la estructura son debidas a que las interacciones ADN-AuNPs se favorecen al formarse el complejo tras el calentamiento. Una posible explicación sería considerar aperturas parciales en el ADN-T4 durante el proceso de calentamiento, causando la pérdida de rigidez y por lo tanto pudiendo exponer sus bases a la superficie áurica; por esta razón, las estructuras del complejo mencionado están ausentes en las muestras no calentadas, debido a que las AuNPs de 15 nm son incapaces de provocar de por sí la apertura del ADN de doble cadena para interactuar con sus bases.⁴⁹ Es interesante resaltar como las estructuras obtenidas son diferentes a las que se obtendrían si el ADN actuara como un mero molde, donde éstas serían más ramificadas y menos compactas, o incluso generándose nanoalambres.⁹⁵

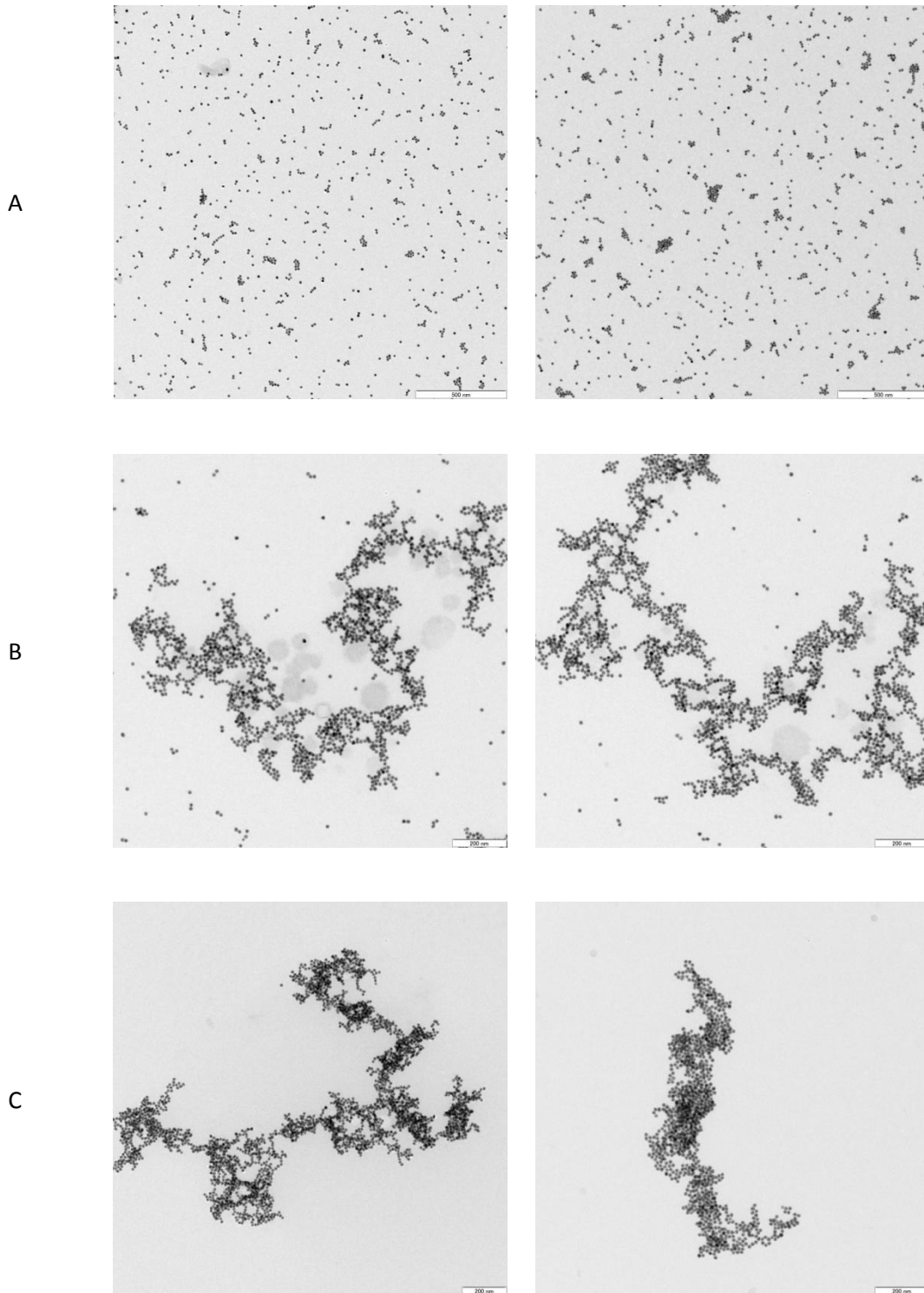


Figura 5.124. A) Imágenes de TEM de nanopartículas dispersas, cuya concentración es 4×10^{-9} M. B) Imágenes de TEM de nanopartículas en presencia de ADN; $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10}$ M, $[\text{ADN}] = 10^{-7}$ M. C) Imágenes de TEM de nanoestructuras formadas por calentamiento de una disolución de $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10}$ M y $[\text{ADN}] = 10^{-7}$ M. La barra de escalado para A corresponde a 500 nm, y para B y C corresponde a 200 nm.

Aunque colorimétricamente no se observaron diferencias en las muestras calentadas y sin calentar, se midieron sus correspondientes espectros de absorción para poder detectar cualquier mínimo cambio a la banda de plasmón; sin embargo la técnica de absorción UV-vis no aportó mucha información. La Figura 5.39 muestra la banda SPR de las AuNPs con y sin ADN en las diferentes etapas del proceso. Aunque se produce un pequeño aumento de la absorbancia, este efecto puede ser atribuido a la temperatura y no a las interacciones ADN-AuNPs, ya que el mismo aumento se observó en ausencia de ADN (véase la Figura 5.39A). Esta situación refleja que las nanopartículas de oro no están agregadas o muy próximas entre sí cuando están formando el complejo, ya que no se observó la característica banda SPR asociada a la agregación.²⁰

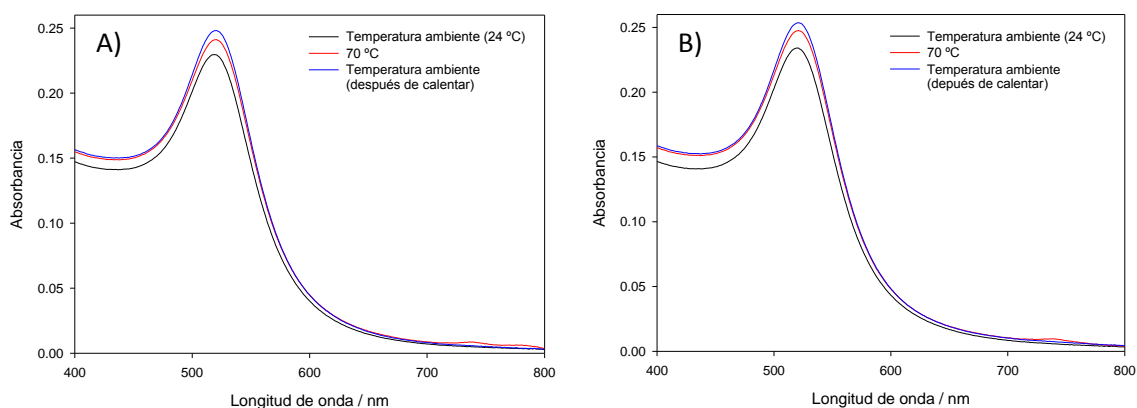


Figura 5.125. Espectros de absorción UV-vis de AuNPs en ausencia (A) y presencia (B) de ADN-CT a diferentes condiciones de temperatura: temperatura ambiente, 70 °C y temperatura ambiente después del proceso de calentamiento. $[\text{ADN-CT}] = 10^{-7} \text{ M}$, $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10} \text{ M}$.

Para comprobar los posibles cambios que estas interacciones pudieran provocar en la estructura secundaria del ADN, se analizaron los efectos de la temperatura en el ADN por espectroscopía de CD. La Figura 5.40A muestra los espectros de CD para las muestras a temperatura ambiente; la adición de AuNPs induce un ligero cambio conformacional en el ADN, reflejado en una disminución de la intensidad de la banda positiva. También aparece un punto isobéptico sobre 258 nm: esto es debido a las ya mencionadas compactaciones del ADN en presencia de nanopartículas cargadas negativamente. Sin embargo, este pequeño cambio conformacional no implica una apertura de la doble hélice causada por las nanopartículas; la banda negativa, relacionada con el grado de helicidad del ADN, no decrece en intensidad y el punto de cruce para el correspondiente ADN simple no cambia, desplazamientos que se producirían si se formase el ADN simple como se indicó en la sección 5.3.2.¹⁶⁶ Cuando la

muestra es calentada los cambios conformacionales en el ADN son incluso más pronunciados respecto al control, tanto en la banda positiva como en la negativa (véase Figura 5.40B). Las hebras de ADN se abren a 70 °C, y la adición de AuNPs trae consigo un desplazamiento del punto isobéptico a unos 270 nm. El máximo de la banda asociada a los apilamientos π entre las bases también muestra un claro desplazamiento a longitudes de ondas menores. Debido al protocolo de trabajo, donde la adición de AuNPs se realizó después de que el ADN haya sido calentado a alta temperatura, no debería haber impedimentos para que el ADN se abriera por formación de estructuras compactas.¹⁶² La Figura 5.40B, a 70 °C, corresponde con una situación intermedia del proceso que implicaría pasar de temperatura ambiente a 70 °C para luego ser enfriada la muestra. La mayor diferencia referida a cambios conformacionales se observa en la Figura 5.40C, espectros obtenidos a temperatura ambiente después del proceso de calentamiento. Para el sistema ADN/AuNPs, las intensidades de ambas bandas son menores a las que presenta el control; esta situación puede estar relacionada con la formación de los complejos observados por FM (véase Figura 5.36D). Por otro lado se comprobó que la tendencia de hibridación del ADN simple con sus hebras complementarias era diferente en ausencia y en presencia de AuNPs (compárese la Figura 5.41A con la 5.41B). A la vista de los resultados, este nuevo proceso de calentamiento ha permitido la formación de complejos ADN/AuNPs similares a las histonas, donde el ADN no pierde plenamente su formación.

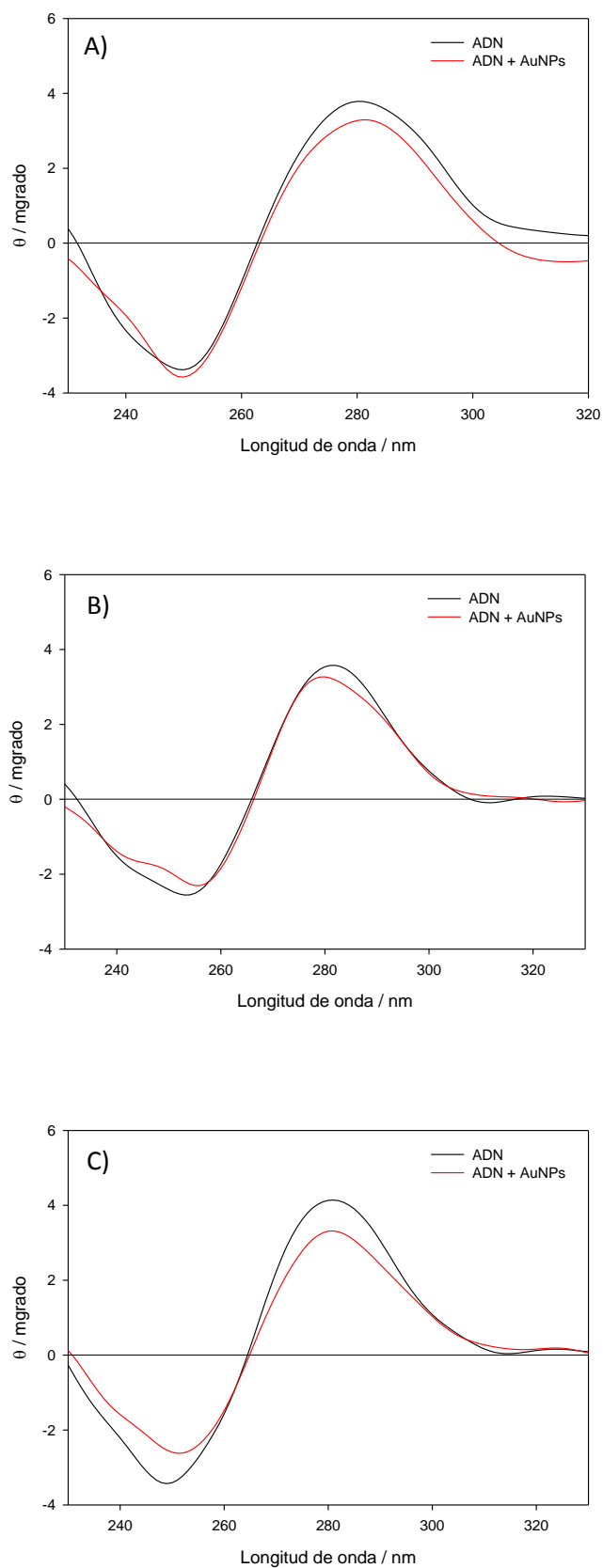


Figura 5.126. Espectros de dicroísmo circular de ADN-CT en ausencia y en presencia de AuNPs a diferentes condiciones térmicas: A) temperatura ambiente (sin ningún calentamiento); B) 70 °C; C) temperatura ambiente (después de calentar). $[\text{ADN}] = 10^{-7} \text{ M}$, $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10} \text{ M}$.

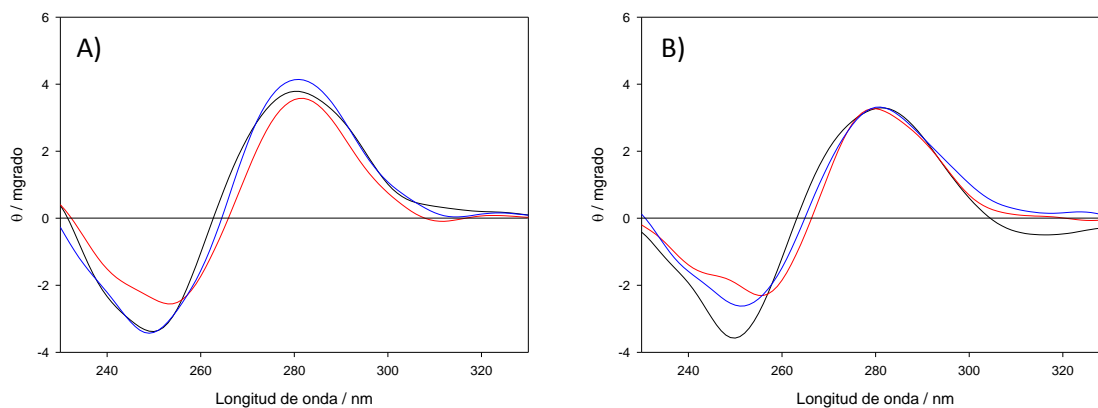


Figura 5.127. Espectro de ADN de *calf thymus* en tres condiciones de temperaturas: temperatura ambiente, sin calentamiento alguno (línea negra); 70 °C (línea roja); temperatura ambiente después de calentar (línea azul). A) En ausencia de AuNPs; B) en presencia de AuNPs, $[\text{AuNPs}] = 8 \times 10^{-10} \text{ M}$.

6. Conclusions

Chapter 3

- Gold nanoparticles have been synthesized with three different average sizes: 4.5 ± 0.9 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 510$ nm), 14.8 ± 1.8 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 520$ nm) and 27 ± 6 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 525$ nm). It has been demonstrated that the spectroscopic parameters of the SPR band cannot be predicted in the basis of Mie theory for nanoparticles smaller than 15 nm, with higher deviations being observed as the size decreases. The obtained results were remarkably close to the real values for nanoparticles greater than 25 nm, with an error under 5%
- Aggregation processes induced by an inert salt have been found to be strongly influenced by both ionic strength of the reaction medium and colloid concentration. As the size of the nanoparticle increases, the colloidal solution stability, in regards to salt-induced aggregation, diminishes.
- Primary alcohols' effect in the SPR band of 15.4 nm gold nanoparticles has been studied in depth. The addition of methanol or ethanol does not cause any color changes, with a slight 2 nm shift in the SPR band being found for the latter. On the other hand, more hydrophobic alcohols, such as 2-propanol or *tert*-butanol, are able to induce system aggregation with the consequent color changes.

Chapter 4

- The interaction between three DNA bases and gold nanoparticles (average size: 14.8 ± 1.8 nm) has been quantified by three different procedures: absorbance values, deconvolution of absorption spectra and colorimetric parameters. The affinity sequence has been established as: cytosine > adenine >> thymine.
- The influence of the structural complexity of DNA monomers, nucleotides and nucleosides, in AuNPs aggregation processes has been studied. The presence of sugar moieties in nucleosides influences AuNPs aggregation, causing small agglomerates to form. In the presence of nucleotides, no aggregation is observed at all, and the resulting

nucleotide/AuNPs complexes present increased stability against salt-induced aggregation when compared to the unconjugated nanoparticles.

- The role of pH in the interactions of DNA bases with nanoparticles has been explored. It has been found that, in alkaline conditions, the generation of negative charges in the biomolecule greatly diminishes its affinity for anionic nanoparticles. In acidic conditions, the biomolecules bear positive charges that favor their interaction with the nanoclusters.

Chapter 5

- Operation conditions for the development of a colorimetric detection method for polymeric DNA has been optimized, without discerning between single or double stranded polynucleotides. The best results are obtained by adding inert salts to DNA-AuNPs mixtures containing colloids of intermediate size (14.8 ± 1.8 nm).
- The origin of the protective of DNA over AuNPs has been studied, and found to be due to the acquired instability of the DNA strands. This is in turn due to structural changes induced by both DNA-AuNPs electrostatic repulsions and by crowded environments. Owing to those effects, the presence of anionic nanoparticles causes DNA strands to bend and adopt a slightly unstable disposition, which is reduced by cations being held close to the polymer surface.
- A procedure for the formation of anionic AuNPs complexes with giant DNA has been described. In contrast to other methods, which require functionalization of the particles with either positively charged groups or specific DNA probes, no modification of the nanocluster surface has been employed in our case. The biopolymer has been found to compact around nanoparticle clusters, but only partial loss of its native conformation was observed.

7. Conclusiones

Capítulo 3

- Se han sintetizado nanopartículas de oro con tres tamaños medio diferentes: 4.5 ± 0.9 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 510$ nm), 14.8 ± 1.8 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 520$ nm) y 27 ± 6 nm ($\lambda_{\text{SPR}} = 525$ nm). Se ha demostrado que los parámetros espectroscópicos de la banda SPR no se predicen bien a partir de la teoría de Mie para nanopartículas con un diámetro inferior a 15 nm, obteniéndose errores mayores conforme menor es el tamaño. Sin embargo los resultados fueron bastante próximos en la predicción de partículas con tamaños por encima de los 25 nm, con errores inferiores al 5%.
- Se han estudiado los factores que repercuten en el proceso de agregación inducido por una sal inerte y se ha comprobado que está fuertemente influenciado por la fuerza iónica del medio y por la propia concentración de coloide. También se ha demostrado que conforme aumenta el tamaño de la nanopartícula la estabilidad de la disolución coloidal frente a la agregación inducida por sal decrece.
- Se ha determinado el efecto de la adición de alcoholes primarios en la banda SPR de las nanopartículas de oro de 15.4 nm. La adición de metanol o etanol no provocó cambio colorimétrico en soluciones coloidales de AuNPs, produciéndose un desplazamiento de 2 nm en el segundo codisolvente. Por otra parte, alcoholes más hidrofóbicos como 2-propanol o *terc*-butanol provocan la agregación del sistema coloidal con el consiguiente cambio colorimétrico de la disolución coloidal.

Capítulo 4

- Se ha cuantificado la interacción entre tres bases del ADN y nanopartículas de oro de tamaño intermedio (14.8 ± 1.8 nm) a través de tres procedimientos diferentes: valores de absorbancia, deconvolución de los espectros de absorción y parámetros colorimétricos. Se ha establecido la siguiente secuencia de afinidad: citosina > adenina >> timina.
- Se ha estudiado la influencia de la complejidad estructural de la unidad monómerica del ADN en la agregación de AuNPs. Se ha demostrado que la presencia del carbohidrato

conduce a aglomerados de menor tamaño, mientras que las nanopartículas son estables en presencia de nucleótidos. Se ha comprobado que es necesario añadir un exceso de sal para provocar la agregación de complejos nucleótido/AuNPs.

- Se ha demostrado que el pH del medio juega un papel clave en la interacción entre las bases y las nanopartículas. En condiciones alcalinas la generación de cargas negativas en la biomolécula neutraliza la afinidad por las nanopartículas aniónicas, mientras en condiciones ácidas la formación de cargas positivas favorece la aproximación de la biomolécula al nanoclúster.

Capítulo 5

- Se han establecido las condiciones óptimas para el desarrollo de un método de detección colorimétrica de ADN polimérico, sin discernir entre polinucleótidos de cadena simple o doble. Se ha comprobado que los mejores rendimientos se obtienen adicionando el electrolito inerte a la mezcla ADN-AuNPs para tamaños intermedios del coloide (14.8 ± 1.8 nm).
- Se ha estudiado en profundidad el origen de este efecto protector y se ha demostrado que es el resultado de la inestabilidad adquirida por las hebras de ADN al modificarse su estructura a causa de repulsiones electrostáticas y de entornos saturados. Se propone que la presencia de nanopartículas aniónicas provocan que las hebras del biopolímero se curven, adquiriendo una inestabilidad que ha de ser reducida aproximando cationes a su superficie.
- Se ha desarrollado un procedimiento para formar complejos de nanopartículas aniónicas de oro con ADN gigante sin necesidad de modificar la superficie del nanoclúster funcionalizándolo con ligandos que interaccionen específicamente con el biopolímero o dotándolo de carga positiva para facilitar la interacción con los grupos fosfato. Se ha comprobado que el biopolímero se compacta alrededor de varias nanopartículas, aunque no se produce la pérdida total de su conformación nativa.

Referencias Bibliográficas

- 1 T. Okubo, *Colloidal Organization*, Elsevier, United States, 2015.
- 2 A. Moores and F. Goettmann, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 1121–1132.
- 3 M. Reibold, P. Paufler, A. A. Levin, W. Kochmann, N. Pätzke and D. C. Meyer, *Nature*, 2006, **444**, 286–286.
- 4 L. L. Schramm, *Dictionary of Nanotechnology, Colloid and Interface Science*, Wiley-VCH, Weinheim, FRG, 2008.
- 5 G. Schmid, Ed., *Nanoparticles: From Theory to Application*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2003.
- 6 M. Quinten, *Optical Properties of Nanoparticle Systems: Mie and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.
- 7 M. C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 293–346.
- 8 K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao and G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 668–677.
- 9 E. Petryayeva and U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **706**, 8–24.
- 10 J. L. West and N. J. Halas, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 215–217.
- 11 X. Lu, M. Rycenga, S. E. Skrabalak, B. Wiley and Y. Xia, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2009, **60**, 167–192.
- 12 M. Faraday, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1857, **147**, 145–181.
- 13 D. Ghosh and N. Chattopadhyay, *Opt. Photonics J.*, 2013, **3**, 18–26.
- 14 X. Liu, M. Atwater, J. Wang and Q. Huo, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2007, **58**, 3–7.
- 15 U. Kreibig and M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer, Berlin, 1995.

- 16 P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed and M. a El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 7238–48.
- 17 S. Underwood and P. Mulvaney, *Langmuir*, 1994, **10**, 3427–3430.
- 18 A. Henglein, *Chem. Mater.*, 1998, **10**, 444–450.
- 19 V. V. Vodnik and jovan M. Nedeljkovi, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2000, **65**, 195–200.
- 20 S. K. Ghosh and T. Pal, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4797–862.
- 21 S. Basu, S. Panigrahi, S. Praharaj, S. Kumar Ghosh, S. Pande, S. Jana and T. Pal, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 1333–1339.
- 22 W. Zhao, M. A. Brook and Y. Li, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 2363–2371.
- 23 G. Mie, *Ann. Phys.*, 1908, **330**, 377–445.
- 24 R. Gans, *Ann. Phys.*, 1912, **342**, 881–900.
- 25 R. Gans, *Ann. Phys.*, 1915, **352**, 270–284.
- 26 J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán and P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 1870–1901.
- 27 P. Zhao, N. Li and D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 638–665.
- 28 C. Gentilini, F. Evangelista, P. Rudolf, P. Franchi, M. Lucarini and L. Pasquato, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15678–15682.
- 29 V. Chechik and R. M. Crooks, *Langmuir*, 1999, **15**, 6364–6369.
- 30 C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff, *Nature*, 1996, 382, 607–609.
- 31 A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez and P. G. Schultz, *Nature*, 1996, 382, 609–11.
- 32 J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, USA, Third Edit., 2011.
- 33 D. P. O’Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne and J. L. West, *Cancer Lett.*, 2004, **209**, 171–176.
- 34 C. Ayala-Orozco, C. Urban, M. W. Knight, A. S. Urban, O. Neumann, S. W. Bishnoi, S.

- Mukherjee, A. M. Goodman, H. Charron, T. Mitchell, M. Shea, R. Roy, S. Nanda, R. Schiff, N. J. Halas and A. Joshi, *ACS Nano*, 2014, **8**, 6372–6381.
- 35 O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4743–4768.
- 36 X. Yang, M. Yang, B. Pang, M. Vara and Y. Xia, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 10410–10488.
- 37 S. Jain, D. G. Hirst and J. M. O’Sullivan, *Br. J. Radiol.*, 2012, **85**, 101–113.
- 38 I. Capek, *DNA Engineered Noble Metal Nanoparticles*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2015.
- 39 Z. Osváth, A. Deák, K. Kertész, G. Molnár, G. Vértesy, M.-K. Chuang, S.-W. Lin, F.-C. Chen, C.-W. Chu, C.-S. Hsu, C. Wang, F. Ye, H. Wu, Y. Qian, R. Muszynski, B. Seger, P. V Kamat, J. Gong, T. Zhou, D. Song, L. Zhang, W. Hong, H. Bai, Y. Xu, Z. Yao, Z. Gu and G. Shi, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5503–5509.
- 40 G. Sener, L. Uzun and A. Denizli, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 514–520.
- 41 K. M. Song, M. Cho, H. Jo, K. Min, S. H. Jeon, T. Kim, M. S. Han, J. K. Ku and C. Ban, *Anal. Biochem.*, 2011, **415**, 175–181.
- 42 J. Liu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 10485–10496.
- 43 V. A. Bloomfield, D. M. Crothers and I. Tinoco, *Nucleic acids: structures, properties, and functions*, University Science Books, 2000.
- 44 G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes and D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Royal Society of Chemistry, Third., 2006.
- 45 J. Sambrook, E. F. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 46 W. B. Knighton, G. O. Giskaas and P. R. Callls, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 49–55.
- 47 S. Udenfriend and P. Zaltzman, *Anal. Biochem.*, 1962, **3**, 49–59.
- 48 K. M. Koo, A. A. I. Sina, L. G. Carrascosa, M. J. A. Shiddiky and M. Trau, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 7042–7054.
- 49 J. Yang, B.-K. Pong, J. Y. Lee and H.-P. Too, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 824–830.
- 50 H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies and A. N. Glazer, *Nucleic*, 1992, **20**, 2803–2812.

- 51 K. Minagawa, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, A. R. Khokhlov and M. Doi, *Biopolymers*, 1994, **34**, 555–558.
- 52 R. S. Dias and B. Lindman, *DNA Interactions with Polymers and Surfactants*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2008.
- 53 D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger: principles of biochemistry*, Macmillan learning, Sixth edit., 2012.
- 54 N. L. Goddard, G. Bonnet, O. Krichevsky and A. Libchaber, *Phys. Rev. Lett.*, 2000, **85**, 2400–2403.
- 55 J. B. Mills, E. Vacano and P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.*, 1999, **285**, 245–257.
- 56 M. C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T. M. Lohman and T. Ha, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 2530–2537.
- 57 J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature*, 1953, 737–738.
- 58 T. Ohshima, *DNA Conformation and Transcription*, Springer US, Boston, MA, 2005.
- 59 A. B. Steel, T. M. Herne and M. J. Tarlov, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4670–4677.
- 60 J. J. Storhoff, R. Elghanian, C. a. Mirkin and R. L. Letsinger, *Langmuir*, 2002, **18**, 6666–6670.
- 61 L. M. Demers, C. a. Mirkin, R. C. Mucic, R. a. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian and G. Viswanadham, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5535–5541.
- 62 S. Piana and A. Bilic, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 23467–23471.
- 63 K. F. Domke, D. Zhang and B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 6708–6709.
- 64 T. Doneux and L. Fojt, *Chemphyschem*, 2009, **10**, 1649–55.
- 65 A. Maleki, S. Alavi and B. Najafi, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 22484–22494.
- 66 D. Bogdan and C. Morari, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 7351–7359.
- 67 C. Otto, F. F. M. de Mul, A. Huizinga and J. Greve, *J. Phys. Chem.*, 1998, **92**, 1239–1244.
- 68 B. Giese and D. Mcnaughton, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 101–112.
- 69 N. H. Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2002, **23**, 1790–1800.

- 70 B. Pergolese, A. Bonifacio and A. Bigotto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 3610–3613.
- 71 A. Gourishankar, S. Shukla, K. N. Ganesh and M. Sastry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 13186–13187.
- 72 S. Basu, S. Jana, S. Pande and T. Pal, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **321**, 288–293.
- 73 H. Jo and C. Ban, *Exp. Mol. Med.*, 2016, **48**, e230.
- 74 B. Lang, *J. Chem. Thermodyn.*, 2010, **42**, 1435–1440.
- 75 P. Sandström, M. Boncheva and B. Akerman, *Langmuir*, 2003, **19**, 7537–7543.
- 76 X. Zhang, M. R. Servos and J. Liu, *Langmuir*, 2012, **28**, 3896–3902.
- 77 H. Li and L. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 14036–14039.
- 78 H. Li and L. J. Rothberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10958–10961.
- 79 L. Sun, Z. Zhang, S. Wang, J. Zhang, H. Li, L. Ren, J. Weng and Q. Zhang, *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, **4**, 216–220.
- 80 E. M. Nelson and L. J. Rothberg, *Langmuir*, 2011, **27**, 1770–1777.
- 81 K. A. Brown, S. Park and K. Hamad-Schifferli, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 7517–7521.
- 82 D. J. Maxwell, J. R. Taylor and S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9606–9612.
- 83 W. Lu, L. Wang, J. Li, Y. Zhao, Z. Zhou, J. Shi, X. Zuo and D. Pan, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 1–9.
- 84 L. A. Gearheart, H. J. Ploehn and C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 12609–12615.
- 85 J. Yang, J. Y. Lee, H.-P. Too, G.-M. Chow and L. M. Gan, *Chem. Phys.*, 2006, **323**, 304–312.
- 86 G. Han, C. T. Martin and V. M. Rotello, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2006, **67**, 78–82.
- 87 C. M. Goodman, N. S. Chari, G. Han, R. Hong, P. Ghosh and V. M. Rotello, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2006, **67**, 297–304.
- 88 J. G. Railsback, A. Singh, R. C. Pearce, T. E. McKnight, R. Collazo, Z. Sitar, Y. G. Yingling and A. V. Melechko, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 4261–4265.

- 89 D. Peled, R. Naaman and S. S. Daube, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 8581–8584.
- 90 F. Li, H. Zhang, B. Dever, X.-F. Li and X. C. Le, *Bioconjug. Chem.*, 2013, **24**, 1790–1797.
- 91 L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian and G. Viswanadham, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5535–5541.
- 92 B. Liu, E. Y. Kelly and J. Liu, *Langmuir*, 2014, **30**, 13228–13234.
- 93 S. Park, K. A. Brown and K. Hamad-Schifferli, *Nano Lett.*, 2004, **4**, 1925–1929.
- 94 M. R. Jones, K. D. Osberg, R. J. Macfarlane, M. R. Langille and C. A. Mirkin, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 3736–3827.
- 95 L. I. Lopatina, E. A. Karpushkin, A. Zinchenko and V. G. Sergeyev, *Mendeleev Commun.*, 2016, **26**, 291–292.
- 96 O. Harnack, W. E. Ford, A. Yasuda and J. M. Wessels, *Nano Lett.*, 2002, **2**, 919–923.
- 97 R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12674–12675.
- 98 S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz and C. A. Mirkin, *Nature*, 2008, **451**, 553–556.
- 99 J.-H. Oh and J.-S. Lee, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 7364–7370.
- 100 I. A. Trantakis, S. Bolisetty, R. Mezzenga and S. J. Sturla, *Langmuir*, 2013, **29**, 10824–10830.
- 101 D. a C. Thomson, E. H. L. Tee, N. T. D. Tran, M. J. Monteiro and M. a Cooper, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1981–1989.
- 102 B. J. Sanghavi, J. A. Moore, J. L. Chávez, J. A. Hagen, N. Kelley-Loughnane, C. F. Chou and N. S. Swami, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **78**, 244–252.
- 103 C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou and C. A. Mirkin, *Clin. Chim. Acta*, 2006, **363**, 120–126.
- 104 N. Ding, H. Zhao, W. Peng, Y. He, Y. Zhou, L. Yuan and Y. Zhang, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2012, **395**, 161–167.
- 105 I. I. S. Lim, S. Lim, W. Ip, E. Crew, P. N. Njoki, D. Mott, C. J. Zhong, Y. Pan and S.

- Zhou, *Langmuir*, 2007, **23**, 826–833.
- 106 Y. Huo, L. Qi, X. Lv, T. Lai, J. Zhang and Z. Zhang, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **78**, 315–320.
- 107 R. Prado-Gotor and P. M. Castillo, *P201400372*, 2015.
- 108 R. Prado-Gotor, *P201300722*, 2014.
- 109 J. Zhang, H. Nie, Z. Wu, Z. Yang, L. Zhang, X. Xu and S. Huang, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 1178–1185.
- 110 C. L. Kuong, W. Y. Chen and Y. C. Chen, *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**, 2091–2099.
- 111 S. Kubo, A. Diaz, Y. Tang, T. S. Mayer, I. C. Khoo and T. E. Mallouk, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 3418–23.
- 112 P. B. Johnson and R. W. Christy, *Phys. Rev. B*, 1972, **8**, 4370–4379.
- 113 <http://www.iapws.org/relguide/rindex.pdf>.
- 114 C.-S. Yang, M.-S. Shih and F.-Y. Chang, *New J. Chem.*, 2006, **30**, 729.
- 115 M. Wojdyr, *J. Appl. Crystallogr.*, 2010, **43**, 1126–1128.
- 116 J. J. Olivero and R. L. Longbothum, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, 1977, **17**, 233–236.
- 117 A. Jimenez-Ruiz, Universidad de Sevilla, 2016.
- 118 R. W. G. Hunt and M. R. Pointer, *Measuring Colour*, John Wiley and Sons, Reino Unido, 2011.
- 119 D. B. Judd, *Contributions to Color Science*, National Bureau of Standards, New York, 1979.
- 120 OIV, *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, France, 2014.
- 121 J. Turkevich, P. C. Stevenson and J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, **11**, 55–75.
- 122 I. Ojea-Jiménez, N. Bastús and V. Puentes, *J. Phys. Chem.*, 2011, **115**, 15752–15757.
- 123 M. Doyen, K. Bartik and G. Bruylants, *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, **399**, 1–5.
- 124 X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 13939–13948.

- 125 T. Kim, C. H. Lee, S. W. Joo and K. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, 2008, **318**, 238–243.
- 126 N. M. Kovalchuk and V. M. Starov, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2012, **179–182**, 99–106.
- 127 K. A. Huynh and K. L. Chen, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 5564–5571.
- 128 X. Li, J. J. Lenhart and H. W. Walker, *Langmuir*, 2012, **28**, 1095–1104.
- 129 G. Wang and W. Sun, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 20901–20905.
- 130 R. Balasubramanian, B. Kim, S. L. Tripp, X. Wang, M. Lieberman and A. Wei, *Langmuir*, 2002, **18**, 3676–3681.
- 131 J. M. McMahon and S. R. Emory, *Phase Transf. Large Gold Nanoparticles to Org. Solvents with Increased Stab.*, 2007, **23**, 1414–1418.
- 132 A. Dutta, S. Das, A. Paul and A. Chattopadhyay, *J. Nanoparticle Res.*, 2015, **17**, 260.
- 133 X. Wang, Y. Xu, X. Xu, K. Hu, M. Xiang, L. Li, F. Liu and N. Li, *Talanta*, 2010, **82**, 693–697.
- 134 A. Low and V. Bansal, *Biomed. Imaging Interv. J.*, 2010, **6**, e9.
- 135 S. L. Cumberland and G. F. Strouse, *Langmuir*, 2002, **18**, 269–276.
- 136 G. Frens, *Nat. Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20–22.
- 137 N. R. Jana, N. R. Jana, L. Gearheart, L. Gearheart, C. J. Murphy and C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 4065–4067.
- 138 J. Liao, Y. Zhang, W. Yu, L. Xu, C. Ge, J. Liu and N. Gu, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2003, **223**, 177–183.
- 139 J. T. Rubino and W. S. Berryhill, *J. Pharm. Sci.*, 1986, **75**, 182–186.
- 140 D. Zhu, P. Song, J. Shen, S. Su, J. Chao, A. Aldalbahi, Z. Zhou, S. Song, C. Fan, X. Zuo, Y. Tian, L. Wang and H. Pei, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 4949–4954.
- 141 W. Zhao, W. Chiuman, J. C. F. Lam, M. A. Brook and Y. Li, *Chem. Commun.*, 2007, **8**, 3729.
- 142 M. Ostblom, B. Liedberg, L. M. Demers and C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 15150–15160.
- 143 L. M. Demers, M. Ostblom, H. Zhang, N.-H. N.-H. Jang, B. Liedberg and C. A. Mirkin,

- J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 11248–11249.
- 144 A. Revzin, Ed., *Footprinting of nucleic acid-protein complexes*, Academic Press, Inc., 1993.
- 145 R. Prado-Gotor, E. Grueso, P. Perez-Tejeda, A. Jimenez-Ruiz and J. M. Carnerero, *Soft Matter*, 2014, **10**, 8482–8.
- 146 H. A. Benesi and J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 2703–2707.
- 147 H. DeVoe and S. P. Wasik, *J. Solution Chem.*, 1984, **13**, 51–60.
- 148 M. Nic, J. Jirat, B. Kosata, A. Jenkins and A. McNaught, Eds., *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, IUPAC, Research Triangle Park, NC, 2009, vol. 1077.
- 149 S. P. Boulos, T. A. Davis, J. A. Yang, S. E. Lohse, A. M. Alkilany, L. A. Holland and C. J. Murphy, *Langmuir*, 2013, **29**, 14984–14996.
- 150 S. Zolghadri, A. A. Saboury, A. Golestani, A. Divsalar, S. Rezaei-Zarchi and A. A. Moosavi-Movahedi, *J. Nanoparticle Res.*, 2009, **11**, 1751–1758.
- 151 J. A. Yang, B. J. Johnson, S. Wu, W. S. Woods, J. M. George and C. J. Murphy, *Langmuir*, 2013, **29**, 4603–4615.
- 152 E. Dulkeith, a C. Morteani, T. Niedereichholz, T. a Klar, J. Feldmann, S. a Levi, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, M. Möller and D. I. Gittins, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **89**, 203002.
- 153 Gordon Roberts and L.-Y. Lian, *Protein NMR Spectroscopy: Practical Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, Second edi., 2011.
- 154 C. A. Lepre, J. M. Moore and J. W. Peng, 2004, **104**, 3641–3676.
- 155 A. Viegas, J. Manso, F. L. Nobrega and E. J. Cabrita, *J. Chem. Educ*, 2011, **88**, 990–994.
- 156 A. Antanasijevic, B. Ramirez and M. Caffrey, *J. Biomol. NMR*, 2014, **60**, 37–44.
- 157 N. Li, L. Yu and J. Zou, in *9th IEEE International Conference on Nano/molecular Medicine and Engineering*, 2015, pp. 43–46.
- 158 Sigma-Aldrich, *Ult. entrada 17/04/2017*.
- 159 R. M. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot and K. M. Jones, *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, Oxford, Third Edit., 1986.

- 160 D. Miyoshi and N. Sugimoto, *Biochimie*, 2008, **90**, 1040–1051.
- 161 A. Zinchenko and K. Yoshikawa, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2015, **20**, 60–65.
- 162 H. Kamata, A. Zinchenko and S. Murata, *Colloid Polym. Sci.*, 2011, **289**, 1329–1335.
- 163 A. Zinchenko, K. Tsumoto, S. Murata and K. Yoshikawa, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 1256–1262.
- 164 H. Chang and S.-Q. Sun, *Chinese Phys. B*, 2014, **23**, 88102.
- 165 B. Nordén and F. Tjerneld, *Biopolymers*, 1982, **21**, 1713–1734.
- 166 M. Rosa, R. Dias, M. da Graça Miguel and B. Lindman, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2164–2171.
- 167 I. Horcas, R. Fernández, J. M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero and A. M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.*, 2007, **78**.
- 168 C. Tongu, T. Kenmotsu, Y. Yoshikawa, A. Zinchenko, N. Chen and K. Yoshikawa, *J. Chem. Phys.*, 2016, **144**.
- 169 S. Rho, S. J. Kim, S. C. Lee, J. H. Chang, H. G. Kang and J. Choi, *Curr. Appl. Phys.*, 2009, **9**, 534–537.
- 170 https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf, 2011.
- 171 E. A. Van Doren, P.-J. R. De Temmerman, M. A. D. Francisco and J. Mast, *J. Nanobiotechnology*, 2011, **9**, 17.
- 172 N. Gibson, H. Rauscher and G. Roebben, *J. Nanoparticle Res.*, 2016, **18**, 1–8.
- 173 A. J. Lecloux, *J. Nanoparticle Res.*, 2015, **17**, 1–18.
- 174 W. Wohlleben, J. Mielke, A. Bianchin, A. Ghanem, H. Freiburger, H. Rauscher, M. Gemeinert and V.-D. Hodoroba, *J. Nanoparticle Res.*, 2017, **19**, 61.
- 175 W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer New York, New York, NY, 1984.
- 176 J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.*, 1962, **5**, 109–118.
- 177 D. Y. Lando, A. S. Fridman, C. L. Chang, I. E. Grigoryan, E. N. Galyuk, O. N. Murashko, C. C. Chen and C. K. Hu, *Anal. Biochem.*, 2015, **479**, 28–36.

- 178 J. Flinders and T. Dieckmann, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2006, **48**, 137–159.
- 179 J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., Second edi., 2010.
- 180 M. Cardenas, J. Barauskas, K. Schillen, J. L. Brennan, M. Brust and T. Nylander, *Langmuir*, 2006, **22**, 3294–3299.
- 181 E. Grueso, P. Perez-Tejeda, R. Prado-Gotor and C. Cerrillos, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 4416–4428.
- 182 R. Prado-Gotor and E. Grueso, *Sci. World J.*, 2014, **2014**, 1–9.
- 183 R. Prado-Gotor and E. Grueso, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 1479–1489.
- 184 S. J. Leach and H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 4790–4792.
- 185 V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina and A. I. Poletayev, *Biopolymers*, 1973, **12**, 89–110.
- 186 G. Cohen and H. Eisenberg, *Biopolymers*, 1969, **8**, 45–55.
- 187 K. Yoshikawa, S. Hirota, N. Makita and Y. Yoshikawa, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 1763–1766.
- 188 N. Makita, M. Ullner and K. Yoshikawa, *Macromolecules*, 2006, **39**, 6200–6206.
- 189 J. A. Nash, A. Singh, N. K. Li and Y. G. Yingling, *ACS Nano*, 2015, **9**, 12374–12382.
- 190 R. D. Kornberg, *Science (80-.)*, 1974, **184**, 868–871.
- 191 C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz and V. M. Rotello, *Bioconjug. Chem.*, 2004, **15**, 897–900.
- 192 A. a Zinchenko, F. Luckel and K. Yoshikawa, *Biophys. J.*, 2007, **92**, 1318–1325.
- 193 N. Chen, A. a Zinchenko, Y. Yamazaki, Y. Yoshikawa, S. Murata and K. Yoshikawa, *Soft Matter*, 2010, **6**, 2834.
- 194 J. Conroy, S. J. Byrne, Y. K. Gun'ko, Y. P. Rakovich, J. F. Donegan, A. Davies, D. Kelleher and Y. Volkov, *Small*, 2008, **4**, 2006–2015.
- 195 A. A. Zinchenko, T. Sakaue, S. Araki, K. Yoshikawa and D. Baigl, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 3019–3031.

Publicaciones, aportaciones a congresos y estancias

Publicaciones:

Prado-Gotor, R.; Jimenez-Ruiz, A.; Carnerero, J. M.; Grueso, E.; Villa, I. CIELab chromaticity evolution to measure the binding free energy of non-colored biomolecules to gold nanoparticles. *RSC Advances*. **2015**. 5. 85039-85045. 10.1039/c5ra15119h.

Carnerero, J. M.; Castillo, P.; Jimenez-Ruiz, A.; Prado, R. Direct effect of tetrahedral alcohol species on the SPB of gold colloids: a deconvolution study. *Journal of Nanoparticle Research*. **2015**. 17. Núm. 205. 10.1007/s11051-015-3011-8.

Carnerero, J. M.; Jimenez-Ruiz, A.; Castillo, P.; Prado-Gotor, R. Review: Covalent and non-covalent DNA-Gold Nanoparticles interactions: New avenues of research. *Chemphyschem*. **2017**. 18. 17-33. 10.1002/cphc.201601077.

Carnerero, J. M.; Jimenez-Ruiz, A.; Grueso, E.; Prado-Gotor, R. Understanding and Improving Aggregated Gold Nanoparticles/dsDNA Interactions by Molecular Spectroscopy and Deconvolution Methods. *PCCP. Physical Chemistry Chemical Physics*. **2017**. Aceptado. 10.1039/C7CP02219K.

Carnerero, J. M.; Sánchez-Coronilla, A.; Martín, E. I.; Jimenez-Ruiz, A.; Prado-Gotor, R. Quantification of Nucleobases/Gold Nanoparticles Interactions: Pyramidal sp^3 Hybridization of Adenine and Binding Free Energy Determination. Enviado a *PCCP*.

Aportaciones a congresos:

Carnerero, J. M.; Prado-Gotor, R.; Jimenez-Ruiz, A.; Grueso, E. Influencia de Alcoholes Tetraédricos en la SPB de Oro Coloidal: una Alternativa para Detectar DNA. Comunicación en

congreso. VII Jornadas de Jóvenes Investigadores en Física Atómica y Molecular. Jaén, España. **2015**.

Carnerero, J. M.; Prado-Gotor, R.; Grueso, E.; Jimenez-Ruiz, A.; Villa, I. Colorimetric detection of DNA by anionic gold nanoparticles. Comunicación en congreso. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores en Física Atómica y Molecular. Valladolid, España. **2016**.

Carnerero, J. M.; Prado-Gotor, R.; Betti, M.; Jimenez-Ruiz, A. Can only ssDNA be detected by anionic gold nanoparticles? Comunicación en congreso. First Nano/Bioscience International Symposium. Doshisha University, Kyotanabe Campus, Kyoto (Japón). **2016**.

Carnerero, J. M.; Prado-Gotor, R.; Jimenez-Ruiz, A.; Villa, I. Quantification of adenine and thymine interactions with gold nanoparticles. Póster en Congreso. IX Jornadas de Jóvenes Investigadores en Física Atómica y Molecular. Facultad de Química, Sevilla. **2017**.

Estancias:

School of Pharmacy en University of East Anglia (Reino Unido), con el Dr. Jesus Angulo. Título del proyecto: “NMR spectroscopy to study the interactions of DNA with gold nanoparticles”. Período: 13/04/2015 a 30/06/2015.

Faculty of Life and Medical Sciences en Doshisha University (Japón), con el Prof. Kenichi Yoshikawa. Título del proyecto: “DNA-nanoparticles interaction with the aid of experimental methodology of single DNA measurement”. Período: 06/09/2016 a 22/12/2016.

Anexo 1: Cálculo del número de bases por nanopartículas participantes en la adsorción

En el presente anexo se discuten los dos posibles procedimientos empleados para la determinación del número de moléculas que se adsorben a la superficie de la AuNP (n). El primero es a partir de la propia tendencia que muestra el grado de agregación con la concentración de nucleobase; dicho sistema implicaría tomar la concentración de ligando a partir de la cual la señal permanece invariable y dividirla por el número de AuNPs presentes en el medio. En el caso de la adenina (véase la Figura A.1) dicha saturación de la señal se produce cuando $[\text{adenina}] > 8 \times 10^{-7} \text{ M}$ para $[\text{AuNPs}] = 3.0 \times 10^{-10} \text{ M}$:

$$n = \frac{[\text{adenina}]}{[\text{AuNPs}]} = \frac{8 \cdot 10^{-7} \text{ M}}{3.0 \cdot 10^{-10} \text{ M}} = 2666 \text{ moléculas adenina/AuNP}$$

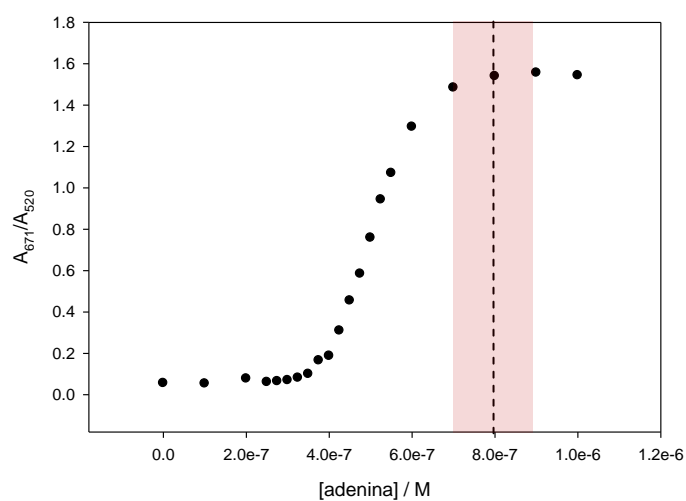


Figura A.1. Variación de la relación A_{671}/A_{520} con la concentración de adenina. La línea discontinua marca el punto aproximado en el que se produce la saturación del sistema. La zona roja indica el error en la selección del punto.

En el caso de la timina y citosina (véase Figura A.2), se obtuvo un valor de 43333 moléculas de timina/AuNP y de 1500 moléculas de citosina/AuNP (véase Tabla A.1).

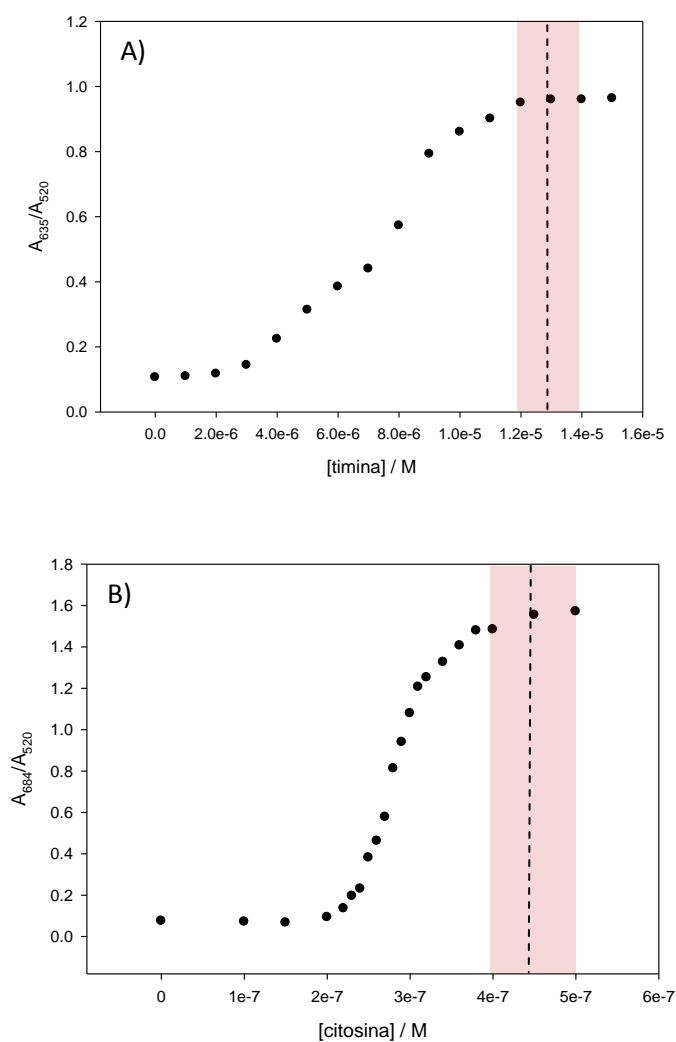


Figura A.2. A) Variación de la relación A_{635}/A_{520} con la concentración de timina. B) Variación de la relación A_{684}/A_{520} con la concentración de citosina. La línea discontinua marca el punto aproximado en el que se produce la saturación del sistema. La zona roja indica el error en la selección del punto.

Tabla A.1. Número de moléculas adsorbidas en la superficie de una AuNP en las distintas series que se realizaron. Para realizar el cálculo se tomó el primer punto experimental válido de la zona de saturación.

	Adenina	Timina	Citosina
Serie 1	2333 A/AuNP	36667 T/AuNP	1267 C/AuNP
Serie 2	2667 A/AuNP	43333 T/AuNP	1333 C/AuNP
Serie 3	2333 A/AuNP	66667 T/AuNP	1500 C/AuNP

Este método presenta un gran inconveniente: la selección del punto de saturación. Para obtener resultados precisos es necesario tener los suficientes puntos en la zona de saturación como para poderlo definir con exactitud. En la Figura A.1 y A.2 se muestra una zona roja que indica un posible rango en el que podría estar el punto de saturación. La zona roja como **mínimo** comprenderá los dos puntos experimentales adyacentes del seleccionado: es más, en la Figura A.2A sería más que discutible si el punto escogido es el correcto, ya que en la timina, el anterior al escogido ($[timina]=1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) también se podría considerar como el punto donde comienza la saturación; y si nos centráramos en la citosina se podría discutir incluso la necesidad de intercalar algún punto en el rango $4.0 \times 10^{-7} - 4.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ para ver si la saturación se alcanza antes del punto escogido. Esta arbitrariedad en la selección de un punto tan crítico hace que dicho método sea poco adecuado. Por ello es más correcta la obtención por representación de $\Delta A/[AuNPs]$ frente al ratio $[base]/[AuNPs]$. Se obtiene un gráfico donde la señal varía hasta que se produzca la saturación, a partir de la cual la señal será constante. La intersección de las rectas que se obtienen de sendas tendencias proporciona de forma directa n (véase la Figura A.3).

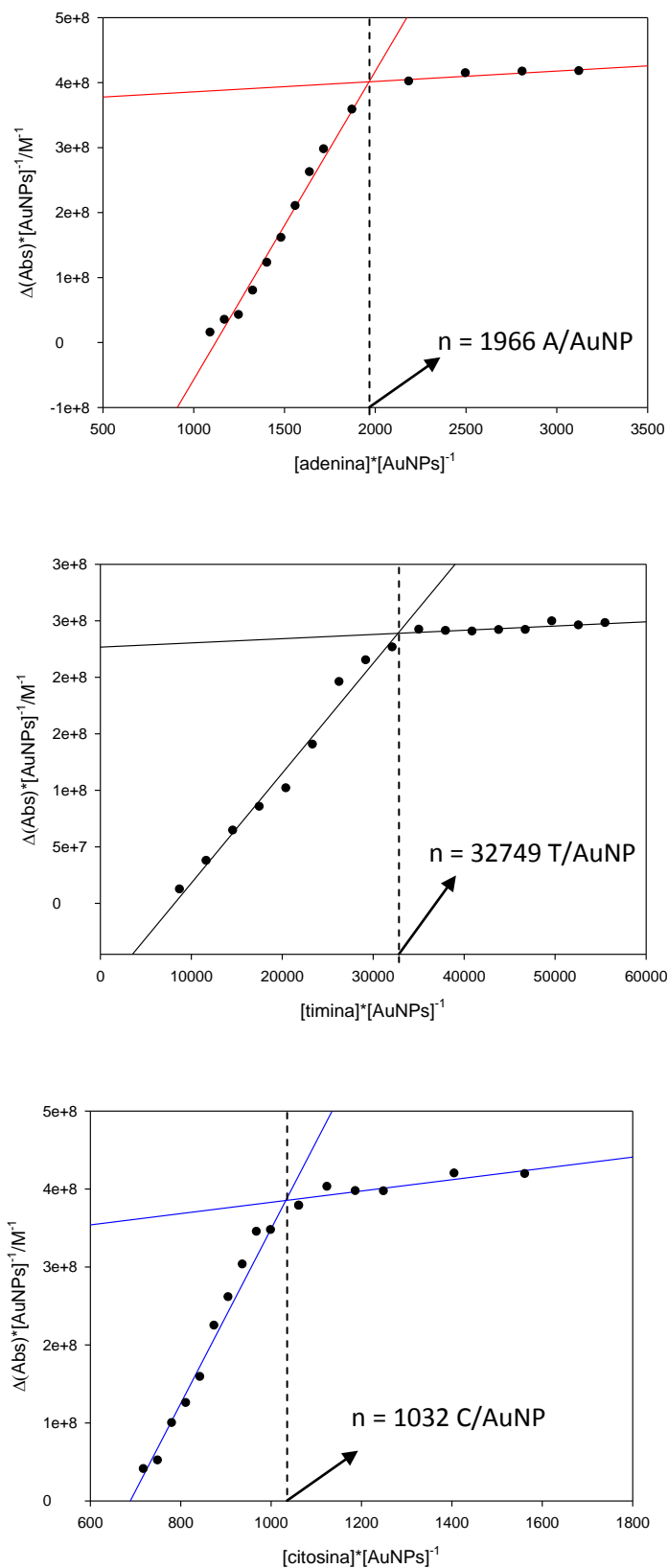


Figura A.3. A) Determinación de moléculas de adenina adsorbidas a la superficie de una AuNP. B) Determinación de moléculas de timina adsorbidas a la superficie de una AuNP. C) Determinación de moléculas de citosina adsorbidas a la superficie de una AuNP.

Los resultados obtenidos por este método se muestran en la Tabla A.2, donde también se encuentran los datos de la Tabla A.1 (para facilitar la comparativa).

Tabla A.2. Número de moléculas adsorbidas en la superficie de una AuNP obtenidas por los dos métodos propuestos en este anexo.

Método	Adenina/AuNP		Timina/AuNP		Citosina/AuNP	
	A_{671}/A_{520}	$\Delta\text{Abs}/[\text{AuNPs}]$	A_{635}/A_{520}	$\Delta\text{Abs}/[\text{AuNPs}]$	A_{684}/A_{520}	$\Delta\text{Abs}/[\text{AuNPs}]$
Serie 1	2333	1776	36667	34772	1267	992
Serie 2	2667	1966	43333	24507	1333	1032
Serie 3	2333	1935	66667	32749	1500	1120
Media	2444	1892	48889	30676	1367	1048

Anexo 2: Estimación del peso molecular del ADN de *calf thymus*

Una disolución de ADN de doble cadena con una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ presenta una densidad óptica igual a la unidad.* Por otra parte, la absorptividad molar del ADN de *calf thymus* a 258 nm es $6600 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (si la concentración se expresa en grupos fosfatos)[†]; cuando se expresa por pares de bases del ADN sería $13200 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Si estos datos son introducidos en la ley de Lambert-Beer, es posible obtener el peso molecular estimado del ADN de *calf thymus*: $\sim 662 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

* J. Sambrook, E. F. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.

[†] B. Norden and F. Tjerneld, *Biopolymers*, 1982, **21**, 1713-1734

Índice de Figuras

Figura 1.1. Oscilación de la nube electrónica de nanoesferas metálicas en presencia del campo eléctrico de un haz de luz incidente. Reimpreso con permiso de K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 668-677.⁸ Copyright 2003 American Chemical Society. _____ **18**

Figura 1.2. Influencia del tamaño de la nanopartícula en el campo eléctrico sentido por la nube electrónica, donde E representa la componente del campo eléctrico y x la dirección de propagación de la luz. Cuando la nanopartícula es mucho más pequeña que la longitud de onda de la luz incidente ($\lambda \gg 2r$), se puede considerar que en cualquier punto de la nube electrónica el campo electromagnético es el mismo, formándose un dipolo (A). Sin embargo, cuando la nanopartícula no es lo suficientemente pequeña el campo no es homogéneo, originándose múltiples dipolos en lugar de un único dipolo. _____ **21**

Figura 1.3. Influencia del tamaño de esferas de oro en las secciones eficaces de extinción (línea continua verde), absorción (línea discontinua roja) y dispersión (línea punteada negra). El espectro A corresponde a un diámetro de 20 nm, donde la dispersión es nula; el espectro B es de AuNPs de 40 nm, donde la dispersión influye levemente; el espectro C muestra una dispersión casi similar a la absorción cuando el tamaño es 80 nm. Reimpreso con permiso de P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, 7238-7248.¹⁶ Copyright 2006 American Chemical Society. _____ **23**

Figura 1.4. Diferentes tipos de estabilización de nanopartículas: a) estabilización electrostática a partir de moléculas cargadas; b) estabilización estérica a partir de la funcionalización de la NP con polímeros o macromoléculas; c) estabilización electroestérica a partir de la funcionalización de la NP con polielectrolitos. Reimpreso con permiso de W. Zhao, M. A. Brook, Y. Li, *ChemBioChem*, 2009, 9, 2363-2371.²² Copyright 2008 John Wiley and Sons. _____ **24**

Figura 1.5. Esquema de la unidad básica del ADN y de la estructura de las cuatro bases. La diferencia entre nucleósido y nucleótido yace en la ausencia o presencia del grupo fosfato respectivamente. _____ **26**

- Figura 1.6.** Procesos de desprotonación para los cuatro nucleósidos. Los valores de pK_a son a una temperatura de 25 °C y a una fuerza iónica de 0.1.⁴³ El hidrógeno marcado en rojo es el que se intercambia. _____ 27
- Figura 1.7.** Representación esquemática de la descomposición de un polímero con conformación extendida aleatoria (línea gruesa amarilla) en vectores cuya dirección es constante. La longitud de persistencia sería el promedio de los módulos de estos vectores. __ 30
- Figura 1.8.** Estructuras propuestas para la interacción de las AuNP con: a) adenina, dA, dAMP;⁶⁹ b) guanina, dG, dGMP;⁷⁰ c) citosina, dC, dCMP;⁶⁹ d) timina, dT, dTMP.⁶⁹ Las líneas sólidas representan la interacción principal, mientras las líneas no continuas señalan una débil contribución. _____ 33
- Figura 1.9.** Conformaciones adquiridas por oligonucleótidos adsorbidos a la superficie de una AuNP según donde se encuentren los monómeros con alta afinidad de interacción. Reimpreso con permiso de K. A. Brown, S. Park, K. Hamad-Schifferly, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 7517-7521.⁸¹ Copyright 2008 American Chemical Society. _____ 36
- Figura 1.10.** Interacción de oligonucleótidos de diferente rigidez con AuNPs. A) se corresponde con ADN muy flexible (baja P), B) sería una situación intermedia, mientras que C) sería una molécula muy rígida (con una alta P). La molécula más flexible es la que presenta mayor puntos de contacto y por lo tanto es la que forma el complejo más estable. Reimpreso con permiso de J. Yang, B. Pong, J. Y. Lee, H. Too, *J. Inorg. Biochem*, 2007, 101, 824-830.⁴⁹ Copyright 2008 Elsevier. _____ 36
- Figura 1.11.** Mecanismo de desnaturalización de moléculas de ADN de doble cadena ancladas en la superficie de la AuNP, donde la tendencia a formar enlaces covalentes Au-S domina el proceso provocando incluso la apertura de la hélice. Reimpreso con permiso de D. Peled, R. Naaman, S. S. Daube, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, 8581-8584.⁸⁹ Copyright 2010 American Chemical Society. _____ 38
- Figura 1.12.** Esquema del uso de nanopartículas de oro funcionalizadas con ADN. Dos grupos de AuNPs funcionalizadas con diferentes hebras de ADN y no complementarias (a y b), tenderán a recbinarse al añadir una hebra complementaria a las dos adsorbida a la superficie (cadena a'b'). Este acercamiento se refleja en un cambio de color de azul a rojo. Reimpreso con permiso de C. S. Thaxton, D. G. Georganopoulou, C. A. Mirkin, *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363, 120-126.¹⁰³ Copyright 2006 Elsevier. _____ 39
- Figura 1.13.** Programación de AuNPs funcionalizadas con hebras de ADN, cuyas terminaciones presentan diferentes combinaciones de bases, permitiendo la obtención de estructuras cristalinas de complejos de AuNPs. Reimpreso con permiso de S. Y. Park, A. K. R. Lytton-jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, A. Mirkin, *Nature*, 2008, 451, 553-556.⁹⁸ Copyright 2008 Nature Publishing Group. _____ 40

Figura 2.1. Captura de pantalla del programa MiePlot con la obtención de la sección eficaz de extinción, dispersión y absorción de AuNPs de 10 nm.	42
Figura 2.2. Espectro de radiación electromagnética en el rango visible. Imagen obtenida del repositorio https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum-es.svg bajo licencia de Dominio Público.	44
Figura 2.3. Sistemas de ejes según el espacio de color CIELab.	45
Figura 2.4. Captura de pantalla del archivo de Excel para la aplicación del sistema CIELab a espectros de absorción. A) Valores obtenidos de a^* , b^* y L^* para cada espectro de absorción; B) colores simulados de cada espectro de absorción; C) valores de absorbancia según la longitud de onda para cada espectro.	47
Figura 3.1. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 15 nm. El máximo se posiciona en torno a 520 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.	55
Figura 3.2. A) Ejemplo de imagen de TEM utilizada para la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 15 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 220 nanopartículas.	56
Figura 3.3. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 30 nm. El máximo se encuentra a los 525 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.	58
Figura 3.4. Ejemplo de imagen de TEM utilizada para la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 30 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 200 nanopartículas.	58
Figura 3.5. Espectro de absorción de las AuNPs sintetizadas (dilución 1:10) con un tamaño estimado de 5 nm. La posición del máximo está en torno a los 510 nm. La imagen en el interior del gráfico corresponde a una fotografía de la muestra sin diluir.	59
Figura 3.6. Ejemplo de imagen de TEM utilizada en la estimación del tamaño promedio de las AuNPs de 5 nm. B) Histograma obtenido de la medida del tamaño de 230 nanopartículas.	60
Figura 3.7. Longitudes de onda teóricas de la banda SPR según el tamaño de la AuNP. Las longitudes de ondas fueron calculadas con el programa informático MiePlot, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy. ¹¹²	61
Figura 3.8. Relación logarítmica de los coeficientes de extinción teóricos de AuNPs con el tamaño. Los coeficientes de extinción fueron calculados con el programa informático MiePlot, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy. ¹¹²	62
Figura 3.9. Evolución del grado de agregación conforme aumenta la cantidad de NaCl para una cantidad fija de AuNPs de 14.8 nm, $[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M. La línea roja discontinua corresponde al punto donde el proceso de agregación es muy sensible a la fuerza iónica; la	

línea azul discontinua marca el punto a partir del cual la cantidad de sal no afecta a la agregación. Los datos de absorbancia fueron tomados a los 10 minutos de mezclar las AuNPs con el electrolito inerte. _____ 63

Figura 3.10. Evolución del grado de agregación conforme aumenta la concentración de AuNPs (14.8 nm) a una fuerza iónica constante de 0.07 M. La línea roja discontinua indica la concentración de AuNPs a la que se produce la disminución de la agregación. Los datos de absorbancia fueron tomados a los 10 minutos de mezclar los reactivos. _____ 64

Figura 3.11. Evolución de los espectros de absorción de AuNPs (14.8 nm) con el tiempo a diferentes concentraciones de NaCl: A) 0.05 M; B) 0.075 M; C) 0.1 M. _____ 65

Figura 3.12. A) Espectros de absorción de AuNPs (27 nm) en presencia de NaCl a diferentes tiempos. $[AuNPs] = 4.7 \times 10^{-11}$ M, $[NaCl] = 0.075$ M. B) Espectros de absorción de AuNPs (4.5 nm) a los 30 minutos de adicionar diferentes concentraciones. $[AuNPs] = 8.9 \times 10^{-9}$ M. _____ 66

Figura 3.13. Estructura de los alcoholes tetraédricos utilizados en el presente estudio. Conforme se sustituyen hidrógenos por grupos metilos aumenta la hidrofobicidad del alcohol. _____ 67

Figura 3.14. Espectros normalizados de AuNPs (15.4 nm) a diferentes proporciones de codisolvente: A) metanol; B) etanol. La línea discontinua marca la posición original de la banda SPR ($X_s = 0.00$), que corresponde con $\lambda = 520$ nm. $[AuNPs] = 2.9 \times 10^{-10}$ M. _____ 68

Figura 3.15. Espectros de absorción de AuNPs (15.4 nm) en presencia de diferentes fracciones molares de: A) 2-propanol, B) terc-butanol. $[AuNPs] = 2.9 \times 10^{-10}$ M. _____ 68

Figura 3.16. A_{631}/A_{520} de las AuNPs (15.4 nm) en función de la concentración de alcohol: A) 2-propanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.20, 0.32, 0.40, 0.50, 0.53, 0.57, 0.60, 0.65 y 0.67; B) terc-butanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.23, 0.30, 0.40, 0.42, 0.44, 0.50, 0.55, 0.60 y 0.63. El color rojo corresponde a los espectros donde no se observaron hombro o segunda banda, mientras que el color azul corresponde a los espectros que presentaron hombro o bandas adicionales. _____ 69

Figura 3.17. Fotografía con muestras de AuNPs prepradas en diferentes mezclas alcohol-agua. La primera fila corresponde al terc-butanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.42, 0.50, 0.60 y 0.63. La siguiente corresponde al 2-propanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.40, 0.57, 0.65 y 0.67. La tercera fila corresponde al etanol, cuyas fracciones molares son 0.00, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 0.73. La última corresponde al metanol, con fracciones molares de 0.00, 0.10, 0.40, 0.50, 0.60 y 0.80. _____ 69

Figura 3.18. Variación de la longitud de onda de la banda SPR con el índice de refracción. Las longitudes de ondas fueron calculadas con el programa informático MiePlot, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹² _____ 70

Figura 3.19. Espectros teóricos de AuNPs de 15.4 nm a la máxima fracción molar de cada codisolvente. Los espectros fueron calculados con el programa informático MiePlot, utilizando las funciones dieléctricas del oro tomadas de Johnson y Christy.¹¹² _____ 71

Figura 3.20. Imágenes TEM de AuNPs (15.4 nm) en mezclas agua-alcohol. A) AuNPs en presencia de metanol ($X_{MeOH} = 0.80$), B) AuNPs en presencia de etanol ($X_{EtOH} = 0.73$), C) AuNPs en presencia de 2-propanol ($X_{2-prop} = 0.67$), D) AuNPs en presencia de terc-butanol ($X_{t-BuOH} = 0.63$). $[AuNPs] = 2.9 \times 10^{-10}$ M. _____ 73

Figura 3.21. Medidas de intensidad de DLS de AuNPs (15.4 nm) en agua y en presencia de 2-propanol o terc-butanol. En todos los casos, el contenido de alcohol corresponde a la concentración más alta. $[AuNPs] = 2.9 \times 10^{-10}$ M. _____ 74

Figura 3.22. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (15.4 nm) para tres muestras diferentes del sistema agua/2-propanol: a) $X_{2-prop} = 0.10$; b) $X_{2-prop} = 0.57$; c) $X_{2-prop} = 0.67$. Los puntos representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que la línea discontinua verde corresponde a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla corresponde a la absorción de fondo debida mayormente a la dispersión de luz. _____ 76

Figura 3.23. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (15.4 nm) para tres muestras diferentes del sistema agua/terc-butanol: a) $X_{t-BuOH} = 0.10$; b) $X_{t-BuOH} = 0.50$; c) $X_{t-BuOH} = 0.63$. Los puntos representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde y azul corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla corresponde a la absorción de fondo debida mayormente a la dispersión de luz. _____ 77

Figura 3.24. Evolución de los valores de absorbancia obtenidos por deconvolución con la concentración de: A) 2-propanol; B) terc-butanol. La línea roja corresponde a los valores provenientes de la primera banda, asociada a las AuNPs libres. Las líneas discontinuas verde y azul corresponden a los valores provenientes de la segunda y tercera banda obtenida, asociadas a la interacción de las AuNPs con las moléculas de alcohol. _____ 79

Figura 4.1. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir la base y corresponden a un intervalo de $[adenina] = 1.00 \times 10^{-7}$ a 1.00×10^{-6} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la adenina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenina: 1) 0.00 M; 2) 3.00×10^{-7} M; 3) 3.25×10^{-7} M; 4) 3.5×10^{-7} M; 5) 3.75×10^{-7} M; 6) 4.00×10^{-7} M; 7) 4.25×10^{-7} M; 8) 4.50×10^{-7} M; 9) 4.75×10^{-7} M; 10) 5.00×10^{-7} M; 11) 5.25×10^{-7} M; 12) 1.00×10^{-6} M. _____ 86

Figura 4.2. Evolución del grado de agregación (A_{671}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de adenina. _____ 87

- Figura 4.3.** Espectros de UV-visible de AuNPs en el rango de concentración de adenina donde se produce la reversión en la agregación (1.00×10^{-6} a 9.00×10^{-6} M). Las marcas indican la posición de la banda de agregación antes y después de la reversión. _____ **87**
- Figura 4.4.** Determinación del número de moléculas de adenina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 671 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M. _____ **88**
- Figura 4.5.** Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ([AuNPs] = 3.0×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de adenina. Las concentraciones de adenina son: 4.00×10^{-7} M (círculos negros), 5.00×10^{-7} M (estrellas rojas) y 1.00×10^{-6} M (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponde a las nanopartículas libres; B) 671 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas. __ **89**
- Figura 4.6.** Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{671}/A_{520} en el intervalo [adenina] = 3.25×10^{-7} a 5.25×10^{-7} M. _____ **90**
- Figura 4.7.** Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de adenina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 93 \pm 1$. _____ **91**
- Figura 4.8.** Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab. A) Ajuste del parámetro a^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo [adenina] = 4.00×10^{-7} - 4.75×10^{-7} M. B) Ajuste del parámetro b^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo [adenina] = 3.75×10^{-7} - 4.50×10^{-7} M. _____ **92**
- Figura 4.9.** Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos para tres concentraciones diferentes de adenina: A) 2.50×10^{-7} M; B) 4.00×10^{-7} M; C) 1.00×10^{-6} M. Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que la línea discontinua verde corresponde a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas. _____ **93**
- Figura 4.10.** Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo [adenina] = 3.75×10^{-7} M a 4.75×10^{-7} M. _____ **93**
- Figura 4.11.** A) Titulación espectroscópica de AuNPs con timina. Los espectros fueron tomados 1 hora después añadir la base y corresponden a un intervalo de [timina] = 1.0×10^{-6} a 1.5×10^{-5} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la timina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de timina: 1) 0.0 M; 2) 2.0×10^{-6} M; 3) 3.0×10^{-6} M; 4) 4.0×10^{-6} M; 5) 5.0×10^{-6} M; 6) 6.0×10^{-6} M; 7) 7.0×10^{-6} M; 8) 8.0×10^{-6} M; 9) 9.0×10^{-6} M; 10) 1.0×10^{-5} M; 11) 1.2×10^{-5} M; 12) 1.5×10^{-5} M. _____ **95**

Figura 4.12. A) Evolución del grado de agregación (A_{635}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de timina. B) Determinación del número de moléculas de timina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 635 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M. _____ **96**

Figura 4.13. Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ($[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M) en presencia de diferentes concentraciones de timina. Las concentraciones de timina son: 3.0×10^{-6} M (círculos negros), 1.0×10^{-5} M (estrellas rojas) y 1.0×10^{-4} M (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponden a las nanopartículas libres; B) 635 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas. _____ **96**

Figura 4.14. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{635}/A_{519} en el intervalo $[timina] = 3.0 \times 10^{-6}$ M a 9.0×10^{-6} M. _____ **97**

Figura 4.15. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de timina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 93 \pm 1$. _____ **98**

Figura 4.16. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab a la ecuación de Benesi-Hildebrand. A) Ajuste lineal del parámetro a^* en el intervalo $[timina] = 6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$ M. B) Ajuste lineal del parámetro b^* en el intervalo $[timina] = 6.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$ M. _____ **98**

Figura 4.17. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo $[timina] = 4.0 \times 10^{-6}$ a 8.0×10^{-6} M. _____ **99**

Figura 4.18. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con citosina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir la base y corresponden a un intervalo de $[citosina] = 1.0 \times 10^{-7}$ a 5.0×10^{-7} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la citosina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de citosina: 1) 0.0 M; 2) 1.0×10^{-7} M; 3) 2.0×10^{-7} M; 4) 2.4×10^{-7} M; 5) 2.6×10^{-7} M; 6) 2.8×10^{-7} M; 7) 3.0×10^{-7} M; 8) 3.2×10^{-7} M; 9) 3.4×10^{-7} M; 10) 3.6×10^{-7} M; 11) 4.0×10^{-7} M; 12) 5.0×10^{-7} M. _____ **100**

Figura 4.19. A) Espectros de UV-visible de AuNPs en el rango de concentración de citosina donde se produce la reversión en la agregación (3.2×10^{-7} a 5.0×10^{-7} M). Las marcas indican la posición de la banda de agregación antes y después del proceso de reversión. B) Espectros de UV-visible de AuNPs a concentraciones de citosina superiores a 5.0×10^{-7} M. _____ **101**

Figura 4.20. A) Evolución del grado de agregación (A_{684}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de citosina. B) Determinación del número de moléculas de citosina que interaccionan (n) por diferencias de absorbancia a 684 nm. La intersección de las dos líneas proporciona n . La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M. _____ **101**

Figura 4.21. Cambios en las intensidades de absorbancia de soluciones de oro coloidal ($[AuNPs] = 3.0 \times 10^{-10}$ M) en presencia de diferentes concentraciones de citosina. Las

concentraciones de citosina son: 2.3×10^{-7} M (círculos negros), 3.0×10^{-7} M (estrellas rojas) y 1.0×10^{-6} M (triángulos verdes). Los datos de absorbancia son a: A) 520 nm, que corresponden a las nanopartículas libres; B) 684 nm, que corresponde a las nanopartículas agregadas. **102**

Figura 4.22. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{684}/A_{520} en el intervalo [citosina] = 2.0×10^{-7} a 2.8×10^{-7} M. **103**

Figura 4.23. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de citosina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L^* = 91.75 \pm 0.25$. **104**

Figura 4.24. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab. A) Ajuste del parámetro a^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo [citosina] = 2.2×10^{-7} - 2.7×10^{-7} M. B) Ajuste del parámetro b^* y ampliación del ajuste lineal en el intervalo [citosina] = 2.4×10^{-7} - 2.7×10^{-7} M. **104**

Figura 4.25. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo [citosina] = 2.2×10^{-7} a 2.7×10^{-7} M. **106**

Figura 4.26. Evolución con el tiempo del espectro de absorción UV-Visible de AuNPs a una concentración de guanina de 10^{-6} M. A) En la primera hora tras mezclar los reactivos. Las fotografías insertadas corresponden a la muestra en el minuto 0 (izquierda) y en el minuto 60 (derecha). B) tras 1 hora, 12 horas y 24 horas tras mezclar los reactivos. Las fotografías insertadas corresponden a la muestra en el minuto 0 (izquierda) y tras 24 horas (derecha). **107**

Figura 4.27. Espectros de absorción UV-visible de AuNPs con las cuatro bases del ADN 1 hora después del mezclado. Las fotografías insertadas corresponden a las muestras justo después de realizar el espectro. Las concentraciones de nucleobase fueron: A) 10^{-7} M; B) 10^{-6} M; C) 10^{-3} M. **109**

Figura 4. 28. A) Espectro $^1\text{H-RMN}$ de la adenina en agua. La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. B) Espectro de WaterLOGSY para la adenina en ausencia de AuNPs. En ambos espectros la concentración de adenina fue 10^{-3} M. **114**

Figura 4.29. Espectro de WaterLOGSY de nanopartículas de oro a la máxima concentración permitida por la experiencia. [AuNPs] = 2.7×10^{-9} M, [citrato] = 10^{-3} M. **114**

Figura 4.30. A) Comparativa del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la adenina con AuNPs (espectro rojo) con el espectro de WaterLOGSY de la adenina con AuNPs (espectro azul). B) Espectro de WaterLOGSY para el sistema adenina/AuNPs a 333 K. La señal con un desplazamiento químico de 0.25 es debida al referente TMSP. [Adenina] = 10^{-3} M; [AuNPs] = 9.1×10^{-10} M; [citrato] = 3.5×10^{-4} M. **115**

Figura 4.31. A) Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de timina en agua. La señal del agua fue suprimida por *excitation sculpting water suppression*. B) Espectro de WaterLOGSY para la timina en ausencia de AuNPs. [Timina] = 10^{-3} M. **116**

Figura 4.32. Comparativa del espectro de ^1H -RMN de la timina con AuNPs (espectro rojo) con el espectro de WaterLOGSY de la timina con AuNPS (espectro azul). La señal con un desplazamiento químico próximo a 0 es debida al referente TMSP. [Timina] = 10^{-3} M; [AuNPs] = 9.1×10^{-10} M; [citrato] = 3.5×10^{-4} M. _____ 117

Figura 4.33. A) Espectro de ^1H -RMN de las moléculas de citrato en una solución coloidal. B) Espectro ^1H -RMN de las moléculas de citrato en una solución coloidal a una concentración de adenina de 3×10^{-3} M. C) Comparativa de los espectros de ^1H -RMN de las moléculas de citrato en ausencia de base (espectro rojo) con el espectro de ^1H -RMN de las moléculas de citrato en exceso de adenina (espectro azul). La señal del agua fue suprimida por excitation sculpting water suppression. En todos estos espectros [citrato] = 4.8×10^{-4} M. _____ 118

Figura 4.34. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenosina. Los espectros fueron tomados 1 hora después de añadir el nucleótido y corresponden a un intervalo [adenosina] = 6.0×10^{-5} a 3.2×10^{-3} M. B) Fotografías de las muestras 1 hora después de mezclar la adenosina con las AuNPs. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenosina: 1) 0 M; 2) 6.0×10^{-5} M; 3) 1.0×10^{-4} M; 4) 1.2×10^{-4} M; 5) 3.0×10^{-4} M; 6) 5.0×10^{-4} M; 7) 7.0×10^{-4} M; 8) 9.0×10^{-4} M; 9) 1.0×10^{-3} M; 10) 1.6×10^{-3} M; 11) 2.4×10^{-3} M; 12) 3.2×10^{-3} M. _____ 120

Figura 4.35. Evolución del grado de agregación (A_{590}/A_{520}) de AuNPs con la concentración de adenosina. La concentración de AuNPs fue fijada a 3.0×10^{-10} M. _____ 120

Figura 4.36. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{590}/A_{520} en el intervalo [adenosina] = 8.0×10^{-5} M a 8.0×10^{-4} M. _____ 121

Figura 4.37. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de adenosina. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIElab, siendo $L = 91 \pm 1$. _____ 122

Figura 4.38. Ajustes de los parámetros colorimétricos obtenidos por la teoría CIElab a la ecuación de Benesi-Hildebrand. A) Ajuste lineal del parámetro a^* en el intervalo 5.0×10^{-4} - 3.0×10^{-3} M. B) Ajuste lineal del parámetro b^* en el intervalo 5.0×10^{-4} - 3.0×10^{-3} M. _____ 122

Figura 4.39. Ajuste de la proporción de áreas correspondientes a las AuNPs agregadas por la ecuación de Benesi-Hildebrand. El ajuste se realizó en el intervalo [adenosina] = 3.0×10^{-4} M a 1.6×10^{-3} M. _____ 124

Figura 4.40. Espectro de absorción de AuNPs con diferentes concentraciones de AMP. Los espectros fueron tomados una hora después de mezclar los componentes. Las fotografías insertadas corresponden a las muestras justo después de hacer la medida. _____ 125

Figura 4.41. A) Evolución de los espectros de absorción de las AuNPS a diferentes concentraciones de AMP en presencia de sal. Los espectros fueron tomados 30 minutos después de añadir la sal. [NaCl] = 0.075 M; [AMP] = 10^{-8} a 10^{-3} M. Las flechas indican el desplazamiento de la banda SPR conforme aumenta la concentración de AMP. B) Fotografía de las muestras a los 30 minutos de añadir NaCl. [NaCl] = 0.075 M. Cada casilla corresponde a

una concentración diferente de AMP: 1) 1×10^{-3} M; 2) 5×10^{-4} M; 3) 1×10^{-4} M; 4) 5×10^{-5} M; 5) 1×10^{-5} M; 6) 5×10^{-6} M; 7) 1×10^{-6} M; 8) 1×10^{-7} M; 9) 1×10^{-8} M; 10) 0 M. _____ 125

Figura 4.42. Espectros de absorción de AuNPs con diferentes condiciones de pH (la línea negra corresponde a un pH = 4.0; la línea roja a un pH = 6.2 y la línea azul a un pH = 10.0) y concentraciones de adenina: a) 10^{-8} M; b) 10^{-7} M; c) 10^{-6} M; d) 10^{-5} M. [AuNPs] = 3.0×10^{-10} M. _____ 129

Figura 4.43. Color de muestras de AuNPs en función de la concentración de adenina y pH del medio. _____ 130

Figura 4.44. A) Titulación espectroscópica de AuNPs con adenina a pH=4. El espectro fue tomado una hora después de añadir la adenina. El intervalo de concentraciones de la base fue de 5×10^{-8} a 2×10^{-7} M. B) Fotografía de las muestras una hora después de añadir la adenina a las AuNPs a pH = 4. Cada casilla tiene una concentración diferente de adenosina: 1) 0 M; 2) 5.0×10^{-8} M; 3) 6.0×10^{-8} M; 4) 7.0×10^{-8} M; 5) 8.0×10^{-8} M; 6) 9.0×10^{-8} M; 7) 1.0×10^{-7} M; 8) 1.2×10^{-7} ; 9) 1.4×10^{-7} ; 10) 1.6×10^{-6} M; 11) 1.8×10^{-7} ; 12) 2.0×10^{-7} . _____ 131

Figura 4.45. Ajuste por la ecuación de Benesi-Hildebrand para la relación de absorbancia A_{635}/A_{520} en el intervalo [adenina] = 8.0×10^{-8} M a 1.2×10^{-7} M a un pH = 4. _____ 132

Figura 5.1. Evolución del espectro de absorción de las AuNPs con el tiempo en una mezcla de tampón cacodilato (9×10^{-4} M, poner concentración real) y NaCl (9×10^{-3} M). [AuNPs] = 3.3×10^{-10} M. La línea discontinua indica la posición de la banda en ausencia de tampón. _____ 142

Figura 5.2. Evolución de espectros de absorción de las AuNPs con el tiempo en tampón cacodilato (9×10^{-4} M) y NaCl (9×10^{-3} M), a una concentración de ADN de doble cadena de: A) 10^{-7} M; B) 10^{-3} M. _____ 143

Figura 5.3. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena (método A). [Na⁺] = 0.075 M. Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen [Na⁺] = 0.075 M y diferentes concentraciones de ADN: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 5×10^{-5} M; 6) 10^{-4} M; 7) 5×10^{-4} M; 8) 10^{-3} M; 9) 0 M ([Na⁺] = 0 M). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN. _____ 144

Figura 5.4. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) frente a la concentración de ADN. [AuNPs] = 3.3×10^{-10} y [Na⁺] = 0.075 M. _____ 144

Figura 5.5. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) con el tiempo, donde A_{668} representa la absorción a 668 nm y A_{520} a 520 nm. [AuNPs] = 3.3×10^{-10} M; [Na⁺] = 0.075 M. _____ 145

Figura 5.6. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena (método B). [Na⁺] = 0.075 M. Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de ADN a la mezcla AuNPs-NaCl. B) Fotografía de

las diferentes muestras obtenidas por el método B. Todas las casillas tienen $[Na^+] = 0.075 M$ y diferentes concentraciones de ADN: 1) $0 M$; 2) $10^{-7} M$; 3) $10^{-6} M$; 4) $10^{-5} M$; 5) $10^{-4} M$; 6) $10^{-3} M$; 9) $0 M$ ($[NaCl] = 0 M$). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de ADN a la disolución AuNPs-NaCl. _____ **145**

Figura 5.7. Espectro de absorción UV de ADN de doble cadena (línea roja) y de ADN de cadena simple (línea azul) ambos a la misma concentración. El ADN de cadena simple proviene de la desnaturalización térmica del ADN de cadena doble del que se obtuvo el espectro. ____ **146**

Figura 5.8. Espectros de dicroísmo circular de ADN de doble cadena (línea roja) y de ADN de cadena simple (línea azul), ambos a la misma concentración. El ADN de cadena simple proviene de desnaturalización térmica del ADN de cadena doble del que se obtuvo el espectro. _____ **147**

Figura 5.9. A-D) Comparativa de los espectros de absorción obtenidos por el método A para ADN de doble cadena (línea roja) y ADN de cadena simple (línea azul). $[ADN] =$: A) $10^{-4} M$; B) $10^{-5} M$; C) $10^{-6} M$; D) $10^{-7} M$. Todos los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el NaCl. E) Fotografías de las diferentes muestras obtenidas por el método A para ADN de cadena doble (fila superior) y para ADN de cadena simple (fila inferior). Cada casilla tiene una concentración diferente de ADN: 1) $10^{-4} M$; 2) $10^{-5} M$; 3) $10^{-6} M$; 4) $10^{-7} M$. En todos los casos, $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10} M$ y $[Na^+] = 0.075 M$. _____ **148**

Figura 5.10. A) Bandas que genera el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder ($0.7 \mu g/línea$ en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio). B) Fotografía del test de agarosa (0.8% , con Red Safe como tinte) para las 10 alícuotas tomadas de la sonicación. Cada línea corresponde a un tiempo concreto de sonicación: 0) $0 s$ (control); 1) $10 s$; 2) $20 s$; 3) $30 s$; 4) $40 s$; 5) $50 s$; 6) $60 s$; 7) $120 s$; 8) $180 s$; 9) $240 s$; 10) $600 s$. _____ **149**

Figura 5.11. A) Espectros de absorción de AuNPs ($3.3 \times 10^{-10} M$) en presencia de diferentes concentraciones de ADN con un tamaño medio estimado de 1650 pares de bases, siendo $[Na^+] = 0.075 M$ (método A). Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A con ADN de aproximadamente 1650 bps). Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde al control) tienen $[Na^+] = 0.075 M$ y diferentes concentraciones de ADN: 1) $0 M$; 2) $10^{-9} M$; 3) $10^{-8} M$; 4) $10^{-7} M$; 5) $10^{-6} M$; 6) $10^{-5} M$; 7) $10^{-4} M$; 8) $10^{-3} M$; 9) $0 M$ ($[Na^+] = 0 M$). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN. _____ **150**

Figura 5.12. Evolución con el tiempo de la banda SPR de AuNPS de $27 nm$ ($4.7 \times 10^{-11} M$) en presencia de ADN de doble cadena ($10^{-4} M$). Las concentraciones de cacodilato y de Na^+ fueron $9 \times 10^{-4} M$ y $9 \times 10^{-3} M$ respectivamente. _____ **152**

Figura 5.13. A) Espectros de absorción de AuNPs de $27 nm$ ($4.7 \times 10^{-11} M$) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena a $[Na^+] = 0.075 M$ (método A). Los

espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A para AuNPs de 27 nm. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen $[Na^+] = 0.075 M$ y diferentes concentraciones de ADN: 1) $0 M$; 2) $10^{-7} M$; 3) $10^{-6} M$; 4) $10^{-5} M$; 5) $5 \times 10^{-5} M$; 6) $10^{-4} M$; 7) $5 \times 10^{-4} M$; 8) $10^{-3} M$; 9) $0 M$ ($[Na^+] = 0 M$). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN. _____ 153

Figura 5.14. Evolución con el tiempo de la banda SPR de AuNPs de 4.5 nm ($1.0 \times 10^{-8} M$) en presencia de ADN de doble cadena ($10^{-4} M$). Las concentraciones de cacodilato y Na^+ fueron $8.8 \times 10^{-4} M$ y $8.8 \times 10^{-3} M$, respectivamente. _____ 154

Figura 5.15. A) Espectros de absorción de AuNPs de 4.5 nm ($1.7 \times 10^{-11} M$) en presencia de diferentes concentraciones de ADN de doble cadena a $[Na^+] = 0.25 M$ (método A). Los espectros fueron obtenidos 30 minutos después de la adición de sal a la mezcla AuNPs-ADN. B) Fotografía de las diferentes muestras obtenidas por el método A para AuNPs de 4.5 nm. Todas las casillas excepto la número 9 (que corresponde a la referencia) tienen $[Na^+] = 0.25 M$ y diferentes concentraciones de ADN: 1) $0 M$; 2) $10^{-7} M$; 3) $10^{-6} M$; 4) $10^{-5} M$; 5) $5 \times 10^{-5} M$; 6) $10^{-4} M$; 7) $5 \times 10^{-4} M$; 8) $10^{-3} M$; 9) $0 M$ ($[Na^+] = 0 M$). Las fotografías fueron tomadas 30 minutos después de la adición de NaCl a la disolución AuNPs-ADN. _____ 154

Figura 5.16. Evolución del grado de agregación con la concentración de ADN para diferentes tamaños de AuNPs. Las pendientes calculadas se obtuvieron en el intervalo de $[ADN] = 10^{-7}$ a $5 \times 10^{-5} M$, zona en la que se produce la disminución de la agregación. _____ 155

Figura 5.17. Variación de los parámetros colorimétricos a^* y b^* a diferentes concentraciones de ADN. Dichos parámetros se obtuvieron según la teoría de espacios del color CIELab y para diferentes tamaños de AuNPs: A) 14.8 nm, siendo $L^* = 93.5 \pm 0.5$; B) 27 nm, siendo $L^* = 93.0 \pm 0.5$; C) 4.5 nm, siendo $L^* = 94 \pm 1$. Los puntos de color rojo representan el parámetro a^* mientras los azules el parámetro b^* . _____ 156

Figura 5.18. Evolución de la absorbancia en el máximo de absorción con la temperatura. Los puntos negros corresponden a ADN sólo, con una concentración de $5 \times 10^{-5} M$ y con una $T_m = 68.0$ °C; los rombos rojos corresponden a ADN ($5 \times 10^{-5} M$) con AuNPs de 14.8 nm ($3.3 \times 10^{-10} M$), y con una $T_m = 67.2$ °C; los cuadrados azules corresponden a ADN ($5 \times 10^{-5} M$) con AuNPs de 4.5 nm ($1.0 \times 10^{-8} M$), y con una $T_m = 68.4$ °C. Todas las muestras se prepararon en un tampón cacodilato cuyos componentes presentaron una concentración final $[cacodilato] = 9 \times 10^{-4} M$, $[NaCl] = 9 \times 10^{-3} M$. _____ 159

Figura 5.19. Espectro 1H -NMR de ADN de doble cadena. La señal del agua fue suprimida por excitation sculpting water suppression. $[ADN] = 2.7 \times 10^{-3} M$. _____ 160

Figura 5.20. A) Espectros de absorción de AuNPs ($3.3 \times 10^{-10} M$) obtenidos a distintas concentraciones de ADN por el método C y a $[Na^+] = 0.075 M$. Los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el oro a las mezclas ADN-NaCl. B) Fotografías de las diferentes

muestras obtenidas siguiendo el método C. Todas las casillas tienen la misma concentración de AuNPs (3.3×10^{-10} M) y de Na^+ (0.075 M), a excepción de la 7. Las concentraciones de ADN son: 1) 0 M; 2) 10^{-7} M; 3) 10^{-6} M; 4) 10^{-5} M; 5) 10^{-4} M; 6) 10^{-3} M; 7) $[\text{DNA}] = 0$ M, $[\text{Na}^+] = 0$ M.

161

Figura 5.21. Comparativa de los espectros de absorción obtenidos por el método A (línea negra) y el método C (línea roja) para $[\text{AuNPs}] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[\text{Na}^+] = 0.075$ M. Las concentraciones de ADN son: A) 10^{-6} M; B) 10^{-5} M; C) 10^{-4} M; D) 10^{-3} M. Todos los espectros se obtuvieron 30 minutos después de añadir el último componente a la mezcla. _____ 162

Figura 5.22. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos por el método A para tres concentraciones diferentes de ADN: A) 10^{-7} M; B) 10^{-5} M; C) 10^{-3} M. Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde y azul corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas. _____ 162

Figura 5.23. Deconvolución de los espectros experimentales de AuNPs (14.8 nm) obtenidos por el método C para tres concentraciones diferentes de ADN: A) 10^{-7} M; B) 10^{-5} M; C) 10^{-3} M. Los puntos negros representan los datos experimentales. La línea rosa corresponde al espectro simulado. La línea discontinua roja es la contribución de las nanopartículas libres mientras que las líneas discontinuas verde, azul y naranja corresponden a la contribución de las nanopartículas agregadas. La línea discontinua amarilla es la banda correctora de la dispersión de luz y de la transición entre bandas de las NPs metálicas. _____ 163

Figura 5.24. Evolución de las áreas deconvolucionadas con la concentración de ADN para el método A y C. A) Proporción del área correspondiente a la fracción de AuNPs libres o dispersas. B) Proporción del área proveniente de las fracciones de AuNPs agregadas. El área de las nanopartículas agregadas se calculó sumando las áreas de las distintas bandas asociadas a las AuNPs agregadas. _____ 164

Figura 5.25. A) Espectros de absorción de AuNPs (3.3×10^{-10} M) a distintas concentraciones de ADN de doble cadena. Las concentraciones fueron: $[\text{cacodilato}] = 9 \times 10^{-4}$ M, $[\text{Na}^+] = 9 \times 10^{-3}$ M. B) Espectros de absorción de AuNPs a distintas concentraciones de ADN obtenidos tras corregir la dispersión de luz según el método propuesto por S. J. Leach y H. A. Scheraga.¹⁸⁴

166

Figura 5.26. A) Espectro de dicroísmo circular de ADN de doble cadena a diferentes concentraciones de AuNPs. B) Evolución de la banda negativa conforme aumenta la concentración de AuNPs. C) Evolución de la banda positiva conforme aumenta la concentración de AuNPs. $[\text{ADN}] = 5 \times 10^{-5}$ M, $[\text{AuNPs}] = 0.0 - 6.8 \times 10^{-10}$ M. _____ 166

Figura 5.27. Espectro de dicroísmo circular de ADN de doble cadena a diferentes concentraciones de AuNPs. $[ADN] = 10^{-4}$ M, $[AuNPs] = 0.0 - 6.8 \times 10^{-10}$ M. Las flechas indican el punto isobéptico a 272 nm. _____ **167**

Figura 5.28. A) Evolución de la viscosidad relativa de ADN de doble cadena (10^{-5} M) conforme aumenta la concentración de AuNPs. B) Evolución de la viscosidad relativa de ADN de doble cadena (10^{-5} M) conforme aumenta la concentración de aniones citrato. El rango de concentración de citrato fue el mismo que el del estudio de viscosidad con AuNPs. _____ **168**

Figura 5.29. Medidas de intensidad de DLS de disoluciones de ADN (10^{-5} M) y diferentes concentraciones de AuNPs: A) 0 M; B) 3.3×10^{-10} M; C) 1.6×10^{-9} M. _____ **169**

Figura 5.30. Imágenes topográficas de ADN (calf thymus) adsorbido en una superficie de mica en ausencia y en presencia de nanopartículas de oro aniónicas. A) $[AuNPs] = 0$ M, $[ADN-CT] = 3 \times 10^{-7}$ M; C) $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[ADN-CT] = 3 \times 10^{-7}$ M. Las Figuras B y D corresponden con el análisis de la sección de cruce (línea celeste en las Figuras A y C) de las alturas. Las flechas marcan moléculas de ADN. _____ **170**

Figura 5.31. Imágenes de moléculas únicas obtenidas por FM de ADN-T4 (10^{-7} M) en ausencia de sal y AuNPs. El tinte fluorescente utilizado fue YOYO-1. _____ **171**

Figura 5.32. Imágenes de FM de ADN-T4 en presencia de AuNPs (3.3×10^{-10} M). A) Fragmentación del ADN en cadenas más cortas. B) Elongación dirigida del ADN por efecto del flujo del disolvente (la flecha indica el flujo de éste). $[ADN] = 10^{-7}$ M. _____ **171**

Figura 5.33. Evolución del grado de agregación (A_{668}/A_{520}) con el tiempo, donde A_{668} son los datos de absorción a 668 nm y A_{520} a 520 nm. $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[NaCl] = 0.075$ M. _ **172**

Figura 5.34. Imágenes topográficas de ADN-CT adsorbido en una superficie de mica en presencia de NaCl y en ausencia de AuNPs. $[ADN] = 3 \times 10^{-7}$ M, $[NaCl] = 0.075$ M. _____ **173**

Figura 5.35. Imágenes topográficas de ADN-CT adsorbido en una superficie de mica en presencia de nanopartículas de oro aniónicas y sal. $[AuNPs] = 3.3 \times 10^{-10}$ M, $[ADN] = 3 \times 10^{-7}$ M, $[NaCl] = 0.075$ M. El orden de adición fue el establecido como método A. Las Figuras B y D corresponden con el análisis de la sección de cruce (línea verde en las Figuras A y C) de las alturas. _____ **173**

Figura 5.36. Imágenes de microscopía de fluorescencia de moléculas de ADN-T4: A) en ausencia de AuNPs y a temperatura ambiente; B) en la ausencia de AuNPs y a temperatura ambiente después de calentar a 60 °C; C) en presencia de AuNPs y sin calentar; D) en presencia de AuNPs y a temperatura ambiente después de calentar a 60 °C. _____ **176**

Figura 5.37. Fotografías de las muestras con $[NaCl] = 0.02$ M, $[ADN-T4] = 10^{-7}$ M y $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10}$ M. A) Sin calentamiento; B) con calentamiento. _____ **176**

Figura 5.38. A) Imágenes de TEM de nanopartículas dispersas, cuya concentración es 4×10^{-9} M. B) Imágenes de TEM de nanopartículas en presencia de ADN; $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10}$ M, $[ADN] = 10^{-7}$ M. C) Imágenes de TEM de nanoestructuras formadas por calentamiento de una

disolución de $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10} M$ y $[ADN] = 10^{-7} M$. La barra de escalado para A corresponde a 500 nm, y para B y C corresponde a 200 nm. _____ **178**

Figura 5.39. Espectros de absorción UV-vis de AuNPs en ausencia (A) y presencia (B) de ADN-CT a diferentes condiciones de temperatura: temperatura ambiente, 70 °C y temperatura ambiente después del proceso de calentamiento. $[ADN-CT] = 10^{-7} M$, $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10} M$. _____ **179**

Figura 5.40. Espectros de dicroísmo circular de ADN-CT en ausencia y en presencia de AuNPs a diferentes condiciones térmicas: A) temperatura ambiente (sin ningún calentamiento); B) 70 °C; C) temperatura ambiente (después de calentar). $[ADN] = 10^{-7} M$, $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10} M$. _____ **181**

Figura 5.41. Espectro de ADN de calf thymus en tres condiciones de temperaturas: temperatura ambiente, sin calentamiento alguno (línea negra); 70 °C (línea roja); temperatura ambiente después de calentar (línea azul). A) En ausencia de AuNPs; B) en presencia de AuNPs, $[AuNPs] = 8 \times 10^{-10} M$. _____ **182**

Índice de Tablas

<i>Tabla 1.1. Longitudes de ondas y coeficientes de absorción para los diferentes constituyentes del ADN</i>	28
<i>Tabla 1.2. Resumen de algunas propiedades de las formas A, B y Z del ADN.</i>	32
<i>Tabla 3.1. Comparativa de la posición de la banda SPR y del coeficiente de extinción experimental con el obtenido por la teoría de Mie para las tres soluciones coloidales obtenidas.</i>	62
<i>Tabla 3.2. Índices de refracción de soluciones coloidales de oro (15.4 nm) a la máxima fracción molar de los diferentes codisolventes estudiados. [AuNPs] = 2.9×10^{-10} M</i>	71
<i>Tabla 3.3. Comparación de los desplazamientos de la banda SPR según la teoría de Mie con los obtenidos experimentalmente (en el caso de hombro o segunda banda, se considera el desplazamiento de la primera banda como referencia).</i>	72
<i>Tabla 3.4. Valores de potencial zeta (ζ / mV) de AuNPs de 15.4 nm en agua a diferentes fracciones molares de terc-butanol. [AuNPs] = 2.9×10^{-10} M. Quizás aquí al lado de esta tabla podrías poner una figurita sobre lo que representa un potencial zeta.</i>	75
<i>Tabla 3.5. Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales de las diferentes muestras AuNPs en presencia de alcohol. El subíndice 1 se refiere a la banda correspondiente a las nanopartículas libres en disolución mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a las bandas de AuNPs que interaccionan con el alcohol.</i>	77
<i>Tabla 4.1. Condiciones experimentales de los estudios cualitativos de la interacción entre AuNPs y monómeros del ADN</i>	82
<i>Tabla 4.2. Constantes de unión obtenidas para cada tanda de titulación con adenina usando los valores de absorbancia a 520 y 671 nm, así como la proporción entre estos (A_{671}/A_{520}).</i>	90
<i>Tabla 4.3. Parámetros obtenidos por deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de adenina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.</i>	94
<i>Tabla 4.4. Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de timina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.</i>	99

Tabla 4.5. <i>Parámetros obtenidos por la deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de citosina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a los diferentes complejos de AuNPs agregadas.</i>	105
Tabla 4.6. <i>Índices de refracción para disoluciones con diferentes concentraciones de adenina, timina o citosina. Las medidas se realizaron a una temperatura de 298.7 K.</i>	110
Tabla 4.7. <i>Constantes de formación obtenidas para cada base por los diferentes métodos empleados.</i>	111
Tabla 4.8. <i>Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con las diferentes bases del ADN. Los valores de K_{ap} son los calculados a partir de los datos de absorbancia.</i>	112
Tabla 4.9. <i>Parámetros obtenidos por deconvolución de los espectros experimentales a diferentes concentraciones de adenosina. El subíndice 1 se refiere a las nanopartículas libres mientras que los subíndices 2 y 3 se refieren a estructuras de AuNPs agregadas.</i>	123
Tabla 10. <i>Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con los diferentes nucleótidos procedentes de la adenina.</i>	126
Tabla 4.11. <i>Parámetros obtenidos por titulación espectroscópica de AuNPs (14.8 nm) con adenina a diferentes pH.</i>	132
Tabla 5.1. <i>Valores obtenidos de VSSA para las distintas síntesis de AuNPs y concentraciones de éstas (para obtener la misma superficie específica), obtenidas de la adición del volumen de la alícuota (V_{al}) siendo el volumen final de la muestra 2000 μl.</i>	152
Tabla 5.2. <i>Parámetros obtenidos por deconvolución para los espectros de absorción experimentales obtenidos con el método A y con el método B.</i>	163